UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

FABIANA FERNANDES BRESSAN

Geração de células pluripotentes através da indução gênica e transferência de núcleo: modelo bovino de aquisição de pluripotência

Pirassununga

2013

FABIANA FERNANDES BRESSAN

Geração de células pluripotentes através da indução gênica e transferência de núcleo: modelo bovino de aquisição de pluripotência

Versão corrigida

Tese apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Qualidade e Produtividade Animal.

Orientador: Prof. Dr. Flávio Vieira Meirelles.

Pirassununga

2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Serviço de Biblioteca e Informação da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos
da Universidade de São Paulo

B843g

Bressan, Fabiana Fernandes
Geração de células pluripotentes através da indução gênica e transferência de núcleo: modelo bovino de aquisição de pluripotência / Fabiana Fernandes Bressan. –- Pirassununga, 2013.
133 f.
Tese (Doutorado) -- Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos – Universidade de São Paulo.
Departamento de Ciências Básicas.
Área de Concentração: Qualidade e Produtividade Animal.
Orientador: Prof. Dr. Flávio Vieira Meirelles.

1. Bovinos 2. Células pluripotentes induzidas (iPS) 3. Pluripotência 4. Reprogramação celular 5. Transferência de núcleo I. Título.

AGRADECIMENTOS

Coming together is a beginning.
Keeping together is progress.
Working together is success.

Henry Ford

É usual a utilização de citações e pensamentos como epígrafes em trabalhos, dissertações e teses. Nesta tese, porém, nada seria mais justo do que começar os agradecimentos enaltecendo a cooperação e a colaboração de todos que construíram, juntos, este trabalho. Cada um no seu jeito, cada um a seu tempo, mas todos imprescindíveis. Sou muito feliz por serem tantos colaboradores, amigos, colegas, e que provavelmente o nome de todos não será citado aqui, mas que serão lembrados sempre por comporem agora esta história.

O primeiro agradecimento é para minha mãe, **Nadir Bressan**. Meu exemplo, minha garantia, minha força, minha amiga. Sempre. Junto a este agradecimento, um especial ao **Paulo Fantinato**, companheiro inigualável e indescritível. O Paulinho leva a sério o ditado "marido tem que participar!". Obrigada pela participação na minha vida, na criação dos nossos filhos de quatro patas Jack e She-ra, pelo dia-a-dia mais leve, pela participação mais do que efetiva nas rotinas no laboratório e no trabalho levado para casa, de dia de semana, de final de semana, de dia, ou pela noite toda. Eu sou uma pessoa melhor com você ao meu lado.

Ao Prof. **Flavio Meirelles**, que fez muito mais do que sua "obrigação" de orientar uma aluna de doutorado. Ele me entregou nas mãos a possibilidade de realizar um projeto "meu", do jeito que eu achei que poderia fazer, mesmo com todas as dificuldades e possibilidades de não chegar ao sucesso. Me deixou errar para aprender, mas nunca me deixou sozinha para recomeçar. Esse é o melhor estímulo que um aluno pode ter.

Ao prof. **Mario Binelli**, que me acompanha desde a graduação, sempre disposto a ajudar e ensinar; ao prof. **Lawrence Smith**, que desde sua orientação no estágio de graduação me fez ver a ciência com olhos mais abertos e atentos; aos profs. **Marcelo Bertolini** e **Marcelo Nogueira**, também há tempos discutindo ciência nas reuniões da SBTE e colaborando em experimentos; às profas. **Simone Haddad** e **Elisa Carbolante**, assim como os imprescindíveis

Drs. **Chester Sacramento** e **Vinícius Bassaneze**, que desde o começo deste projeto andamos juntos na tal "estrada da iPS"; aos Profs. **Felipe Perecin**, presente de maneira intensiva neste estudo desde sua concepção, e Profs. **Carlos Eduardo Ambrosio** e **Heidge Fukumasu**, pela convivência e ensinamentos durante todo o período de doutorado, agradeço.

Muita sorte eu tive em poder contar com a melhor equipe de "clonadores" do mundo! Prof. **Felipe Perecin**, **Juliano Sangalli**, **Rafael Sampaio**, vocês fazem a TNCS parecer extremamente fácil. Agradeço pelos muitos momentos de manipas, sempre saturadas com grandes discussões científicas. Espero que muitas outras ainda estejam por vir.

Desde o início, muitos colaboraram na produção e caracterização das iPS. Trabalhando em conjunto com essas pessoas aprendi muito, sobre muitos assuntos, protocolos, dicas, execução de experimentos. Ao **Chester Sacramento** e ao **Vinícius Bassaneze**, assim como à **Luiza Junqueira**, à **Tathiane Malta**, à **Patrícia Palma** e a todos que sempre me receberam sempre muito bem no INCOR e no Hemocentro de Ribeirão Preto, à **Daniela Teixeira** e Prof. **Alexandre Basso** da UNIFESP, **Alessandra Dellavance** e Drs. **Edgar Rizzatti** e **Alex Sandes** do Instituto Fleury, **Isabele Emanuelli** da UNESP, muito obrigada. Esse estudo não seria possível sem nossas conversas, discussões, troca de protocolos e reagentes.

Aos meus amigos pessoais e também de laboratório **Marcos Chiaratti**, **Lígia Mesquita**, **Laís Pessôa**, **Pedro Ratto**, **Natalia Nardelli**, **Raquel Rochetti**, **Heidge**, **Ricardo**, **Simone**, **André**, **Reno**, **Sérgio Galhardo**, além dos já citados, e dentre tantos outros, Arina, Fabi, Katia, Carol, Fer, Matheus, Gabi, Celina, Vanessa, Rodrigo, Helena, Mariane, Alana, Camila, Yonara, Naira, Ju, enfim, sabidamente não citando o nome de todos do LMMD, ou **GMAB**, mas a todos, agradeço pela convivência, pelos momentos de descontração, pelos momentos de discussão científica.

À família que me "adotou" em Pirassununga, D. Neide, Célio, Fe, Léo, Ri, Rafa, Fe Japa, Tio Wand, Ro, Tio Fe e Lu, obrigada pelos momentos sempre prazerosos, pela jantas de terça e almoços no sábado, por estarem sempre perto e disponíveis quando necessário.

Agradeço à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, incluindo aqui seus funcionários Layla, Alecsandra, Stephanie, Stefani, Nilton, China, Arina, Marcia, dentre outros, ao INCOR (HCFMUSP), ao Hemocentro de Ribeirão Preto, ao CNPq e à FAPESP (processo n. 2009/ 11631-6), por possibilitar a execução deste estudo.

RESUMO

BRESSAN, F. F. **Geração de células pluripotentes através da indução gênica e transferência de núcleo: modelo bovino de aquisição de pluripotência.** 133f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2013.

Estratégias como a transferência nuclear e a reprogramação induzida vêm sendo empregadas com o objetivo de induzir células somáticas a um estado pluripotente similar ao embrionário. O processo de reprogramação nuclear é extremamente desejável e possui importantes contribuições tanto no estudo da ciência básica como aplicada, como por exemplo, no aumento da eficiência das biotécnicas de produção animal ou na medicina, com a possibilidade de terapia celular autóloga. Uma série de estudos, porém, ainda são necessários para que tais aplicações sejam viáveis, uma vez que os mecanismos fundamentais das técnicas empregadas ainda não estão totalmente elucidados. Esta proposta teve como objetivo gerar células bovinas pluripotentes através da reprogramação direta e utilizá-las na transferência de núcleo para a produção animal visando o aumento da eficiência da reprogramação celular. Para tal, foi analisada a capacidade de indução e manutenção da pluripotência em células somáticas bovinas comparando-as com células humanas e equinas (células pluripotentes induzidas - iPSC), assim como a capacidade de desenvolvimento de embriões produzidos através da combinação das técnicas em bovinos. As células iPS derivadas neste estudo foram produzidas mediante transdução lentiviral de fatores de transcrição (OSKM) murinos, caracterizadas e utilizadas como doadoras de núcleo na clonagem. Resumidamente, oócitos bovinos obtidos de ovários provenientes de abatedouros foram maturados *in vitro* por 18h, enucleados e reconstruídos com células iPS (n=203 ou fibroblastos fetais bovinos (bFF, n=153), em cinco repetições. Após reconstrução os embriões foram ativados com ionomicina e 6-DMAP e cultivados *in vitro* até o estágio de blastocisto.

Foram avaliadas as taxas de fusão, clivagem (48h após ativação) e desenvolvimento a blastocisto (192h após ativação) e os resultados foram submetidos ao teste de Qui-quadrado a 5% de significância. Foi possível a produção de embriões a partir das biPS, entretanto, este estudo evidenciou a necessidade de otimização da sincronização do ciclo celular em células iPS. Não foram encontradas diferenças entre os grupos quanto à capacidade de produção a blastocisto ou clivagem, porém o grupo reconstruído com células iPS apresentou uma menor taxa de fusão. Com a finalidade de entender a influência de fatores de transcrição específicos na reprogramação nuclear, bFF expressando OCT4 humano (hOCT4) e hSOX2 combinados com as proteínas repórteres fluorescentes vexGFP e mCitrine, respectivamente, foram submetidos à separação celular por citometria de fluxo e utilizados como doadores de núcleo. Foram utilizados bFF expressando OCT4-vexGFP (n=182, quadruplicata), SOX2-mCitrine (n=203, quadruplicata) ou células controle (não transduzidas, n=178 e n=149, em quadruplicata para grupos OCT4 e SOX2, respectivamente). Não foram encontradas diferenças entre os grupos nas características de capacidade de desenvolvimento *in vitro* estudadas. Em conclusão, este estudo relata a possibilidade de produção de células bovinas reprogramadas, além de também mostrar que a transferência de núcleo utilizando células expressando hSOX2 ou hOCT4, ou já reprogramadas, resulta em taxas similares de produção embrionária quando comparadas à utilização de células controle. O conhecimento da contribuição de cada fator utilizado na reprogramação induzida, aliado a estudos de comparação com a capacidade de desenvolvimento *in vivo* de organismos derivados de células reprogramadas deverá contribuir para o aumento da eficiência da clonagem e produção animal *in vitro* como para a medicina regenerativa.

Palavras-chave: bovino, células pluripotentes induzidas (iPS), pluripotência, reprogramação celular, transferência de núcleo.

ABSTRACT

BRESSAN, F. F. **Generation of pluripotent cells through gene induction and nuclear transfer: a bovine model of pluripotency.** 133f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2013.

Nuclear transfer and induced reprogramming are technologies usually used for the induction of somatic cells into an embryonic-like pluripotent status. The knowledgment of nuclear reprogramming process is highly desirable, leading to important contributions for both basic and applied sciences; for example, resulting in the increase in the efficiency of several animal biotechnologies, or else enabling autologous cellular therapy for medical purposes. However, basic studies are still needed in order to enable such applications, once the mechanisms controlling *in vitro* reprogramming are yet to be unravelled. This study aims to generate induced pluripotent bovine stem cells through direct reprogramming and its use in nuclear transfer in order to enhance the cellular reprogramming efficiency. For that, the potential of pluripotency induction and maintenance was analysed in bovine somatic cells, comparing those with human and equine cells, as well as the potential of embryonic development after combining direct and nuclear reprogramming. iPS cells derived in this study were produced trought lentivirus transduction of mouse transcription factors (OSKM), further characterized and used as nuclei donors for cloning. In summary, bovine oocytes were obtained from slaughterhouse ovaries, *in vitro* matured for 18h, enucleated and reconstructed with iPS cells (n=203) or fetal fibroblasts (bFF, n=153), in five replicates. Embryos were reconstructed, chemically activated with ionomycin and 6-DMAP and cultured *in vitro* until blastocyst stage. Fusion, cleavage (48h post activation) and blastocyst developmental rates (192h post activation) were analysed and results submitted to Chi-square test at 5% significance. biPS enabled embryo production, however further optimization on cell cycle synchronization still needs to be accomplished. No difference was observed between groups regarding cleavage or blastocyst developmental rates, however iPS group presented a reduced fusion rate when compared to control. For a better understanding

on how reprogramming associated transcription factors could influence on nuclear reprogramming, bFF expressing human OCT4 (hOCT4) or hSOX2 combined with the fluorescent protein reporters vexGFP and mCitrine, respectively, were submitted to flow citometry cell sorting and used as nuclei donors. bFF expressing OCT4-vexGFP (n=182, quadruplicate), SOX2-mCitrine (n=203, quadruplicate) or control cells (non transduced, n=178 and n=149, in quadruplicate for OCT4 and SOX2, respectively) were used. No difference was observed between groups regarding the *in vitro* developmental potential rates. In conclusion, the present study reports the generation of reprogrammed bovine cells, and its use the nuclear transfer. Donor cells expressing hOCT4, hSOX2 or reprogrammed cells resulted in similar developmental *in vitro* rates when compared to controls. The knowledge of each reprogramming factor influence on *in vitro* reprogramming, together with comparison studies on *in vivo* developmental potential of organisms derived from reprogrammed cells should help enhancing not only the cloning efficiency and *in vitro* animal production, but also the regenerative medicine.

Key words: bovine, cellular reprogramming, induced pluripotent stem cells (iPS), nuclear transfer, pluripotency.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Esquema do curso temporal da reprogramação gênica induzida em cultivos celulares.....37

Figura 2: Mapa do vetor lentiviral EF1a-hSTEMCCA (OKSM). Figura adaptada do catálogo n. SCR544 (humano) e n.SCR518 (murino), Millipore……....39

Figura 3: Mapa dos vetores auxiliares para produção lentiviral de segunda geração. Figura adaptada. A: REV. B: VSVG. C: TAT. D: Hgpm2. ……40

Figura 4: Coleta de embriões murinos com 13,5 dias de gestação. A: embriões recuperados, dissecados do útero e placenta e lavados em PBS. B: Cabeça e membros retirados de embriões que serão submetidos à digestão enzimática com colagenase IV.....42

Figura 5: Células hAdMSC em diferentes períodos durante a reprogramação celular *in vitro*. A: 10 dias pós transdução. 100X. B: 15 dias pós-transdução. 200x. C e D: colônia iPS após repique manual, 40x e 200X, respectivamente……....50

Figura 6: Detecção da fosfatase alcalina em colônias de células iPS humanas derivadas de hAdMSC. A: hiPS1 p17. B: hiPS2 p21. C: hiPS3 p14. D: hiPS4 p20. E:. hiPS5 p20. 40X……...50

Figura 7: Procedimento para repique manual das células hiPS sob estereomicroscopia……
……..51

Figura 8: Expressão de OCT4 em linhagens hiPS quando comparadas à hAdMSC não modificada, em unidades arbitrárias……...52

Figura 9: Expressão de SOX2 em linhagens hiPS quando comparadas à hAdMSC não modificada, em unidades arbitrárias……...52

Figura 10: Expressão de NANOG em linhagens hiPS quando comparadas à hAdMSC não modificada, em unidades arbitrárias……...53

Figura 11: Formação de corpos embrioides antes do repique (A) e após cultivo em agarose (B, C e D). B: hiPS 2 p18. C: hiPS 3 p11. D: hiPS 4 p17. 100x……54

Figura 12: Diferentes tipos celulares encontrados no cultivo de corpos embrioides em gelatina após 9 dias em cultivo. Linhagem hiPS2. 200x……...55

Figura 13: Diferentes tipos celulares encontrados no cultivo de corpos embrioides em gelatina após 5 dias em cultivo. Linhagem hiPS3. 200x……...55

Figura 14: eAdMSC e eiPS. A: eAdMSC antes da transdução. 200x. B: eiPS. 40x. C eiPS. 200x……56

Figura 15: Células equinas sendo reprogramadas *in* vitro (p0) em diferentes condições de cultivo 6 dias após transdução. A: meio de cultivo padrão de iPS. B: meio de cultivo suplementado com LIF. C: meio de cultivo suplementado com 2i. D: meio de cultivo suplementado com LIF+2i. 200x……57

Figura 16: Detecção de fosfatase alcalina em eiPS. A: 40x. B: 200x……....57

Figura 17: Expressão de OCT4 em linhagens eiPS quando comparadas à eAdMSC não modificada, em unidades arbitrárias……..58

Figura 18: Expressão de SOX2 em linhagens eiPS quando comparadas à eAdMSC não modificada, em unidades arbitrárias……..59

Figura 19: Detecção da proteína OCT4 em eiPS. A e B: eiPS sobre MEFs em microscopia ótica e de fluorescência, respectivamente. 200x……59

Figura 20: Formação de corpos embrioides, linhagem eiPS7……..60

Figura 21: Diferenciação *in vitro* de células eiPS da linhagem eiPS7 após 3 dias (A) e 20 dias (B) em cultivo sobre gelatina. 200x……..61

Figura 22: Possíveis colônias de células reprogramadas bovinas após repique celular mecânico e enzimático com colagenase, respectivamente (A e B). 100x……..62

Figura 23: Cultivos de bFF com 16 dias após transdução com os vetores mSTEMCCA, hSTEMCCA ou ambos, em meio suplementado com 2i+LIF ou não. A: mSTEMCCA sem suplementação, 200x. B: mSTEMCCA com suplementação 2i+LIF, 200x. C: mSTEMCCA+hSTEMCCA sem suplementação, 200x. D: mSTEMCCA+hSTEMCCA com suplementação 2i+LIF, 200x. E: hSTEMCCA sem suplementação, 40x. F: hSTEMCCA com suplementação 2i+LIF, 40x.....64

Figura 24: Detecção de fosfatase alcalina em biPS. A: 40x. B: 200x……....65

Figura 25: Gráfico representando a expressão de OCT4 em linhagens biPS quando comparadas à bFF não modificada, em unidades arbitrárias……66

Figura 26: Expressão de SOX2 em linhagens biPS quando comparadas à bFF não modificada, em unidades arbitrárias……66

Figura 27: Detecção da proteína OCT4 em biPS. A e B: biPS2 sobre MEFs em microscopia ótica e de fluorescência, respectivamente. 200x……..67

Figura 28: Corpos embrioides cultivados por 48h. A: biPS 2. B: biPS 5. C: biPS 7. 200x……..67

Figura 29: Cultivo de corpos embrioides em gelatina após 5 dias. 200x……..68

Figura 30: Camundongos nude injetados com bFF (A) ou biPS após 30 (B) e 37 (C) dias……68

Figura 31: Mapa do vetor lentiviral FUGW que contém, além da região codificadora da eGFP (*enhanced* GFP), o promotor constitutivo para ubiquitina. Figura adaptada – Addgene, plasmídeo n. 14883.....77

Figura 32: Delineamento experimental utilizado para a sincronização das vacas receptoras. P4: implante de progesterona, BE: benzoato de estradiol, CLS: cloprostenol sódico, análogo sintético da prostaglandina F2α, US: ultrassonografia, T.E.: transferência de embriões.....81

Figura 33: Análise fluxo-citométrica do ciclo celular de células utilizadas como doadoras de núcleo. A: bFF sem restrição. B: bFF com 24h de restrição. C: bFF com 48h de restrição. D: biPS sem restrição. E: biPS com 24h de restrição. F: biPS com 48h de restrição. Vermelho: células G1, cinza: células na fase S, amarelo: células em G2.....86

Figura 34: biPSC cultivadas em MEF ou Matrigel em diferentes períodos de restrição de KSR. A: cultivo em MEFs sem restrição de KSR. B: cultivo em Matrigel por 24h sem restrição de KSR. C: cultivo em Matrigel por 48h e restrição de KSR por 24h. D: cultivo em Matrigel por 72h e restrição de KSR por 48h. 200x.....87

Figura 35: Expressão de OCT4 em linhagens biPS e bFF utilizadas como doadoras de núcleo (em restrição de soro por 24h) quando comparadas à bFF e bIPS não sincronizadas, em unidades arbitrárias.....88

Figura 36: Expressão de SOX2 em linhagens biPS e bFF utilizadas como doadoras de núcleo (em restrição de soro por 24h) quando comparadas à bFF não sincronizada, em unidades arbitrárias.....88

Figura 37: Porcentagens de fusão, clivagem e blastocistos no sétimo dia de cultivo produzidos através da transferência de núcleo de bFF ou células biPS.....89

Figura 38: Produção de células biPS expressando eGFP. A e B: células 293 FT após 24h de transfecção com o vetor FUGW. C e D: fibroblastos fetais bovinos utilizados como controle da transdução. E e F: células biPS expressando a eGFP. 200x.....90

Figura 39: Produção de embriões clones a partir de bFF ou biPS expressando eGFP. A e B: embriões clones reconstruídos com bFF sob luz branca e luz fluorescência, respectivamente. C e D: embriões clones reconstruídos com biPS2-GFP sob luz branca fluorescência, respectivamente. 200x.....91

Figura 40: Análise fluxo-citométrica das populações bFF (A e B) e iPS-GFP (C e D) apresentando a relação entre tamanho e complexidade celular (A e C) e fluorescência da eGFP (B e

D).....92

Figura 41: Porcentagens de fusão, clivagem e blastocistos no sétimo dia de cultivo produzidos através da transferência de núcleo de bFF ou células biPS-GFP.....92.

Figura 42: Blastocisto reconstituído a partir de pedaços de trofectoderma de embriões FIV e células biPS. 94

Figura 43: Mapa dos vetores lentivirais pLM-vexGFP-Oct4 (A) e pLM- mCitrine- Sox2 (B). Figura adaptada – Addgene, plasmídeos n. 22240 e n. 23242, respectivamente……102

Figura 44: Mapa dos vetores auxiliares para produção lentiviral de terceira geração. A: pLP1, contendo gag/pol. B: pLP2 contendo Rev. C: pLP/VSVG. Figura adaptada do catálogo *Virapower lentiviral kit* (Life Technologies).....103

Figura 45: Células 293FT em luz branca (A, C) e expostas à microscopia de fluorescência (B, D) após transfecção com os vetores Oct4-vexGFP ou Sox2-mCitrine, respectivamente. 200x.....103

Figura 46: Exemplo de linhagem de fibroblasto bovino utilizado como doador de núcleo na TNCS. A e B: fibroblastos não geneticamente modificados (grupo controle) em luz branca e fluorescência, respectivamente. C e D: fibroblastos expressando SOX2 (expressão do repórter mCitrine), em luz branca e fluorescência, respectivamente. 200X. 105

Figura 47: Análise fluxo-citométrica das linhagens estáveis expressando OCT4-vexGFP e SOX2-mCitrine utilizadas para o *sorting* das células doadoras de núcleo.....106

Figura 48: Expressão de bNANOG na linhagens bFF submetidas à TNCS quando comparadas à bFF não modificada, em unidades arbitrárias. Ctrl: linhagem não modificada, OCT4: linhagem expressando vexGFP e SOX2: linhagem expressando mCitrine.....109

Figura 49: Porcentagens de fusão, clivagem e embriões em oito células no segundo dia de cultivo e blastocistos no sétimo dia de cultivo produzidos através da transferência de núcleo de células modificadas ou não.....110

Figura 50: Embriões clonados a partir de linhagem de fibroblasto bovino utilizado como doador de núcleo na TNCS. A e B: embriões produzidos a partir de fibroblastos não geneticamente modificados em luz branca e fluorescência, respectivamente. C e D: embriões produzidos a partir de fibroblastos expressando SOX2 (expressão do repórter mCitrine), em luz branca e fluorescência, respectivamente. Aumento de 20X. Exposição à UV: 200ms.....110

Figura 51: Porcentagens de fusão, clivagem e embriões em oito células no segundo dia de cultivo e blastocistos no sétimo dia de cultivo produzidos através da transferência de núcleo de células modificadas ou não.....111

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados.....46

Tabela 2: Resumo das características encontradas na células iPS humanas, equinas e bovinas geradas neste estudo.....72

Tabela 3 - Sequenciamento de alelos específicos em células biPS e bFF utilizadas como doadoras de núcleo.....84

Tabela 4 - Porcentagens de células doadoras de núcleo em cada estágio do ciclo celular.....85

Tabela 5 - Diagnóstico de gestação de embriões clonados com células biPS ou bFF aos 30 e 55 dias de gestação.....93

Tabela 5 - Agregação de trofectoderma derivado por FIV com células biPS.....94

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO **16**

HIPÓTESES **20**

OBJETIVOS **21**

Objetivo geral **21**

Objetivos específicos **21**

CAPÍTULO 2: REVISÃO DE LITERATURA - INDUÇÃO E MANUTENÇÃO DA PLURIPOTÊNCIA CELULAR **23**

Resumo **23**

Reprogramação celular e pluripotência **24**

A tríade OCT4 – SOX2 - NANOG **27**

Reprogramação através da transferência de núcleo de célula somática **28**

Pluripotência geneticamente induzida **30**

Pluripotência através da associação da indução gênica e transferência nuclear **33**

CAPÍTULO 3: INDUÇÃO DA PLURIPOTÊNCIA CELULAR: MODELOS BOVINO, HUMANO E EQUINO **36**

INTRODUÇÃO **36**

DELINEAMENTO EXPERIMENTAL **37**

MATERIAL E MÉTODOS **37**

Obtenção de fibroblastos e células mesenquimais derivadas de tecido adiposo nas espécies bovina, equina e humana 38

Vetores 39

Produção de fibroblastos embrionários murinos para utilização de monocamadas celulares de suporte 41

Produção de partículas lentivirais 42

Transdução celular 43

Repique celular 43

Caracterização das células pluripotentes induzidas (iPSC) 44

RESULTADOS **49**

iPSC humanas 49

iPSC equinas 56

iPSC bovinas 61

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES PARCIAIS DO CAPÍTULO 3 ..... **69**

CAPÍTULO 4: CONTRIBUIÇÃO DAS BIPS EM ESTRATÉGIAS REPRODUTIVAS PARA A PRODUÇÃO DE INDIVÍDUOS GENETICAMENTE IDÊNTICOS *IN VITRO* **74**

INTRODUÇÃO **74**

MATERIAL E MÉTODOS **76**

Células doadoras de núcleo 76

Análise da expressão gênica de fatores relacionados à pluripotência 78

Transferência nuclear de célula somática 78
Análise da capacidade de desenvolvimento de embriões clonados com células reprogramadas bovinas in vivo 81
Reconstrução de blastocistos mediante agregação 82
RESULTADOS **84**
Células doadoras de núcleo 84
Análise do ciclo celular das células doadoras de núcleo 85
Análise da expressão gênica de fatores relacionados à pluripotência 87
Transferência Nuclear de Célula Somática 89
Análise da capacidade de desenvolvimento de embriões clonados com células reprogramadas bovinas in vivo 93
Reconstrução de blastocisto mediante agregação 93
DISCUSSÃO E CONCLUSÕES PARCIAIS DO CAPÍTULO 4 ..... **95**
CAPÍTULO 5: ESTUDO DA CONTRIBUIÇÃO DE FATORES RELACIONADOS À PLURIPOTÊNCIA NO DESENVOLVIMENTO *IN VITRO* DE EMBRIÕES BOVINOS **100**
INTRODUÇÃO **100**
MATERIAL E MÉTODOS **101**
Cultivo celular 101
Preparação dos vetores lentivirais 101
Produção das linhagens de fibroblastos estáveis para os fatores de transcrição 104
Extração de RNA e síntese e determinação da quantidade relativa de cDNA 106
Transferência Nuclear de Célula Somática 107
RESULTADOS **108**
Expressão de genes relacionados à pluripotência em células expressando fatores de pluripotência exógenos 108
Transferência nuclear utilizando linhagens expressando SOX2-mCitrine como doadoras de núcleo 109
Transferência nuclear utilizando linhagens expressando OCT4-vexGFP como doadoras de núcleo 111
DISCUSSÃO E CONCLUSÕES PARCIAIS DO CAPÍTULO 5 ..... **112**
CAPÍTULO 6: CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS **114**
REFERÊNCIAS **117**
ANEXOS **130**

CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO

CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO

A possibilidade de manipulação dos eventos de indução e manutenção da pluripotência celular é de extremo interesse uma vez que o estudo destes processos relacionados ao desenvolvimento embrionário inicial pode prover grandes contribuições tanto à sua possível utilização terapêutica quanto em esclarecimentos relacionados à remodelação de núcleo, comprometimento e diferenciação celular. Muito tem se estudado e revisado quanto às características de células pluripotentes derivadas de embriões de mamíferos e os eventuais problemas de sua utilização na rotina médica. Os mecanismos da sua manutenção *in vitro*, apesar de ser o foco de diversos estudos, ainda não são totalmente compreendidos.

Ao longo das últimas décadas, culturas de células-tronco embrionárias (CTEs) tem sido consideradas imprescindíveis para a terapia de doenças e enfermidades antes incuráveis, como por exemplo, doenças neurodegenerativas e lesões na medula espinhal devido a traumas graves. Infelizmente, algumas das características das CTEs que asseguram a sua pluripotência também podem levar a uma diferenciação descontrolada, resultando muitas vezes na ocorrência de tumores (WAKITANI et al., 2003; ARNHOLD et al., 2004; TERAMOTO et al., 2005). Portanto, seu uso em terapia médica humana e veterinária ainda é bastante controverso e desafiador.

A derivação de CTEs de animais mamíferos de grande porte permitiria o desenvolvimento de diversos modelos de estudos, e consequentemente, é altamente desejada. Porém, tais células, embora estudadas por diversos grupos de pesquisa ainda não apresentaram consistência quanto à manutenção do estado pluripotente *in vitro*, expressão de marcadores de pluripotência e também não produziram quimeras, uma das características críticas para provar sua capacidade de contribuição no desenvolvimento de um organismo viável (NOWAK-IMIALEK et al., 2011; MARUOTTI et al., 2012).

A reprogramação de células somáticas a um estado indiferenciado, similar à pluripotência embrionária, vem sendo realizada há tempos através da transferência de um núcleo somático a um oócito enucleado (técnica de transferência nuclear de célula somática, TNCS ou clonagem; (WILMUT et al., 1997). Na TNCS, uma célula é transferida

para o interior de um oócito previamente enucleado, o complexo citoplasto-célula é fusionado eletricamente e ativado quimicamente, promovendo a reprogramação do núcleo somático ao estado totipotente (MUNSIE et al., 2000; YANG et al., 2007).

Apesar de comprovadamente ser capaz de reprogramar um núcleo diferenciado, a técnica de TNCS é pouco eficiente. Não raramente, o núcleo a ser reprogramado falha na expressão de genes relacionados ao desenvolvimento inicial, assim como falha no estabelecimento de um padrão embrionário típico das modificações da cromatina (BIRD, 2002; BORTVIN et al., 2003; SANTOS; DEAN, 2004; EILERTSEN et al., 2007). Normalmente, menos de 5% dos embriões desenvolvem em animais adultos, sendo a reprogramação epigenética incompleta do núcleo a causa mais provável do baixo sucesso da técnica (BOURC'HIS et al., 2001; DEAN et al., 2001; RIDEOUT; EGGAN; JAENISCH, 2001; SANTOS et al., 2003). Fenótipos indesejáveis decorrentes da reprogramação imprópria são, dentre outros, a alta taxa de perdas gestacionais, a ocorrência da síndrome da cria gigante, alterações hepáticas e alterações respiratórias, entre outras (HILL et al., 1999; HEYMAN et al., 2002).

Aparentemente, a eficiência da clonagem é inversamente correlacionada com o grau de diferenciação da célula doadora de núcleo (GREEN; WELLS; OBACK, 2007). Procedimentos de TNCS com células embrionárias indiferenciadas (RIDEOUT et al., 2000; HUMPHERYS et al., 2001), e com células somáticas já comprometidas, como linfócitos (INOUE et al., 2005) e fibroblastos (GONG et al., 2004) mostraram que a utilização de células indiferenciadas resulta na maior eficiência da técnica (HIIRAGI; SOLTER, 2005), indicando que núcleos mais comprometidos são mais difíceis de obterem sucesso na reprogramação total proporcionada pela TNCS (WAKAYAMA et al., 1999; HUMPHERYS et al., 2001; WAKAYAMA; YANAGIMACHI, 2001; HOCHEDLINGER; JAENISCH, 2002; BLELLOCH et al., 2006). Portanto, para o aumento da eficiência da clonagem, é essencial a produção ou seleção de populações celulares que apresentem a propriedade intrínseca de serem, por algum motivo, mais facilmente reprogramáveis pelo citoplasma do oócito (SOLTER, 2000).

Mais recentemente, através de um experimento revolucionário, a reprogramação nuclear foi alcançada com a introdução e expressão de fatores de transcrição conhecidos na célula somática (TAKAHASHI; YAMANAKA, 2006). Takahashi e Yamanaka mostraram, em 2006 em camundongos, e em 2007 em humanos, que a expressão de somente quatro fatores de transcrição, OCT3/4, SOX2, KLF4 e C-MYC (representados pela sigla OSKM), é

suficiente para que fibroblastos sejam induzidos à pluripotência. Tais células foram denominadas células-tronco pluripotentes induzidas (do inglês *induced pluripotent stem cell*, iPS) por possuírem características das células-tronco embrionárias, incluindo uma alta taxa de replicação e a habilidade de formar uma grande variedade de tecidos provenientes das três camadas germinativas tanto *in vitro* quanto *in vivo* (TAKAHASHI; YAMANAKA, 2006).

O advento da indução da pluripotência através da super expressão de fatores de transcrição conhecidos mostrou que a produção de células-tronco pluripotentes induzidas (células iPS, ou IPSC) é possível mesmo em animais domésticos (ESTEBAN et al., 2009; EZASHI et al., 2009; BAO et al., 2011; SUMER et al., 2011) e, além disso, parece seguir padrões similares a humanos quando comparados a camundongos.

É conhecido hoje que os fatores OCT4, SOX2 e NANOG são essenciais, porém não os únicos a atuarem na regulação do estado de pluripotência encontrado nas células embrionárias. Uma rede interligada de genes regulatórios é responsável pelo desenvolvimento ou manutenção da pluripotência em embriões, porém, os componentes desta trama ainda não são totalmente conhecidos. A maneira pela qual estas proteínas trabalham em conjunto, também, é ainda desconhecida. Aparentemente, elas interagem com fatores de remodelação da cromatina e enzimas modificadoras de histonas para a modulação da conformação da cromatina, o que teria por consequência a modulação também da expressão gênica (CHEN; DALEY, 2008).

Um melhor entendimento da contribuição de cada fator reprogramador, assim como uma caracterização mais profunda de cada passo da reprogramação realizada nos embriões clonados e nas células iPS é necessário para que a natureza molecular da reprogramação nuclear seja esclarecida.

O modelo bovino traz grandes benefícios quando utilizado neste contexto. A caracterização de células similares a células-tronco embrionárias (*stem-cells like*) nesta espécie, apesar de já ter sido reportada ainda não é bem elucidada, de modo que diversos grupos de pesquisa relatam caracterizações diferentes (ROACH et al., 2006). Por outro lado, a espécie bovina apresenta taxa relativamente boa de desenvolvimento *in vivo* quando comparada a outras espécies após a técnica de transferência de núcleo, com centenas de animais produzidos a termo (HEYMAN, 2005). Desta maneira, o modelo bovino provê um modelo adequado para o entendimento acerca da reprogramação realizada pelo citoplasma ou por fatores específicos.

Nesse sentido, este trabalho propõe, em um primeiro momento, a geração de células pluripotentes bovinas através da indução gênica utilizando fatores de transcrição interespecíficos. A associação desta técnica com a transferência de núcleo através da utilização de células-tronco pluripotentes induzidas bovinas como doadoras de núcleo deverá contribuir tanto para a produção animal *in vitro*, principalmente visando o aumento da eficiência da técnica de clonagem quanto à produção animal a termo, como para a medicina regenerativa, através da obtenção de uma maior conhecimento sobre a derivação e cultivo adequado de células-tronco reprogramadas. Além disso, o estudo do efeito de fatores relacionados à pluripotência durante a reprogramação de núcleo bovina é importante para o entendimento da aquisição e manutenção da pluripotência nesta espécie, abrindo novas possibilidades de estudos básicos e aplicados.

HIPÓTESES

1. A indução da pluripotência celular *in vitro*, assim como a manutenção de seu estado indiferenciado, é possível na espécie bovina através da expressão exógena de fatores de transcrição interespecíficos conhecidos.

2. Células bovinas reprogramadas *in vitro* são capazes de gerar embriões geneticamente idênticos capazes e manter seu desenvolvimento embrionário inicial.

3. A associação da reprogramação direta induzida com a TNCS, ou seja, a utilização das células expressando fatores de transcrição relacionados à pluripotência como doadoras de núcleo leva a uma maior eficiência de produção de blastocistos quando comparada a outras biotecnologias de produção embrionária *in vitro* e uma maior capacidade de manutenção do desenvolvimento *in vivo* no período inicial da gestação, indícios de uma melhor reprogramação nuclear.

OBJETIVOS

Objetivo geral

- Obter células bovinas pluripotentes através da tecnologia de reprogramação induzida geneticamente *in vitro* e embriões derivados destas mediante transferência de núcleo.

Objetivos específicos

- Estabelecer uma linhagem celular pluripotente geneticamente induzida de células-tronco bovinas (biPS).

- Comparar a eficiência de reprogramação de núcleo geneticamente induzido à pluripotência *in vitro* quando utilizado na transferência de núcleo com o grupo não induzido à pluripotência através da capacidade de desenvolvimento embrionário *in vitro* e manutenção inicial da gestação.

- Estudar ao efeito da expressão exógena de fatores de transcrição conhecidos relacionados à pluripotência em células doadoras de núcleo quando submetidas à reprogramação nuclear por transferência de núcleo.

CAPÍTULO 2: REVISÃO DE LITERATURA

CAPÍTULO 2: REVISÃO DE LITERATURA - INDUÇÃO E MANUTENÇÃO DA PLURIPOTÊNCIA CELULAR

Resumo

O entendimento dos processos de reprogramação nuclear traz importantes contribuições tanto no estudo das ciências aplicadas como básicas, como por exemplo, com a possibilidade de terapia celular autóloga para o tratamento de inúmeras enfermidades, no aumento da eficiência das biotécnicas de produção animal ou mesmo na geração de gametas funcionais *in vitro*. Estratégias como a transferência nuclear e a reprogramação induzida vêm sendo empregadas com o objetivo de induzir células somáticas a um estado pluripotente similar ao embrionário.

Estudos sobre reprogramação, diferenciação e proliferação celular têm revelado que diversos fatores de transcrição atuam sinergicamente promovendo o comprometimento celular ou, por outro lado, a pluripotência. Os mecanismos de indução à pluripotência, seja através da expressão de fatores de transcrição relacionados à pluripotência, ou então, à transferência nuclear, parecem ser mediados pelas mesmas vias de sinalização observadas na fertilização, envolvendo o remodelamento nuclear e modulando a expressão gênica. Porém, uma conformação anormal da cromatina, frequentemente levando a erros de *imprinting* e expressão gênica alterada são frequentemente observados na reprogramação *in vitro* (KANG et al., 2001; ONO et al., 2001). Estratégias utilizadas com a finalidade de facilitar tal remodelamento nuclear, como por exemplo, a utilização de agentes modificadores de cromatina no cultivo *in vitro* de células ou embriões, mostrou-se capaz de favorecer a regulação transcricional e promover a reprogramação.

A combinação das técnicas de reprogramação por indução gênica ou transferência nuclear pode ser uma maneira de explorar os mecanismos de expressão

gênica responsáveis pela pluripotência induzida. Um melhor entendimento sobre a contribuição de cada fator reprogramador utilizado na indução à pluripotência pode resultar no estabelecimento de estratégias que aumentem a eficiência da reprogramação *in vitro*. Tal entendimento poderá contribuir tanto para a produção animal *in vitro*, em especial pelo aumento da eficiência da técnica de clonagem, como também para a medicina regenerativa, através da derivação e cultivo adequado das células-tronco embrionárias reprogramadas.

Reprogramação celular e pluripotência

Em mamíferos, o período inicial do desenvolvimento embrionário é marcado pela indução à totipotência, por sua vez caracterizada pela reprogramação dos núcleos derivados dos gametas masculino e feminino a um estado indiferenciado, resultando na formação do zigoto e início do desenvolvimento embrionário. Inicialmente, o processo de desenvolvimento leva à diferenciação das células embrionárias em duas linhagens celulares, a massa celular interna e o trofoblasto, que podem ser visualmente identificadas no estádio embrionário de blastocisto.

O trofoblasto origina os tecidos extra-embrionários, enquanto que as células que compõe a massa celular interna, classificadas como células pluripotentes, possuem a capacidade de se diferenciarem em qualquer uma das três camadas germinativas: a endoderme, a mesoderme e a ectoderme, que por sua vez, dão origem ao mais de 200 tipos celulares diferentes componentes de fetos e organismos adultos (ROSSANT, 2001; NAFEE et al., 2008; OHGANE; YAGI; SHIOTA, 2008). Uma vez que sabidamente não há modificações genéticas envolvidas nos eventos de determinação do desenvolvimento e diferenciação celular, tais eventos hereditários são dependentes de modificações epigenéticas que controlam a expressão de genes específicos (MANN; BARTOLOMEI, 2002; BEISEL; PARO, 2009).

O suíno, o bovino e o ovino são exemplos de importantes modelos de estudo pré-clínicos de animais de grande porte para testar o potencial clínico de terapias com

células-tronco devido à sua semelhança morfológica e fisiológica com os humanos (KUES; NIEMANN, 2004; BREVINI et al., 2008). A espécie bovina, em especial, apresenta grande importância econômica. A geração de células pluripotentes, ainda não descritas quando derivadas de embriões, permitirá a realização de manipulações genéticas precisas, abrindo novas possibilidades para aplicações biomédicas e também agropecuárias.

Notoriamente, a propriedade de reprogramação do oócito não é restrita aos núcleos germinais. O nascimento da ovelha Dolly, o primeiro mamífero viável produzido através da TNCS (WILMUT et al., 1997), provou a capacidade do oócito de reprogramar núcleos altamente diferenciados a um estado totipotente, revertendo assim seu estado de diferenciação e possibilitando o desenvolvimento a termo de animais viáveis. Desta maneira, a reprogramação de células diferenciadas em células embrionárias pluripotentes através da TNCS foi realizada com sucesso em diversas espécies, inclusive a humana (FRENCH et al., 2008). Além disso, diversos animais de produção, companhia e de laboratório já foram produzidos a termo com sucesso, como por exemplo, bovinos, bubalinos, caprinos, ovinos, suínos, equídeos, coelhos, camundongos, ratos, furões, e carnívoros como felinos (gatos), caninos e lobos (CIBELLI, J. B. et al., 1998; KATO et al., 1998; WAKAYAMA et al., 1998; BAGUISI et al., 1999; POLEJAEVA et al., 2000; KIM, M. K. et al., 2007; SHI et al., 2007).

Sabe-se que a reprogramação proporcionada pelos fatores de indução leva à remodelação da cromatina e, consequentemente, à modificação da expressão gênica, resultando em um estado similar àquele apresentado pelas células-tronco embrionárias. A questão principal levantada pela reprogramação induzida é o modo pelo qual os fatores de reprogramação realizam tais mudanças (SRIDHARAN et al., 2009). Essa questão se estende à reprogramação realizada pelo citoplasma do oócito durante a técnica de TNCS ou pelo citoplasma das células-tronco embrionárias após fusão celular (COWAN et al., 2005). Sabe-se que o processo de derivação e cultivo de células-tronco a partir de blastocistos produzidos por TNCS seleciona células embrionárias por multiplicação *in vitro* que tiveram a memória epigenética da célula somática doadora de núcleo apagada, ao contrário do desenvolvimento embrionário de clones. De fato, blastocistos clonados já se mostraram capazes de derivar células-tronco embrionárias de camundongos (MARKOULAKI; MEISSNER; JAENISCH, 2008), primatas não humanos

(BYRNE et al., 2007) ou células semelhantes às células-tronco, como por exemplo, de bovinos (TALBOT et al., 2007) e coelhos (FANG et al., 2006). Acredita-se que as células embrionárias isoladas de blastocistos clonados, depois de cultivadas *in vitro*, podem ser funcionalmente indistinguíveis das células embrionárias isoladas de embriões fertilizados (BRAMBRINK et al., 2006; DING et al., 2009).

Em um estudo recente, MARUOTTI et al. (2012) demonstraram que células bovinas pluripotentes derivadas de embriões em estágio de alongamento (células tronco do epiblasto, ou epiSCs) apresentam algumas vias de pluripotência ativas (*Nodal/Activin* e *FGF*), assim como epiSC de camundongos e suínos. Porém, a manutenção da pluripotência destas células bovinas *in vitro* não foi possível, indicando que as condições utilizadas nas duas espécies não são suficientes para a manutenção de células pluripotentes bovinas.

Diversos grupos publicaram desde então centenas de trabalhos confirmando a repetibilidade da indução de pluripotência em células somáticas murinas e humanas através da transdução dos mesmos com vetores virais expressando a combinação dos genes OSKM (TAKAHASHI; YAMANAKA, 2006; OKITA; ICHISAKA; YAMANAKA, 2007; TAKAHASHI et al., 2007; WERNIG et al., 2007; PARK et al., 2008), expressando os genes OCT3/4, SOX2, NANOG e LIN28 (YU et al., 2007), ou expressando somente alguns destes fatores, como OCT3/4, SOX2 e KLF4 (NAKAGAWA et al., 2008) ou somente OCT3/4 e KLF4 (KIM, J. B. et al., 2008) ou OCT3/4 e SOX2 (HUANGFU et al., 2008), entre outras combinações e modificações. Atualmente já foram produzidas iPS de diversas espécies, sendo exemplo: humana, camundongo (TAKAHASHI; YAMANAKA, 2006; TAKAHASHI et al., 2007), macaco-rhesus (LIU, H. et al., 2008), suínos (ESTEBAN et al., 2009), bovinos (SUMER et al., 2011) e mesmo espécies silvestres (BEN-NUN et al., 2011). A combinação de fatores de transcrição, apesar de comprovadamente ser capaz de reprogramar células já diferenciadas em células semelhantes a células-tronco embrionárias, não torna as células totalmente indistinguíveis das células-tronco embrionárias não induzidas.

Investigações quanto aos mecanismos moleculares e celulares devem revelar ferramentas necessárias tanto para propósitos terapêuticos, com a manutenção da pluripotência e a diferenciação controlada das células-tronco embrionárias quanto para o alcance de uma melhor capacidade de desenvolvimento embrionário e fetal após a

TNCS em animais de produção.

A tríade OCT4 – SOX2 - NANOG

O aumento da eficiência e do controle na reprogramação nuclear é desejável não somente no aspecto médico, por possibilitar a geração e o isolamento de células-tronco autólogas a serem utilizadas em terapias celulares específicas para cada paciente, mas também para produção animal, sendo tal controle indispensável ao sucesso de biotecnologias reprodutivas (*assisted reproductive technologies – ARTs*). Diversos estudos e revisões empenham-se em dissecar os mecanismos moleculares envolvidos na pluripotência celular (LIU, N. et al., 2007; CHEN; DALEY, 2008; JOHNSON et al., 2008; PLATH; LOWRY, 2011), porém, o mecanismo exato pelo qual a reprogramação celular ocorre ainda não é totalmente conhecido.

Experimentos iniciais sobre os mecanismos da diferenciação e a reprogramação celular mostraram que células pluripotentes expressam um conjunto de fatores responsáveis pelo estado de indiferenciação ou pluripotência. Dois fatores de transcrição, o OCT4 e o NANOG, foram os primeiros a serem identificados como essenciais para o desenvolvimento embrionário inicial e para a manutenção da pluripotência de células-tronco (NICHOLS et al., 1998; MITSUI et al., 2003). Foi mostrado também que o SOX2, outro fator de transcrição, heterodimeriza com o OCT4, atuando na regulação de diversos genes em células pluripotentes (BOYER et al., 2005). É conhecido hoje que os fatores OCT4, SOX2 e NANOG são essenciais, porém não os únicos a atuarem na regulação do estado de pluripotência encontrado nas células embrionárias. Além da tríade OCT4, SOX2 e NANOG, muitos outros fatores relacionados à pluripotência foram identificados, como por exemplo, SALL4, DAX1, ESSRB, TBX3, TCL1, RIF1, NAC1, dentre outros (IVANOVA et al., 2006; LOH et al., 2006). Uma rede interligada de genes regulatórios é responsável pelo desenvolvimento ou manutenção da pluripotência em embriões de maneira complexa e provavelmente espécie-dependente (BERG et al., 2011). Mesmo nas células primordiais germinativas, muitos genes relacionados à pluripotência nas células embrionárias são expressos, como por exemplo, *OCT4*, *SOX2* e *NANOG*, dentre outros, sendo que a expressão de tais genes é diminuída conforme a

diferenciação das células gonadais (PESCE; SCHOLER, 2000; AVILION et al., 2003; NETTERSHEIM et al., 2011).

Além de tais fatores de transcrição ligarem-se em seus sítios-alvo de DNA, as proteínas interagem entre si e também com fatores de remodelação da cromatina e enzimas capazes de regular modificações nas histonas para a modulação da conformação da cromatina, o que teria por consequência, a modulação também da expressão gênica (CHEN; DALEY, 2008), revisado por Whitworth e Prather, em 2010.

Sabe-se que o fator de transcrição NANOG é de extrema importância na manutenção da pluripotência e reprogramação do epigenoma de células somáticas, juntando-se aos fatores OCT4 e SOX2. Suas funções são definidas em humanos e camundongos, mas pouco ainda se sabe sobre sua regulação nas outras espécies, e talvez seja importante na aquisição da pluripotência bovina (SUMER et al., 2011).

É cada vez mais claro que a regulação transcricional é um mecanismo essencial na diferenciação, na indiferenciação ou na manutenção da pluripotência. Ele atua nos processos naturais ou induzidos de reprogramação, como por exemplo, na fertilização de um oócito por um espermatozoide, na reprogramação celular proporcionada pelo citoplasma na TNCS (MUNSIE et al., 2000; WAKAYAMA; YANAGIMACHI, 2001), na fusão entre células-tronco e células somáticas (COWAN et al., 2005; TADA; TADA, 2006) e na reprogramação direta induzida (TAKAHASHI; YAMANAKA, 2006; OKITA; ICHISAKA; YAMANAKA, 2007).

Reprogramação através da transferência de núcleo de célula somática

Há muito tempo têm-se procurado quais fatores determinam a habilidade do citoplasma oocitário em reprogramar núcleos de células somáticas. Os primeiros experimentos com transferência nuclear datam de mais de 50 anos, quando a injeção de células embrionárias ou em estágios mais diferenciados em oócitos enucleados de

anfíbios resultou no desenvolvimento de embriões ou mesmo indivíduos adultos, respectivamente (BRIGGS; KING, 1952; GURDON; ELSDALE; FISCHBERG, 1958).

Notoriamente, a propriedade de reprogramação do oócito não é restrita aos núcleos embrionários. O nascimento da ovelha Dolly, o primeiro mamífero viável produzido através da TNCS (WILMUT et al., 1997) provou a capacidade do oócito de reprogramar núcleos altamente diferenciados a um estado totipotente, revertendo assim seu estado de diferenciação e possibilitando o desenvolvimento a termo de animais viáveis.

A reprogramação de células diferenciadas em células embrionárias pluripotentes através da TNCS já foi realizada com sucesso em diversas espécies, inclusive em humanos (FRENCH et al., 2008). Além disso, diversos animais de produção, de companhia e de laboratório já foram clonados, tais como: bovinos, bubalinos, caprinos, ovinos, suínos, equídeos, coelhos, camundongos, ratos, furões, camelos e carnívoros como felinos (gatos), caninos e lobos (CIBELLI, J. B. et al., 1998; KATO et al., 1998; WAKAYAMA et al., 1998; BAGUISI et al., 1999; POLEJAEVA et al., 2000; KIM, M. K. et al., 2007; SHI et al., 2007; WANI et al., 2010).

Apesar de comprovadamente ser capaz de reprogramar um núcleo diferenciado, a técnica de TNCS é ainda ineficiente. Normalmente, menos de 5% dos embriões produzidos geram animais adultos saudáveis (WILMUT, 2002; CIBELLI, J., 2007b). Vários estudos têm demonstrado falhas na reprogramação nuclear em embriões clonados (BOURC'HIS et al., 2001; DEAN et al., 2001; RIDEOUT; EGGAN; JAENISCH, 2001; SANTOS et al., 2003) que levam a alterações tais como disfunções placentárias, síndrome da cria gigante, distúrbios hepáticos e respiratórios, entre outros (HILL et al., 1999; HEYMAN et al., 2002; MEIRELLES et al., 2010).

Na formação de células pluripotentes após fertilização normal, observa-se desmetilação independente das cromatinas oriunda do gameta masculino e feminino. O genoma paternal é ativamente desmetilado, provavelmente através de oxidação da 5-metilcitosina e posterior substituição por citosina não metilada (IQBAL et al., 2011), enquanto que o genoma maternal é passivamente desmetilado durante as primeiras clivagens embrionárias. Estes processos são seguidos pela *de novo* metilação, essencial para o estabelecimento dos padrões embrionários de expressão gênica, pela inativação do cromossomo X e pela manutenção do *imprinting* genômico estabelecido nas linhagens

germinativas, resultando em um desenvolvimento embrionário normal (SURANI, 1998; NG; BIRD, 1999).

Já nos embriões derivados da TNCS, não raramente o remodelamento do padrão global de metilação da cromatina, chamado remodelamento nuclear, é incompleto, e o núcleo falha no restabelecimento de um padrão embrionário típico das modificações da cromatina, resultando em padrões anormais de expressão de genes relacionados ao desenvolvimento inicial (BIRD, 2002; BORTVIN et al., 2003; SANTOS; DEAN, 2004; EILERTSEN et al., 2007; WHITWORTH; PRATHER, 2010). Os embriões clonados bovinos parecem apresentar uma desmetilação incompleta, seguida de uma *de novo* metilação precoce (YANG et al., 2007). Desta maneira a reprogramação da metilação global em embriões clonados é diferente dos embriões produzidos *in vivo*. O padrão dos embriões clonados, por parecer ser mais similar àquele de células somáticas, indica que embriões clonados sofrem apenas uma remodelação parcial do genoma somático (BOURC'HIS et al., 2001; DEAN et al., 2001; MANN; BARTOLOMEI, 2002; BONK et al., 2007). Tal padrão anormal de metilação é associado com a perda da expressão monoalélica de genes *imprinted*, comprometendo o desenvolvimento, crescimento embrionário e função placentária normais destes embriões (LUCIFERO et al., 2006; SUZUKI et al., 2011).

Pluripotência geneticamente induzida

Em 2006 foi estabelecida a técnica de pluripotência induzida pela incorporação de fatores de transcrição conhecidos no genoma de células somáticas de humanos e camundongos. Takahashi e Yamanaka mostraram que a expressão de somente quatro fatores de transcrição, OCT3/4, SOX2, KLF4 e C-MYC (representados pela sigla OSKM), é suficiente para que fibroblastos sejam induzidos à pluripotência. As células induzidas à pluripotência (*induced pluripotent stem cells – iPSC*) mostraram possuir grande parte das características das células-tronco embrionárias, incluindo uma alta taxa de crescimento e a habilidade de formar uma grande variedade de tecidos provenientes das três

camadas germinativas tanto *in vitro* quanto *in vivo* (TAKAHASHI; YAMANAKA, 2006).

Diversos grupos publicaram desde então centenas de trabalhos confirmando a repetibilidade da indução de pluripotência em células somáticas murinas e humanas, e mais recentemente em ratos, coelhos, cães, suínos, primatas não humanos, ovinos e bovinos, através da expressão dos mesmos fatores OSKM, em diferentes combinações, além de *NANOG, LIN28* e *TCL-1A,* genes que compõe a rede interligada da pluripotência embrionária, como descrito anteriormente (TAKAHASHI; YAMANAKA, 2006; OKITA; ICHISAKA; YAMANAKA, 2007; TAKAHASHI et al., 2007; WERNIG et al., 2007; YU et al., 2007; HUANGFU et al., 2008; KIM, J. B. et al., 2008; LIU, H. et al., 2008; NAKAGAWA et al., 2008; PARK et al., 2008; ESTEBAN et al., 2009; WU et al., 2009; HONDA et al., 2010; BAO et al., 2011; HAN, J. W.; YOON, 2011; LI, Y. et al., 2011; PICANCO-CASTRO et al., 2011; SUMER et al., 2011).

É interessante ressaltar que em algumas das espécies em que as iPSC já foram reportadas e bem caracterizadas, células consideradas embrionárias verdadeiras ainda não tinham sido derivadas, como por exemplo, no caso dos bovinos, ovinos e equinos, seja por uma falta de padrão nas características encontradas em diversos estudos, ou por simplesmente não apresentarem as características utilizadas para classificação das células-tronco embrionárias (TELUGU; EZASHI; ROBERTS, 2010), razão pela qual são chamadas de semelhantes às células-tronco embrionárias (*stem cells-like*). Com o advento das iPSC fica evidente que apesar das peculiaridades de cada espécie, os mecanismos principais de pluripotência nos mamíferos seguem um padrão similar.

Células iPS são bastante promissoras para o estudo e terapia de doenças humanas (PARK et al., 2008) por serem bastante similares às células-tronco embrionárias quanto à habilidade de auto-renovação e de originar tecidos das três camadas germinativas. Porém, seu uso clínico ainda é limitado por diversos fatores, incluindo a baixa eficiência de reprogramação e pelas alterações genômicas decorrentes da integração viral. A produção destas células ainda precisa ser aprimorada para que a aplicação terapêutica de células induzidas à indiferenciação pela modificação genética possa ser praticada sem restrições (LIU, N. et al., 2007). Por outro lado, as iPSC já se mostraram um modelo único de estudo dos mecanismos da reprogramação genética à pluripotência e diferenciação e comprometimento celular, classicamente representados pelo modelo de potencial de desenvolvimento de C. H. Waddington (*epigenetic lanscape model*) (WADDINGTON,

1957; HOCHEDLINGER; PLATH, 2009).

A indução da pluripotência sem a integração de transgenes no genoma de iPSC humanas e de camundongos foi realizada através da transfecção contínua de vetores que não promovem a integração do cDNA dos fatores OSKM no genoma celular, por exemplo, utilizando adenovírus não-integrativos (STADTFELD et al., 2008), e plasmídeos de expressão ou epissomais (OKITA et al., 2008; YU et al., 2009). Estratégias mais recentes como a utilização de mRNAs ou proteínas também se mostraram eficientes (CHO et al., 2010; LI, Z. et al., 2011), representando um avanço importante em direção da utilização destas células na terapia celular. Estas estratégias ainda são menos eficientes do que quando comparadas à integração lentiviral.

A eficiência de geração de células totalmente pluripotentes através da indução gênica é normalmente menor àquela relativa à transferência nuclear de células somática, ficando ao redor de 0,01 a 0,1%, contra menos de 5% para a TNCS (HOCHEDLINGER; PLATH, 2009). A análise da expressão gênica por microarranjos mostrou que o padrão de expressão global de genes nas células iPS é mais similar àquele das células-tronco embrionárias (CTEs) do que àquele dos fibroblastos, mas mesmo assim as diferenças entre iPSC e CTEs são notáveis (TAKAHASHI; YAMANAKA, 2006; ZHAO, R.; DALEY, 2008).

Do mesmo modo que grande parte da baixa eficiência é acreditada à falha na reprogramação epigenética do núcleo doador da TNCS, não seria estranho se a reprogramação epigenética das iPSC não fosse igual ao normal. Já foram reportadas anormalidades na metilação de DNA de genes como *OCT3/4* e *NANOG*. Estudos sobre o *imprinting* destas células mostram que assim como nos embriões clones, um número significante de linhagens exibem uma expressão anormal de genes *imprinted*, como por exemplo, nos genes *H19*, *IGF2R, PEG3* e *MEG3*, dentre outros (MAHERALI et al., 2007; OKITA; ICHISAKA; YAMANAKA, 2007; PICK et al., 2009). Apesar disto, já foi demonstrada a capacidade destas células em produzirem camundongos a termo (ZHAO, X. Y. et al., 2009) assim como na TNCS.

O estado "parcialmente reprogramado" foi reportado e caracterizado nas iPSC. Chan e colaboradores, em 2009, observaram que a expressão de marcadores comumente utilizados na caraterização das células-tronco como: fosfatase alcalina, SSEA-4, GDF3, hTERT e NANOG, não distingue colônias parcialmente ou totalmente reprogramadas. Já

o silenciamento dos transgene, assim como a expressão de TRA-1-60, DNMT3B e REX1 são encontrados nas colônias consideradas verdadeiras (CHAN et al., 2009).

O tratamento de tais populações parcialmente reprogramadas com agentes inibidores de cascatas sinalizadoras, como por exemplo, da ERK (*extracelular signal-related kinase*) e da GSK3 (*glycogen synthase kinase 3*), facilita a conversão das colônias parcialmente reprogramadas em totalmente reprogramadas (SILVA et al., 2008; YING et al., 2008).

De maneira interessante, a utilização de inibidores e agentes modificadores de cromatina (AMCs) parece ser favorável à derivação de iPSC nas espécies cujas CTEs ainda não são reportadas como verdadeiras. Dois exemplos interessantes são o rato e o bovino, uma vez que os mesmos agentes facilitadores da indução à pluripotência talvez exerçam funções favoráveis à transferência de núcleo, tornando-se modelos aliados ao estudo da reprogramação ou mesmo aumentando os índices de sucesso da técnica, objetivando seu uso rotineiro na produção animal. Em ratos, a derivação de CTEs consideradas verdadeiras não tinha sido reportada até 2008 (BUEHR et al., 2008; LI et al., 2008), quando a utilização de combinações de inibidores de receptor de FGF, da ativação da MEK (MEK*i*) e da GSK3 (GSK3*i*, chamados de 3i), ou somente MEK*i* e GSK3*i* (chamados 2i) possibilitou tal realização. A partir destes experimentos, a utilização destes e outros compostos tem sido bastante promissora na derivação de iPSC de espécies não convencionais (NAGY et al., 2011).

Pluripotência através da associação da indução gênica e transferência nuclear

Sabe-se que a reprogramação proporcionada pelos fatores de indução à pluripotência leva à remodelação da cromatina e, consequentemente, à modificação da expressão gênica, resultando em um estado similar àquele apresentado pelas células-tronco embrionárias. A questão principal levantada pela reprogramação induzida é o modo pelo qual os fatores de reprogramação realizam tais mudanças (SRIDHARAN et al.,

2009). Essa questão se estende à reprogramação realizada pelo citoplasma do oócito durante a técnica de TNCS ou pelo citoplasma das células-tronco embrionárias após fusão celular (COWAN et al., 2005).

Um melhor entendimento da contribuição de cada fator de transcrição atuante na reprogramação, assim como uma caracterização mais profunda de cada passo da reprogramação realizada nos embriões clonados e nas iPSC são necessários para que a natureza molecular da reprogramação nuclear seja esclarecida.

O modelo bovino traz grandes benefícios quando utilizado neste contexto. A caracterização de células-tronco embrionárias nesta espécie, apesar de já reportada, ainda necessita de estudos mais profundos para permitir uma maior repetibilidade, uma vez que diversos grupos de pesquisa relatam caracterizações diferentes (GJORRET; MADDOX-HYTTEL, 2005; WANG et al., 2005; ROACH et al., 2006; MUNOZ et al., 2008). Por outro lado, a produção de células iPS em bovinos foi recentemente reportada (HAN, X. et al., 2011; SUMER et al., 2011). Além disso, a espécie bovina já reportou o desenvolvimento *in vivo* após a técnica de transferência de núcleo, com milhares de animais produzidos a termo. Desta maneira, o modelo bovino provê uma possibilidade de favorecer um melhor entendimento acerca da reprogramação realizada pelo citoplasma ou por fatores específicos.

A pluripotência induzida e a transferência nuclear devem trabalhar em conjunto desmascarando as deficiências de ambas as técnicas. De um lado, se os mecanismos da reprogramação nuclear através de oócitos vierem a ser entendidos, tais informações serão utilizadas para aumentar a eficiência de conversão de fibroblastos em iPSC. Por outro lado, os mecanismos de expressão gênica pelos quais a indução da pluripotência ocorre podem ser dissecados a ponto de serem repetidos em experimentos de transferência nuclear. Além disso, as próprias células iPS são provavelmente o próximo passo para a clonagem, se o conceito de facilidade em reprogramar células mais reprogramáveis manter-se válido.

CAPÍTULO 3: INDUÇÃO DA PLURIPOTÊNCIA CELULAR *IN VITRO* – MODELOS BOVINO, HUMANO E EQUINO

CAPÍTULO 3: INDUÇÃO DA PLURIPOTÊNCIA CELULAR: MODELOS BOVINO, HUMANO E EQUINO

INTRODUÇÃO

Neste estudo objetivou-se de utilizar mecanismos de indução genica já conhecidos no modelo humano e murino visando a aquisição e manutenção da pluripotência na espécie bovina, também analisando o comportamento encontrado em outro modelo animal, o equino. A geração de células iPS humanas foi realizada uma vez que a obtenção e caracterização destas já é bastante conhecida e explorada, tornando-se um bom controle para os procedimentos de obtenção e cultivo de células iPS. O modelo equino torna-se importante neste estudo pois, além apresentar as mesmas dificuldades de obtenção e manutenção do cultivo em estado pluripotente de células-tronco embrionárias bovinas, a geração de células iPS equinas através de um mecanismo interespecífico contribui na validação da reprogramação direta em bovinos.

O entendimento e caracterização da aquisição e manutenção da pluripotência e reprogramação nuclear em bovinos possibilitará não somente a otimização de diversas biotécnicas da reprodução, como também o desenvolvimento de bovinos geneticamente modificados que poderão ser utilizados como modelos pré-clínicos de terapias celulares e gênicas.

MATERIAL E MÉTODOS

DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Neste estudo, células cultivadas *in vitro* bovinas, humanas ou equinas foram submetidas à reprogramação celular *in vitro* induzida segundo protocolo baseado na figura 1 e descrito a seguir.

Foi realizada a introdução de fatores relacionados à pluripotência em células cultivadas *in vitro* humanas (células mesenquimais derivadas de tecido adiposo - hAdMSC), equinas (células mesenquimais derivadas de tecido adiposo – eAdMSC) e bovinas (fibroblastos fetais –bFF).

Após aproximadamente 20 dias de indução *in vitro*, colônias quando presentes foram individualmente repicadas e cultivadas (linhagens clones de iPSC). A partir do segundo repique, as passagens foram realizadas semanalmente nas células humanas e a cada 3 a 5 dias nas células bovinas e equinas. Estas células foram cultivadas *in vitro* sob diferentes condições visando a otimização do cultivo; e aquelas reprogramadas (células iPS) foram caracterizadas quanto a morfologia, expressão de fosfatase alcalina, expressão gênica, imunofluorescência, formação de corpos embrioides, diferenciação espontânea *in vitro* e formação de teratomas *in vivo*.

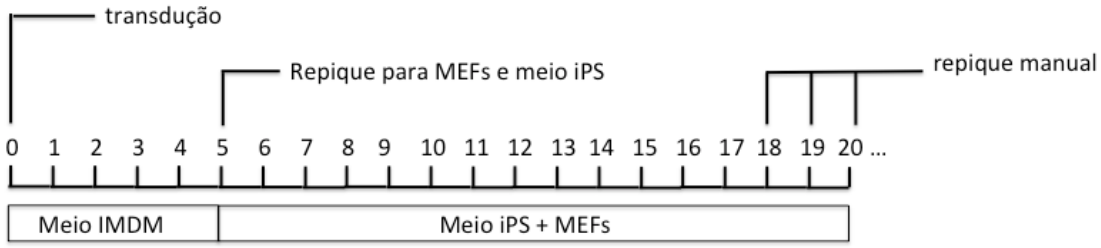

Figura 1. Esquema do curso temporal da reprogramação gênica induzida em cultivos celulares.

A obtenção das células iPS descritas neste estudo foi realizada com a colaboração de outros centros de pesquisa com experiência no desenvolvimento de iPS humanas ou de camundongo (Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Terapia Celular e Células-tronco – INCTC, sediado no Hemocentro de Ribeirão Preto; e Instituto do Coração – INCOR/HCFMUSP).

Os experimentos aqui descritos são aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos – FZEA/USP (anexo 1) e pelo Comitê de Ética e CONEP do HCRP- FMRP-USP (anexos 2 e 3).

Obtenção de fibroblastos e células mesenquimais derivadas de tecido adiposo nas espécies bovina, equina e humana

Fibroblastos fetais bovinos foram derivados de dois fetos (um macho e uma fêmea) com aproximadamente 50 dias de idade gestacional. Após a remoção dos órgãos e cabeça, o tecido foi lavado com tampão fosfato salino (*phosphate buffer saline*, PBS), dividido em pedaços menores e incubado por 3h a 38,5^{o}C em solução de colagenase IV (Sigma, 0,040g/mL). Após incubação, o tecido digerido foi lavado e plaqueado em meio de cultivo completo IMDM (Gibco) suplementado com 10% soro fetal bovino (Hyclone) e antibióticos (Gibco).

Células hAdMSC foram obtidas através de descarte de tecido adiposo obtido de procedimento de lipoaspiração eletiva, enquanto que células eAdMSC foram obtidas através de aproximadamente 5cm^3 de tecido adiposo excisado cirurgicamente da região esternal de uma fêmea da raça Bretão. Em ambos as casos o tecido adiposo foi incubado por 3h a 38,5^{o}C com colagenase IV (0,040g/ml), centrifugado e o *pellet* ressuspendido em meio Alfa-Mem (Gibco) suplementado com 10% soro fetal bovino (Hyclone), antibióticos e antifúngico.

Vetores

Foram utilizados vetores lentivirais policistrônicos excisáveis STEMCCA (*Stem cell cassette*, Sommer et al., 2009; Fig. 2) contendo o 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 (Fig. 3).

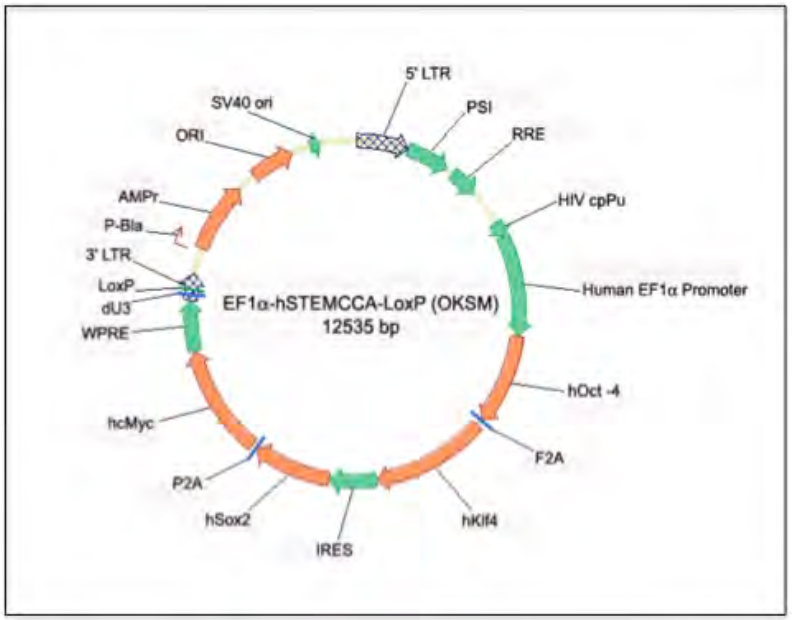

Figura 2: Mapa do vetor lentiviral EF1a-hSTEMCCA (OKSM). Figura adaptada do catálogo n. SCR544 (humano) e n.SCR518 (murino), Millipore.

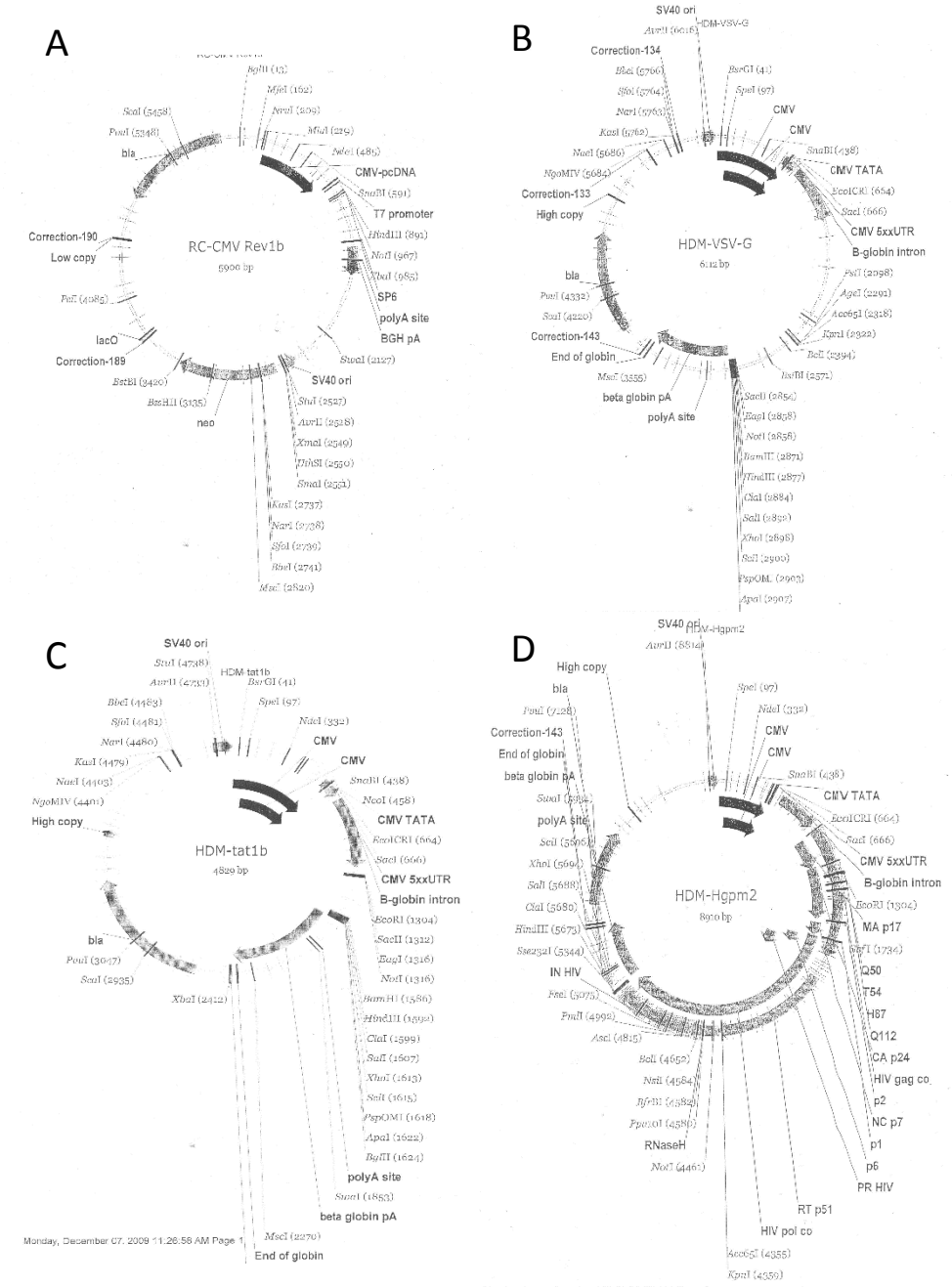

Figura 3: Mapa dos vetores auxiliares para produção lentiviral de segunda geração. Figura adaptada. A: REV. B: VSVG. C: TAT. D: Hgpm2.

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

Camundongos *Swiss* (4 fêmeas e 2 machos) apresentando três a cinco meses de idade foram acasalados e a cópula confirmada pela observação da presença de tampão vaginal (*plug*). Após 13,5 dias, as fêmeas foram sacrificadas em câmara de CO_2 e os úteros gravídicos retirados e imediatamente alocados em solução de PBS suplementado com antibióticos e antifúngico. Após lavagens em PBS, os úteros foram dissecados e os fetos recuperados. Foram retirados cabeça, membros, órgãos torácicos e abdominais (Fig. 4); o tecido restante foi picotado e incubado com colagenase IV, como descrito previamente em *Obtenção de fibroblastos e células mesenquimais derivadas de tecido adiposo nas espécies bovina, equina e humana.*

Foram cultivadas as células em uma proporção de aproximadamente 1 garrafa de cultivo de 75cm^2 para cada 4 embriões dissecados. Após 48h os cultivos foram congelados para posterior descongelamento e utilização.

Para a produção de monocamadas de fibroblasto murino previamente inativadas (MEFs) mitoticamente, garrafas de cultivo de 75cm^2 apresentando aproximadamente 80% de confluência foram incubadas com mitomicina (10mg/mL, Sigma) por 3h em incubadora. Após este período os cultivos foram lavados com PBS, tripsinizados e replaqueados em placas de cultivo previamente recobertos com gelatina (0,1%, Sigma) na concentração de 1,2 x 10^5 células por placa de 35mm (placa de 6 poços) ou 0,3 x 10^5 por placa de 4 poços.

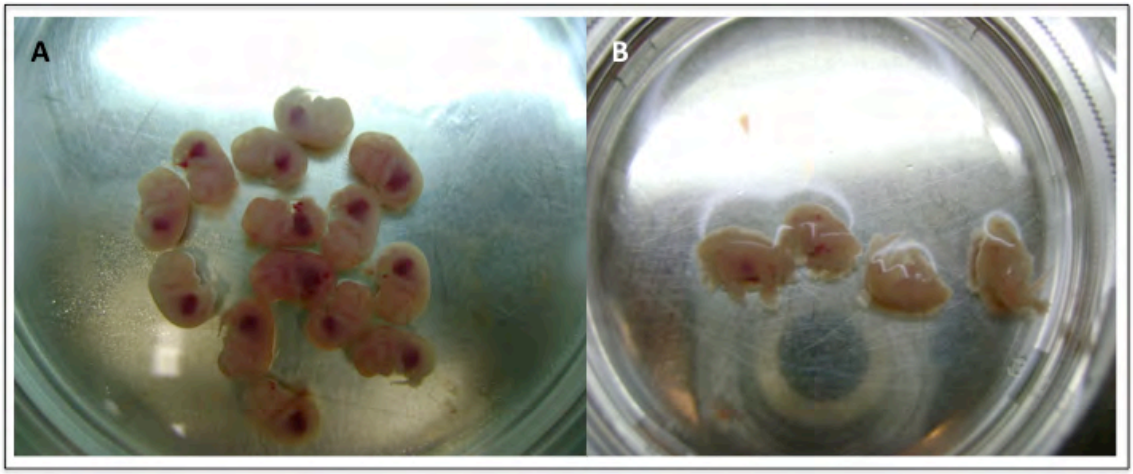

Figura 4: Coleta de embriões murinos com 13,5 dias de gestação. A: embriões recuperados, dissecados do útero e placenta e lavados em PBS. B: Cabeça e membros retirados de embriões que serão submetidos à digestão enzimática com colagenase IV.

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 x 10^6 células 293FT foram plaqueadas no dia anterior em placas de cultivo de 100mm 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 as células, quando então o meio foi trocado. O sobrenadante (meio de cultivo) foi recolhido e reposto após 24, 48 e 72h após transdução, filtrado e mantidos a 4ºC até serem concentrados em ultracentrífuga (Beckman Coulter) por 1h40min a 48960g no rotor SW28.

As partículas virais foram utilizadas no mesmo dia ou congeladas e mantidas a -80ºC e utilizadas quando necessários, sendo que não foram utilizadas partículas virais após um segundo congelamento.

Transdução celular

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

Após 5 ou 6 dias pós-transdução, as células foram transferidas para MEFs por um mínimo de 14 dias. Quando especificado, as células foram transferidas para placas cobertas previamente com Matrigel (Matrigel hES-qualified, BD Biosciences). Para o preparo de placas contendo Matrigel, 10 µL da matriz por ml de meio de cultivo foram incubados por 3h horas em incubadora antes de receber as células.

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), 10µg/mL 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 µM, Stemgent) e iMEK (inibidor da via de sinalização da proteína quinase ativada por mitógeno quinase (1µM, Stemgent) quando especificado.

Repique celular

O primeiro repique ou passagem celular foi realizado manualmente em todas as espécies e linhagens celulares e cultivadas a partir de então separadamente (clones de iPSC). iPSC derivadas das hAdMSC continuaram a ser repicadas sempre manualmente,

enquanto que iPSC equinas e bovinas puderam ser repicadas através de incubação com Tryple Express (Gibco) por aproximadamente 3 min em incubadora já a partir do segundo repique.

Caracterização das células pluripotentes induzidas (iPSC)

Após transdução e indução da pluripotência através da expressão exógena dos fatores relacionados à pluripotência (hSTEMCCA), hAdMSC apresentaram colônias de células induzidas. Foram realizadas um mínimo de 3 transduções independentes, sendo que cada rotina de transdução continha duas ou mais placas de cultivo transduzidas. Em todas as ocasiões foi observada a formação de colônias celulares. Também foram realizadas transduções em fibroblastos humanos derivados de prepúcio (BJ, Stemgent) com sucesso; porém, neste experimento somente as células reprogramadas derivadas de células mesenquimais humanas foram cultivadas a longo prazo e caracterizadas, como descrito em resultados. eAdMSC transduzidas com o vetor hSTEMCCA apresentaram colônias de células induzidas nas duas transduções independentes realizadas na presença de LIF, 2i, na combinação LIF + 2i ou sem suplementação com estes. bFF foram utilizados para a produção de células bIPS, porém, como esta espécie demandou uma maior otimização da indução à pluripotência, sua produção e resultados foi descrita neste estudo como estratégias 1 a 5.

Os procedimentos experimentais comuns às espécies estudadas são descritos na seção Material e Métodos, enquanto que, quando existentes, diferenças experimentais particulares a cada espécie (por exemplo, as estratégias utilizadas na espécie bovina), estão descritas ao longo da apresentação dos resultados específicos a cada espécie.

Caracterização morfológica

Os cultivos foram acompanhados a cada dois dias através de microscopia ótica

até o momento do primeiro repique, quando foram acompanhadas a cada 3 ou 4 dias para o seguimento dos repiques.

Análise da expressão gênica de fatores relacionados à pluripotência

Células bovinas, equinas e humanas antes da transdução (controle) e após período de reprogramação *in vitro* foram submetidas à análise de expressão gênica dos genes relacionados à pluripotência OCT4, SOX2 e NANOG. Para tal, células iPS humanas foram recuperadas manualmente enquanto que células iPS bovinas e equinas foram plaqueadas em Matrigel 24h antes de serem tripsinizadas e coletadas para evitar a contaminação da amostra com MEFs. Os cultivos foram lavados em PBS, o sobrenadante retirado e o pellet estocado a -80 ^{o}C até o momento da extração. O RNA total das amostras foi isolado pelo método do reagente TRIzol (TRIzol Reagent , Invitrogen) modificado, com a utilização da acrilamida linear (5mg/ml, Ambion). A quantificação do RNA foi realizada através da leitura em espectrofotômetro Nanodrop.

Para síntese de cDNA o kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems) foi utilizado. Este kit utiliza *primers* randômicos para a conversão do RNA total em cDNA. A quantificação do cDNA foi realizada utilizando-se a metodologia de PCR quantitativo (qPCR) no equipamento OneStep (Applied Biosystems). Os *primers* utilizados para avaliar a expressão dos genes alvos foram desenhados com o programa *Primer Express* (Applied Biosystems) a partir de sequências obtidas do banco de dados do GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov). Os transcritos alvos foram os genes OCT4, SOX2 e NANOG, candidatos a possuírem grande importância na reprogramação e pluripotência, e como referência endógena, foram utilizados os genes constitutivos Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH) ou 18S, ou ambos, como especificado posteriormente em cada análise. Foi utilizado o reagente *Power SYBR Green* (Applied Biosystems) nas reações e os primers foram utilizados na concentração de 400nM em condições padrão de termociclagem (temperatura de anelamento de 60°C por 40 ciclos).

Para a realização das curvas de referencia dos genes e análise da eficiência do ensaio foram utilizados *pools* de 50 embriões partenogenéticos (blastocistos no sétimo dia de cultivo *in vitro*). A eficiência de cada gene foi analisada, e a quantificação de cDNA das amostras foi avaliada utilizando o método $2^{-\Delta\Delta CT}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001), baseado em duplicatas.

As sequencias dos oligonucleotídeos iniciadores estão descritas na tabela 1.

Tabela 1- Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados.

Nome	Sequência 5´-3´
OCT4_FWD	CAGGCCCGAAAGAGAAAGC
OCT4_REV	CGGGCACTGCAGGAACA
NANOGhum_FWD	CCAAAGGCAAACAACCCACTT
NANOGhum_REV	CGGGACCTTGTCTTCCTTTTT
NANOGbov_FWD	CCCTCGACACGGACACTGT
NANOGbov_REV	GACTGTCCTGAATAAGCAGATCCA
SOX2_FWD	TGCGAGCGCTGCACAT
SOX2_REV	TCATGAGCGTCTTGGTTTTCC
18S_FWD	CCTGCGGCTTAATTTGACTC
18S_REV	CTGTCAATCCTGTCCGTGTC
GAPDH_FWD	GGCGTGAACCACGAGAAGTATAA
GAPDH_REV	CCCTCCACGATGCCAAAGT

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.

Detecção da proteína OCT4 por imunofluorescência

O protocolo de imunofluorescência foi baseado no protocolo descrito por Oliveira e colaboradores, 2012. Cultivos celulares de iPS bovinas, equinas e humanas foram fixados em paraformaldeído 4% por 20 min e mantidos a 4ºC em PBS suplementado com BSA 3% e Triton X-100 0,5% por um mínimo de 12-16 horas. Os cultivos foram incubados em solução de bloqueio (PBS suplementado com BSA 3% e Tween-20 0,2%) por 1 h à temperatura ambiente. Os cultivos foram então incubados com o anticorpo primário específico para OCT4 (*rabbit* anti OCT3/4, 1:50, Sigma) por 12 -16 h a 4ºC. Os cultivos foram lavados três vezes com PBS e incubados com o anticorpo secundário (goat anti-rabbit 488, 1:100, Alexa Fluor, Invitrogen) por 2 h. Os cultivos foram então novamente lavados com PBS e analisados por microscopia de fluorescência utilizando um microscópio Zeiss e o software AXIOVISION 4.7.1 (Carl Zeiss).

Formação de corpos embrioides, diferenciação *in vitro* e formação de teratomas *in vivo*

Placas de cultivos de seis poços foram tratadas previamente com a cobertura de agarose 0,6% autoclavada. Assim que solidificada, células iPS foram repicadas e cultivadas sobre a agarose. Os pedaços de colônias (células humanas) ou células após

dissociação enzimática (bovinas e equinas) foram cultivados em meio iPS sem bFGF por 48-60h. Os corpos embrioides foram recuperados através da utilização de estereomicroscópio e plaqueados em poços previamente cobertos com gelatina 0,1% para a indução da diferenciação *in vitro* espontânea. Os corpos embrioides foram cultivados na gelatina por um mínimo de 6 dias em meio de cultivo favorável à diferenciação espontânea, o que consistiu em DMEM/F12 knockout suplementado com 20% SFB e antibióticos.

Para a análise da formação de teratomas *in vivo*, células controle (não reprogramadas) e cultivos de células iPS humanas (hiPS4), bovinas (biPS2) e equinas (eiPS7 e eiPS9) foram injetadas via subcutânea em fêmeas balb/c NUDE apresentando 3 a 6 semanas de idade.

Todos os procedimentos foram realizados em ambiente asséptico. Em cada local de administração (um a quatro locais por animal) foram injetadas 1,5 x 10^6 células ressuspendidas em uma solução de PBS estéril suplementado com 30% de Matrigel (BD Biosciences). Os animais foram observados a cada dois ou três dias e mantidos por um mínimo de um mínimo de 35 dias.

RESULTADOS

Para uma melhor visualização e compreensão dos resultados, estes serão agrupados segundo a espécie estudada.

iPSC humanas

Células humanas apresentaram a primeira diferenciação morfológica com aproximadamente dez dias após a inserção dos genes exógenos em seu genoma. As hAdMSC começam a se organizar em colônias com morfologia típica em aproximadamente 15 dias após a transdução e puderam ser repicadas após aproximadamente 20 dias pós transdução (Fig.5).

Na primeira rotina de transdução lentiviral nas hAdMSC, 16 colônias foram selecionadas para o primeiro repique clonal (uma colônia/poço). Destas, seis colônias continuaram o cultivo por pelo menos 6 passagens e cinco por pelo menos 35 passagens. Cada linhagem foi criopreservada para continuação do cultivo em momento posterior e congelada para extração de mRNA e caracterização de expressão genica. As células apresentaram expressão de fosfatase alcalina (Fig. 6).

Células iPS humanas (hiPS) cultivadas nestas condições foram repicadas manualmente em todos os momentos, uma vez o repique enzimático com Tryple Express (Gibco) ou Dispase (BD Biosciences) inviabilizou a continuidade dos cultivos. O repique manual foi realizado através da manipulação de aghas 30G acopladas a seringas de 1ml estéreis, na qual as MEFs são retiradas do contorno de cada colônia, estas são recortadas em pedaços menores conforme demonstrado na figura 7, e os pedaços menores foram transportados para a nova placa com MEFs com o auxílio de uma micropipeta de 10 µL.

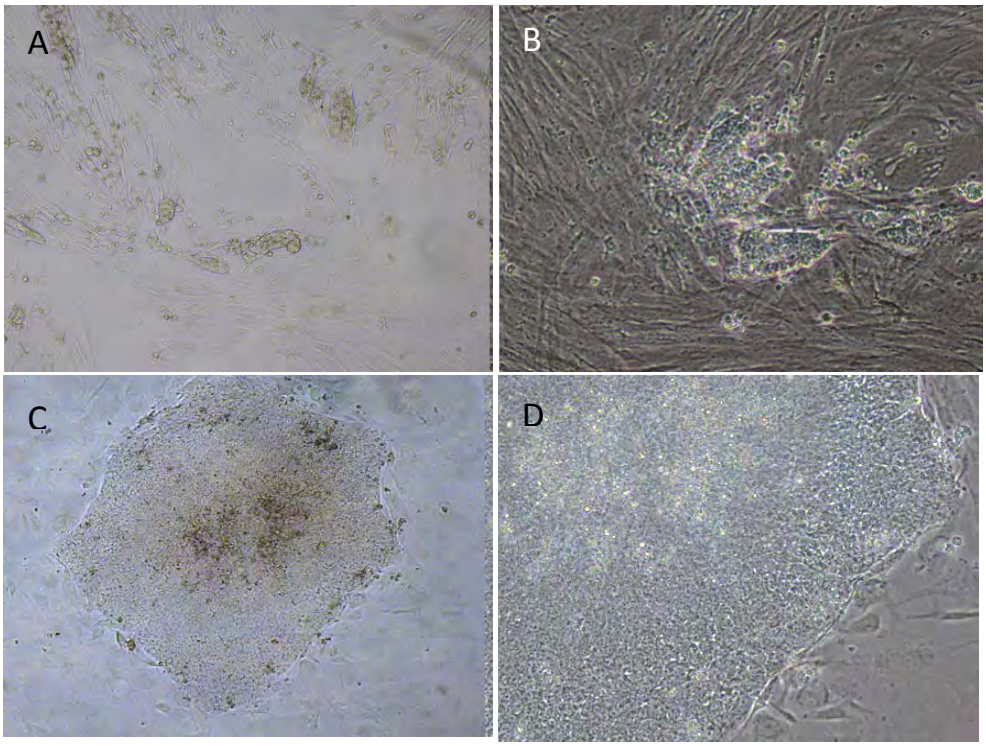

Figura 5: Diferentes períodos durante a reprogramação celular *in vitro* de hAdMSC. A: 10 dias pós transdução. 100X. B: 15 dias pós-transdução. 200x. C e D: colônia iPS após repique manual, 40x e 200X, respectivamente.

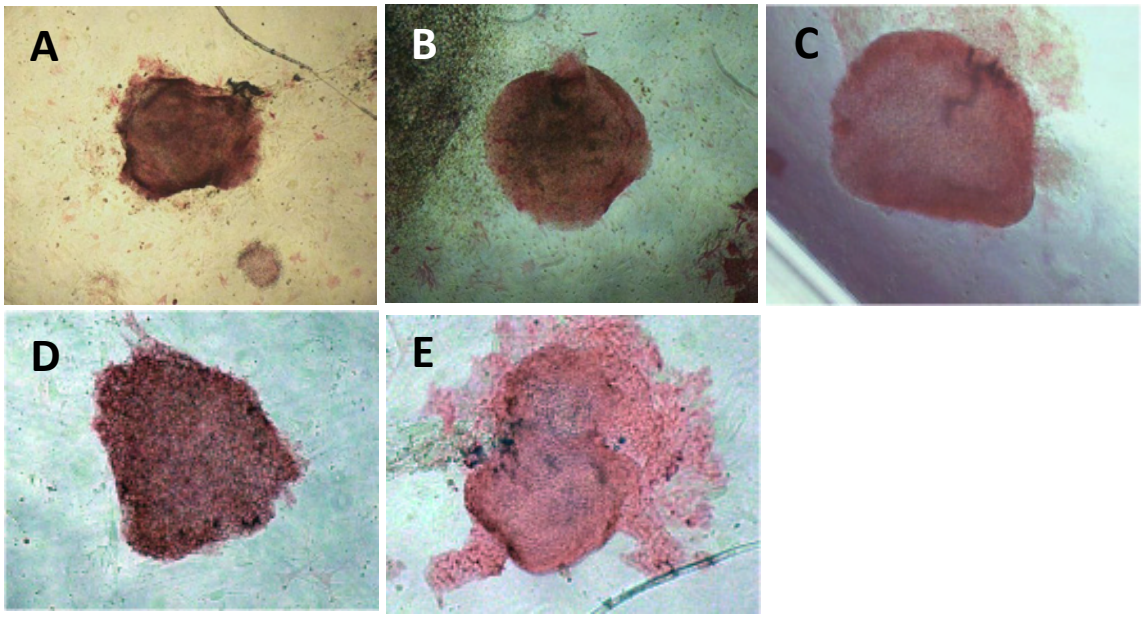

Figura 6: Detecção da fosfatase alcalina em colônias de células iPS humanas derivadas de hAdMSC. A: hiPS1 p17. B: hiPS2 p21. C: hiPS3 p14. D: hiPS4 p20. E: hiPS5 p20. 40X.

Figura 7: Procedimento para repique manual das células hiPS sob estereomicroscopia.

Análise da expressão gênica de fatores relacionados à pluripotência

As linhagens iPS-hAdMSC 1 a 5 foram analisadas quanto à expressão dos genes OCT4, SOX2 e NANOG, sendo tal expressão comparada com aquela apresentada pela célula controle não modificada hAdMSC. Foram estudadas as células hiPS 1 nas passagens 7, 11 e 14, hiPS 2 nas passagens 11, 15 e 18, hiPS 3 nas passagens 5, 8 e 10, hiPS 4 nas passagens 10, 13 e 14 e hiPS 5 nas passagens 13 e 17.

Pode ser observado que além da presença da expressão de OCT4 e SOX2 (Figs. 8 e 9), houve também a produção de NANOG endógeno (Fig. 10), indicando que as colônias iPS reprogramaram seu genoma à pluripotência. Pode ser observado também que a expressão dos fatores manteve um padrão similar, com a exceção da expressão de NANOG na hiPS1, aparentemente aumentada em relação às demais.

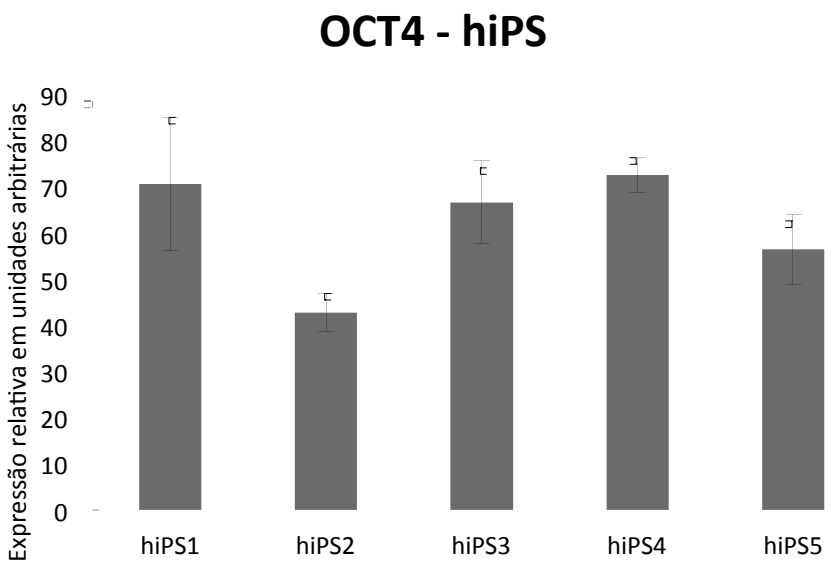

Figura 8: Expressão de OCT4 em linhagens hiPS quando comparadas à hAdMSC não modificada, em unidades arbitrárias.

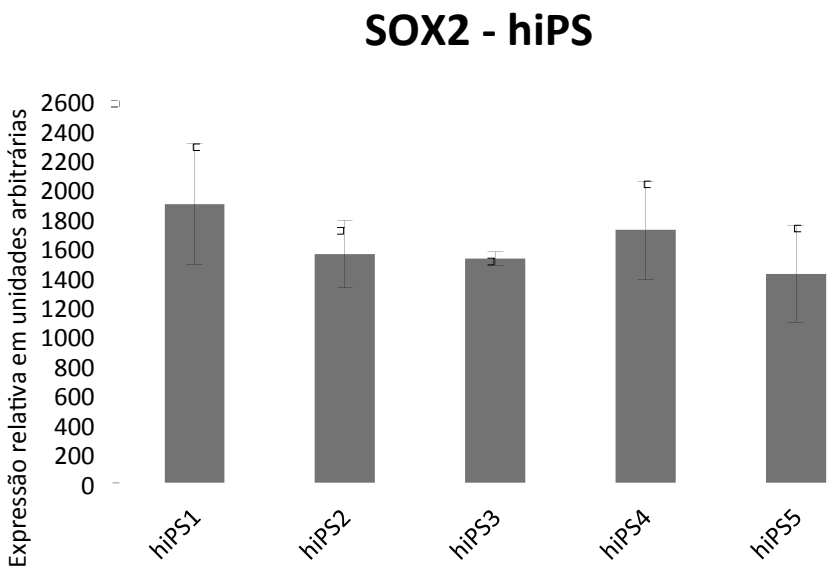

Figura 9: Expressão de SOX2 em linhagens hiPS quando comparadas à hAdMSC não modificada, em unidades arbitrárias.

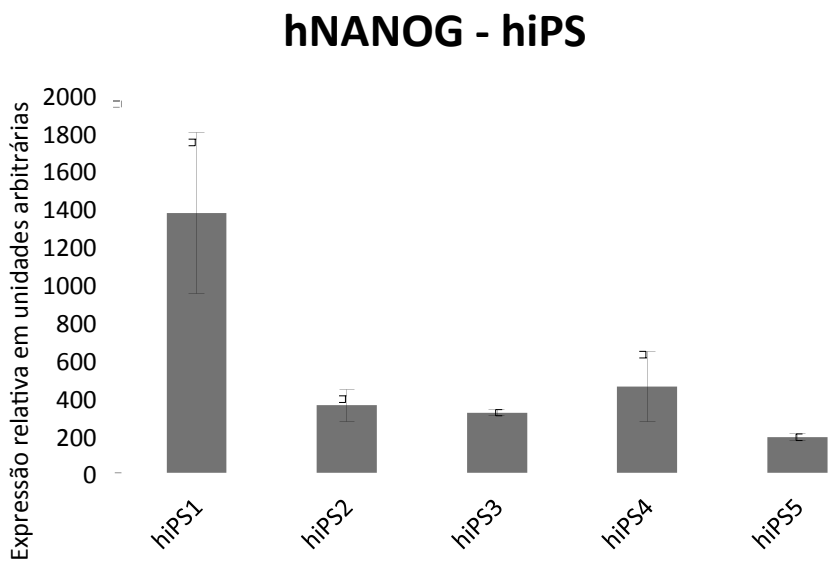

Figura 10: Expressão de NANOG em linhagens hiPS quando comparadas à hAdMSC não modificada, em unidades arbitrárias.

Formação de corpos embrioides e diferenciação *in vitro* espontânea e formação de teratomas *in vivo*

A formação de corpos embrioides mostrou-se eficiente nas cinco linhagens de células iPS humanas estudadas. Foram formados de dezenas a centenas de corpos embrioides por cultivo, sendo sua grande maioria composto por bordas definidas (Fig.11).

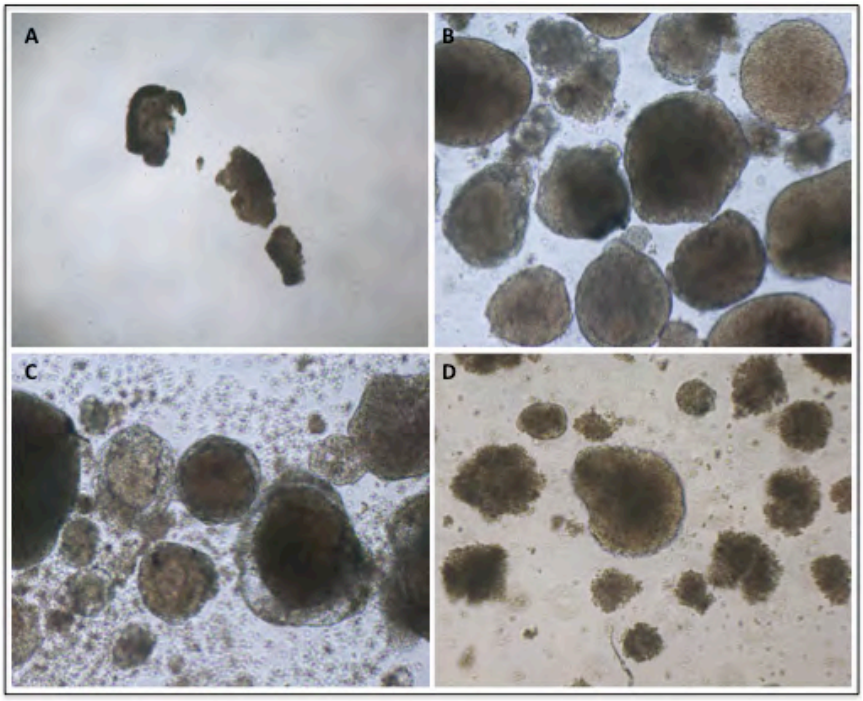

Figura 11: Formação de corpos embrioides antes do repique (A) e após cultivo em agarose (B, C e D). B: hiPS 2 p18. C: hiPS 3 p11. D: hiPS 4 p17. 100x.

Na análise da diferenciação *in vitro* espontânea, corpos embrioides derivados das hiPS 2 p18 (Fig. 12) e hiPS3 p11 (Fig. 13) desenvolveram cultivos aderentes apresentando morfologias diversas.

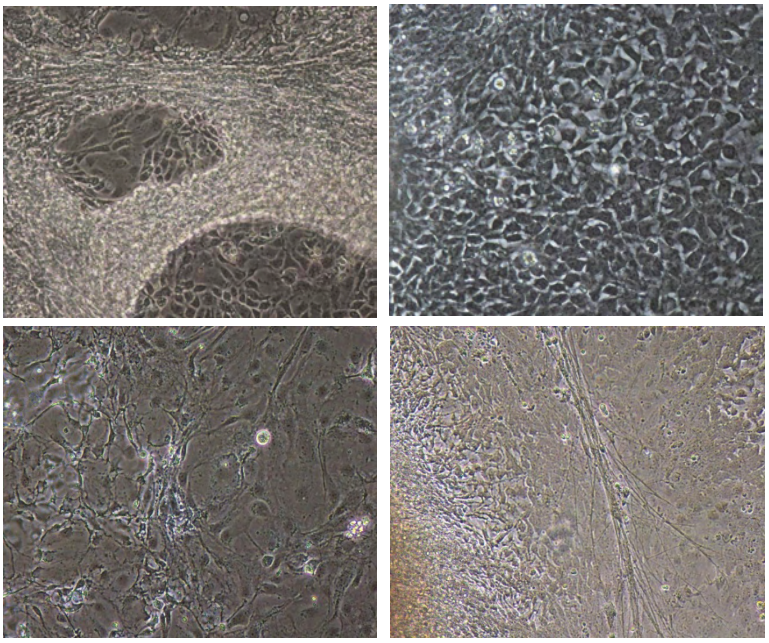

Figura 12: Diferentes tipos celulares encontrados no cultivo de corpos embrioides em gelatina após 9 dias em cultivo. Linhagem hiPS2. 200x.

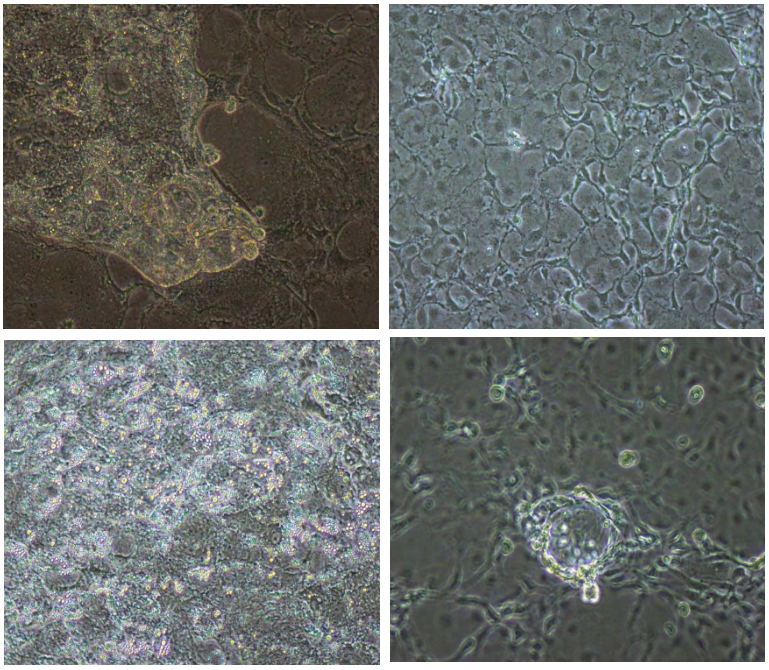

Figura 13: Diferentes tipos celulares encontrados no cultivo de corpos embrioides em gelatina após 5 dias em cultivo. Linhagem hiPS3. 200x.

Não foram encontradas formações de teratomas no período de 35 dias após inoculação.

iPSC equinas

Após transdução e indução da pluripotência através da expressão exógena dos fatores relacionados à pluripotência humanos, eAdMSC apresentaram colônias de células induzidas com aproximadamente três dias após a inserção dos genes exógenos em seu genoma (Fig. 14), independentemente de alterações realizadas no cultivo, como por exemplo, a adição de hLIF/2i no meio de cultivo (Fig. 15) e foram repicadas após aproximadamente 15 dias pós transdução. Foram produzidas e cultivadas 12 cultivos clonais de eiPS, com a suplementação com LIF, 2i, 2i+LIF ou sem suplementação, e que puderam ser cultivadas em Matrigel ou em MEFs. Em todos os cultivos testados a expressão da fosfatase alcalina foi detectada (Fig. 16).

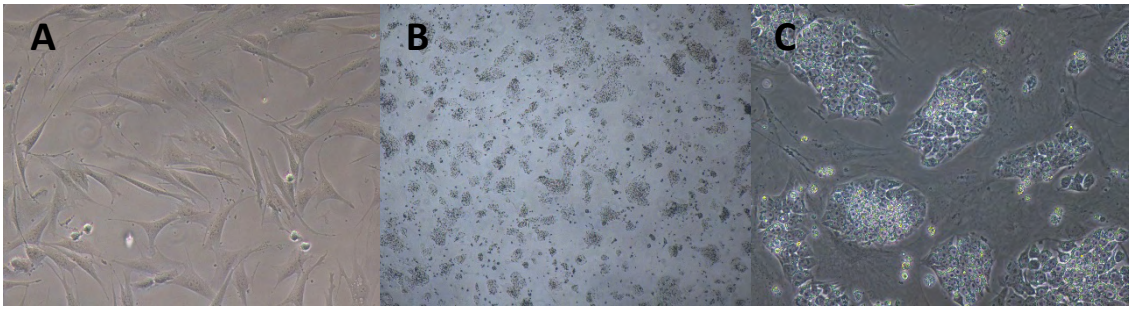

Figura 14: eAdMSC e eiPS. A: eAdMSC antes da transdução. 200x. B: eiPS. 40x. C eiPS. 200x.

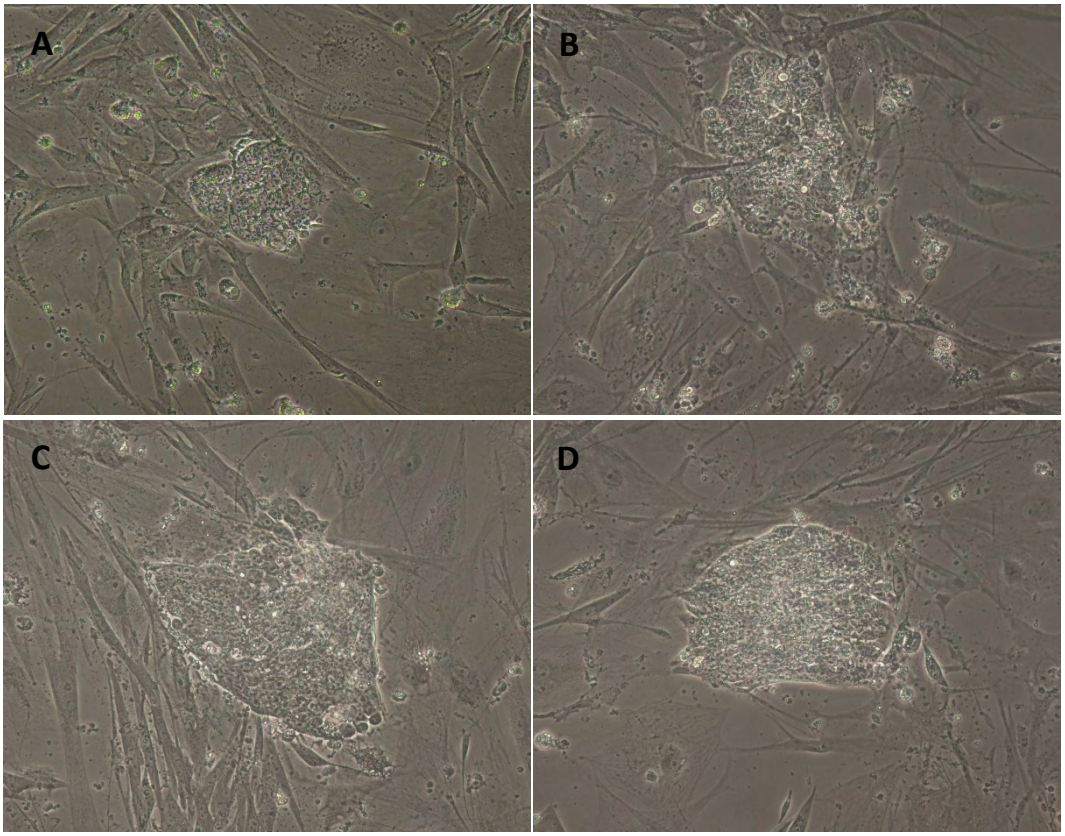

Figura 15: Células equinas sendo reprogramadas *in* vitro (p0) em diferentes condições de cultivo 6 dias após transdução. A: meio de cultivo padrão de iPS. B: meio de cultivo suplementado com LIF. C: meio de cultivo suplementado com 2i. D: meio de cultivo suplementado com LIF+2i. 200x.

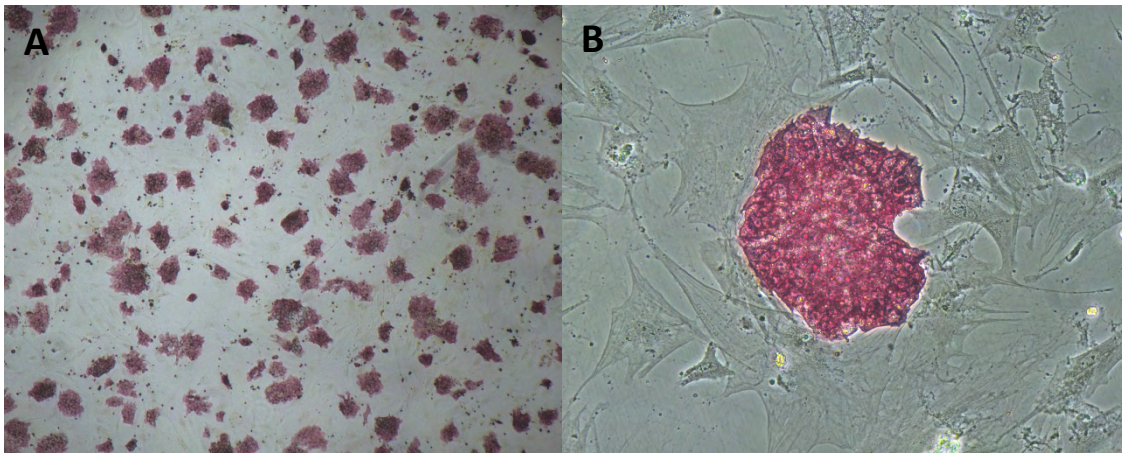

Figura 16: Detecção de fosfatase alcalina em eiPS. A: 40x. B: 200x

Análise da expressão gênica de fatores relacionados à pluripotência

Foram analisadas as linhagens de iPS equinas eiPS7, eiPS9 e eiPS10 quanto à expressão de OCT4 e SOX2. As linhagens expressaram OCT4 e SOX2 (Figs. 17 e 18), porém, de maneira interessante, a linhagem eiPS10 apresentou uma expressão relativamente pequena de SOX2 quando comparada às outras duas linhagens (aumento de 14, 4 unidades arbitrárias em relação à eAdMSC).

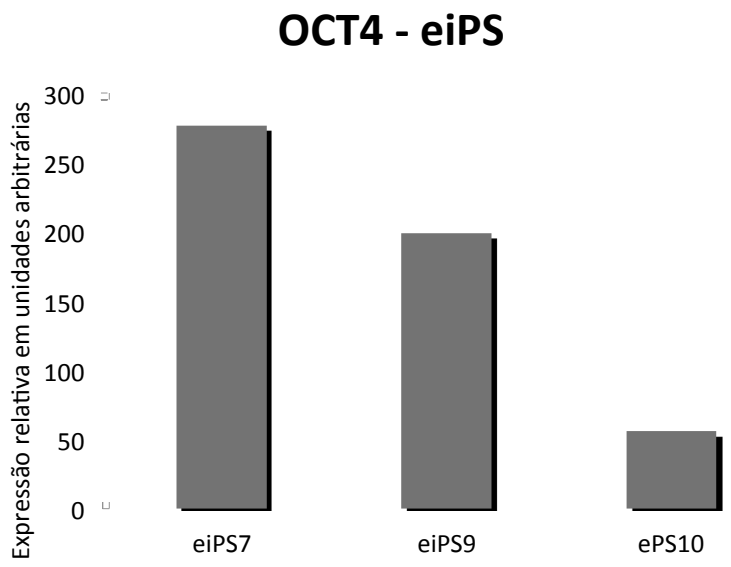

Figura 17: Expressão de OCT4 em linhagens eiPS quando comparadas à eAdMSC não modificada, em unidades arbitrárias.

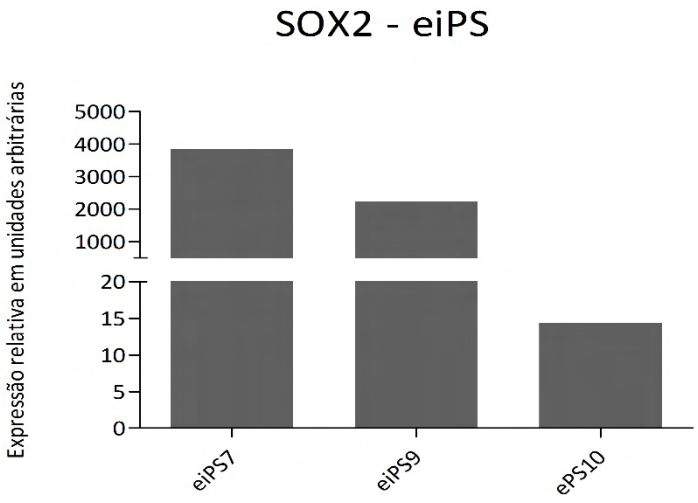

Figura 18: Expressão de SOX2 em linhagens eiPS quando comparadas à eAdMSC não modificada, em unidades arbitrárias.

Assim como comprovado pela expressão gênica quantitativa, as linhagens de eiPS apresentaram OCT4 quando analisadas por imunofluorescência (Fig. 19).

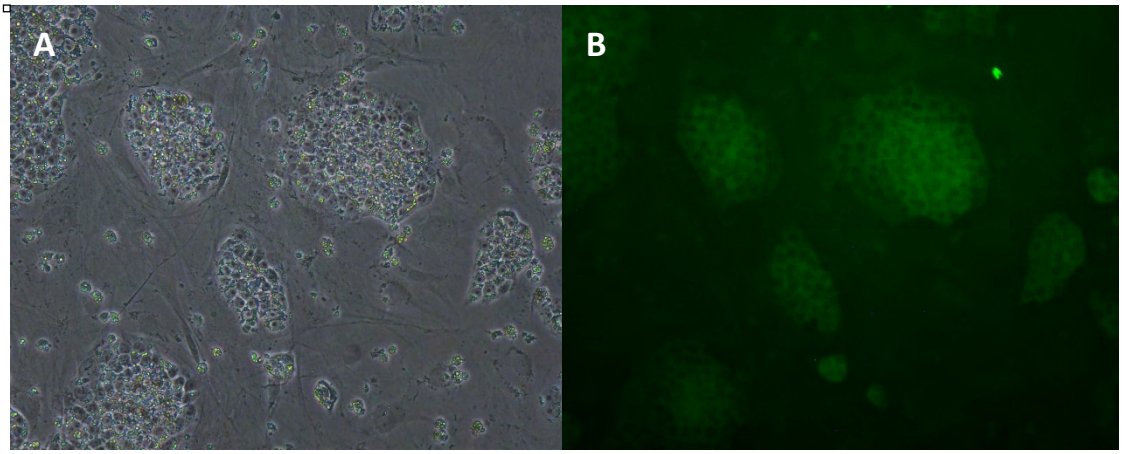

Figura 19: Detecção da proteína Oct4 em eiPS. A e B: eiPS sobre MEFs em microscopia ótica e de fluorescência, respectivamente. 200x.

Formação de corpos embrioides e diferenciação *in vitro* espontânea e formação de teratomas *in vivo*

A formação de corpos embrioides mostrou-se eficiente nas duas linhagens de células eiPS testadas, a eiPS 7 e a eiPS 9 (Fig. 20).

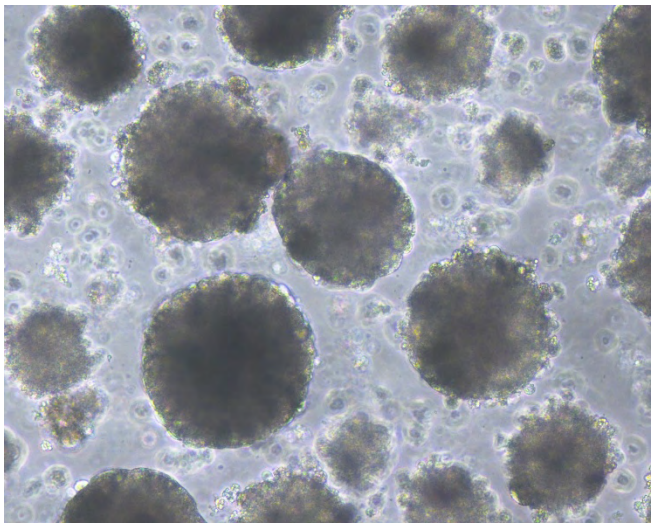

Figura 20: Formação de corpos embrioides, linhagem eiPS7.

A análise da diferenciação *in vitro* espontânea foi testada na linhagem eiPS7; porém, mesmo após 20 dias em cultivo em meio propício à diferenciação, características de células reprogramadas, como por exemplo, alta razão núcleo/citoplasma, ainda puderam ser observadas (Fig. 21).

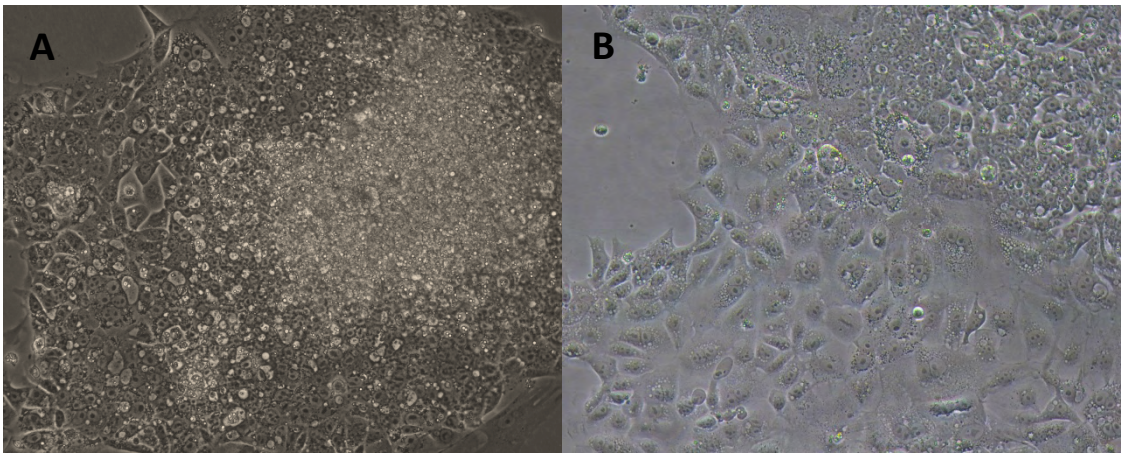

Figura 21: Diferenciação *in vitro* de células eiPS da linhagem eiPS7 após 3 dias (A) e 20 dias (B) em cultivo sobre gelatina. 200x.

Não foram encontradas formações de teratomas em um período de 35 dias após inoculação.

iPSC bovinas

O sucesso na obtenção de células iPS bovinas foi possível após uma série de tentativas que levaram à otimização da indução à pluripotência e cultivo destas. Os experimentos foram divididos em estratégias para uma melhor compreensão dos resultados, descritas a seguir.

A **primeira estratégia** consistiu na transdução dos fatores OCT4, KLF4, SOX2, c-MYC, LIN-28 e NANOG humanos (Stemgent), além de um controle eGFP, em bFF derivados de um feto fêmea, cultivados em meio mTESR (StemCell Technologies) em placas cobertas com Matrigel, sem sucesso (ausência de modificação na morfologia do cultivo).

A **segunda estratégia** consistiu na utilização dos fatores OCT4, SOX2, LIN-28 e

NANOG humanos, além do repórter eGFP, cultivo em mTESR ou DMEM KO suplementado com 10% de SFB e antibióticos em MEFs ou fibroblastos fetais bovinos mitomicinados (BEFs), sendo que seguidas transduções (n=7) foram repetidas com o objetivo de aumentar a eficiência de reprogramação. Três placas de cultivo de bFF transduzidos com os fatores de pluripotência, cultivadas em MEFs e mTESR, resultaram em colônias com morfologia típica embrionária após 15 dias de cultivo (chegando a apresentar mais de uma centenas destas estruturas com aproximadamente 50 dias de cultivo em uma das placas). Porém, após duas ou três passagens manuais ou por dissociação enzimática, as colônias perderam a morfologia típica e a proliferação celular cessou, impedindo desta maneira a continuidade dos experimentos (Fig. 22).

Na **terceira estratégia**, fibroblastos fetais bovinos também foram transduzidos concomitantemente com os fatores OKSM (OCT4, SOX2, c-MYC e KLF4). As células foram cultivadas com mTESR trocado a cada dois dias em Matrigel ou em MEFs, tratadas com ácido valpróico (VPA, 2mM), VPA mais MEKi e GSK3i ou nenhum suplemento. Placas de 100mm de cultivo receberam 5 x 10^4 células/placa. Foram cultivadas ao total 12 placas de 100mm, por mais de 40 dias de cultivo. Não houve surgimento de colônias com morfologia típica. É importante ressaltar que o meio de cultivo mTESR, por ser otimizado para células humanas, possui bFGF mas não LIF, que foi testado estratégia descrita a seguir.

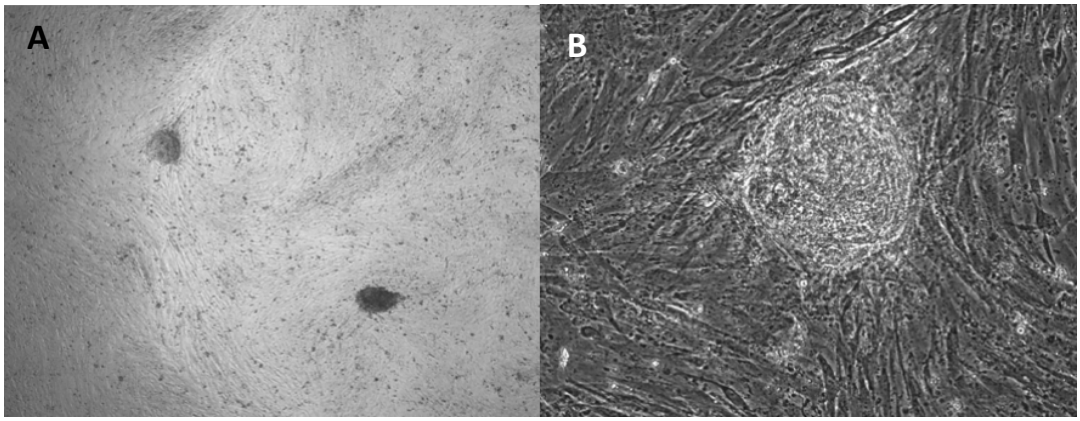

Figura 22: Possíveis colônias de células reprogramadas bovinas após repique celular mecânico e enzimático com colagenase, respectivamente (A e B). 100x.

Tendo em vista a grande dificuldade de indução à pluripotência em bovinos, a **quarta estratégia** foi realizada em paralelo à produção de células iPS humanas e equinas, visando o controle no processo de indução de pluripotência.

Foram utilizados os mesmos vetores, nas mesmas concentrações virais e celulares, nas mesmas condições de cultivo que as células equinas e humanas em bFF derivados de um feto macho, porém sem sucesso.

A suplementação com LIF, em especial, foi analisada na indução à pluripotência bovina foi testado em fibroblastos bovinos (bFF, n=3), quando cultivadas na ausência ou presença de LIF, porém, a formação de colônias não foi observada nestas condições.

Apesar de a comparação das proteínas relacionadas à reprogramação direta OCT4, SOX2, c-MYC e KLF4 demonstrarem maior semelhança entre as espécies humana e bovina quando comparadas ao camundongo (*Protein Blast*); na **quinta estratégia** foi testado o possível efeito dos genes exógenos de camundongo na reprogramação *in vitro* celular bovina. bFFs foram transduzidos com mSTEMCCA, hSTEMCCA, ou com a combinação de ambos (mSTEMCCA+hSTEMCCA), sendo que cada grupo foi cultivado em meio iPS suplementado com 2i+LIF ou não.

Após aproximadamente 10 dias em reprogramação, os cultivos de bFF que receberam mSTEMCCA ou mSTEMCCA + hSTEMCCA apresentaram colônias morfologicamente semelhantes às colônias iPS ou ES de camundongos. A suplementação do meio com 2i+LIF parece não interferir no tempo ou quantidade de colônias geradas (Fig. 23).

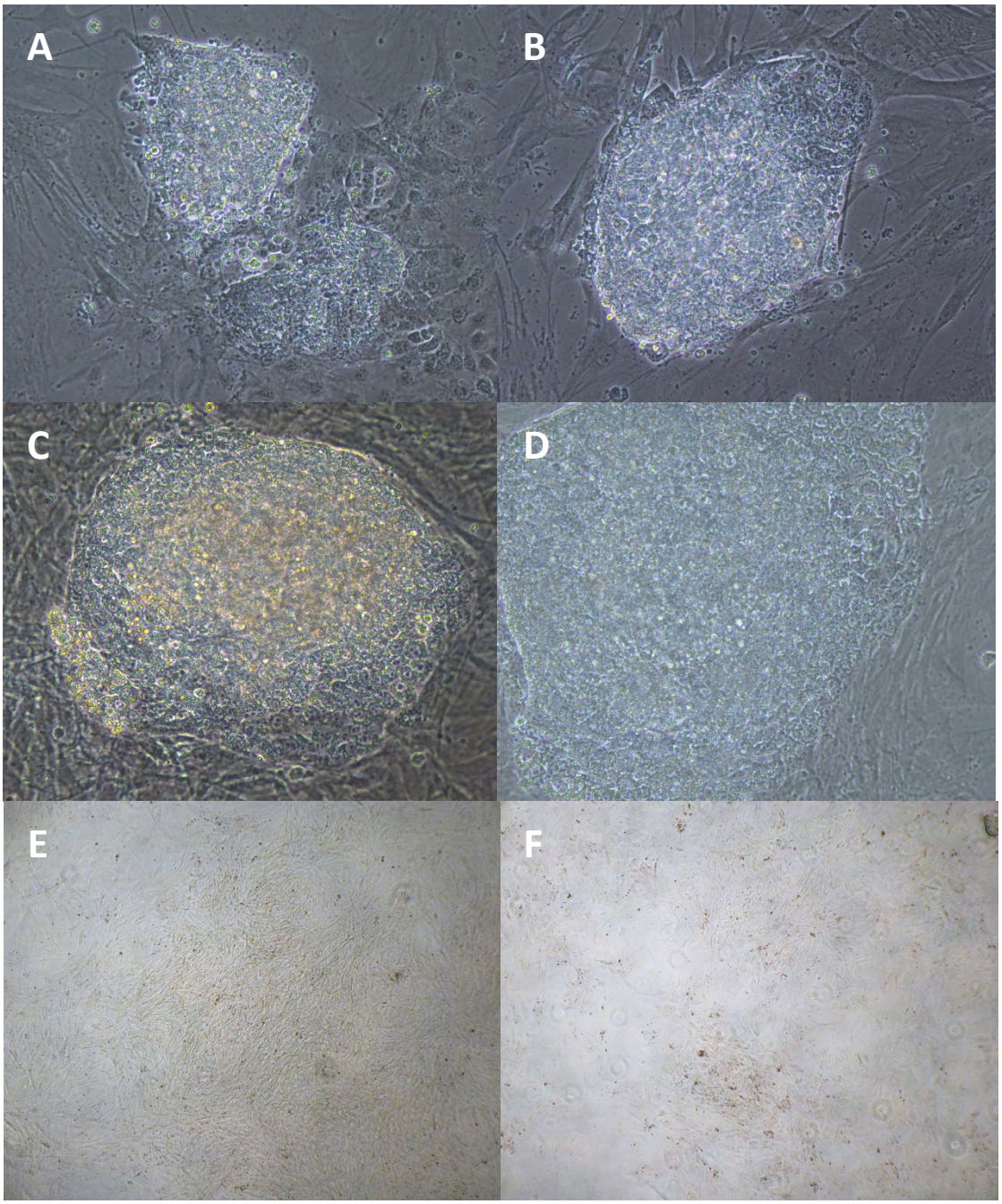

Figura 23: Cultivos de bFF com 16 dias após transdução com os vetores mSTEMCCA, hSTEMCCA ou ambos, em meio suplementado com 2i+LIF ou não. A: mSTEMCCA sem suplementação, 200x. B: mSTEMCCA com suplementação 2i+LIF, 200x. C: mSTEMCCA+hSTEMCCA sem suplementação, 200x. D: mSTEMCCA+hSTEMCCA com suplementação 2i+LIF, 200x. E: hSTEMCCA sem suplementação, 40x. F: hSTEMCCA com suplementação 2i+LIF, 40x.

Foram repicadas e cultivadas 12 colonias biPS, sendo destas 3 produzidas com mSTEMCCA sem suplementação (biPS 1 a 3), três produzidas com mSTEMCCA + hSTEMCCA sem suplementação (biPS 4 a 6), três produzidas com mSTEMCCA com suplementação 2i+LIF (biPS 7 a 9) e três produzidas com mSTEMCCA + hSTEMCCA com suplementação (biPS 10 a 12). Após a 10ª passagem, todas foram cultivadas sem suplementação, em MEFs.

Em todos os cultivos testados a expressão da fosfatase alcalina foi detectada (Fig. 24).

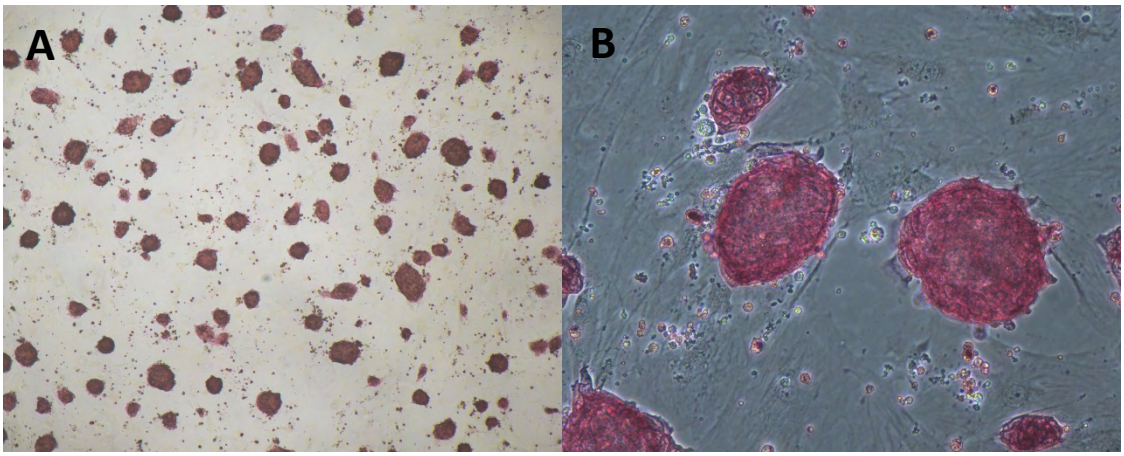

Figura 24: Detecção de fosfatase alcalina em biPS. A: 40x. B: 200x.

Análise da expressão gênica de fatores relacionados à pluripotência

Foram analisadas as biPS 2 p9, biPS 5 p6 e biPS 7 p3 quanto à expressão dos genes OCT4, SOX2 e NANOG. Todos os cultivos apresentaram expressão de OCT4 e SOX2 (Fig. 25 e 26), porém, os cultivos não expressaram NANOG.

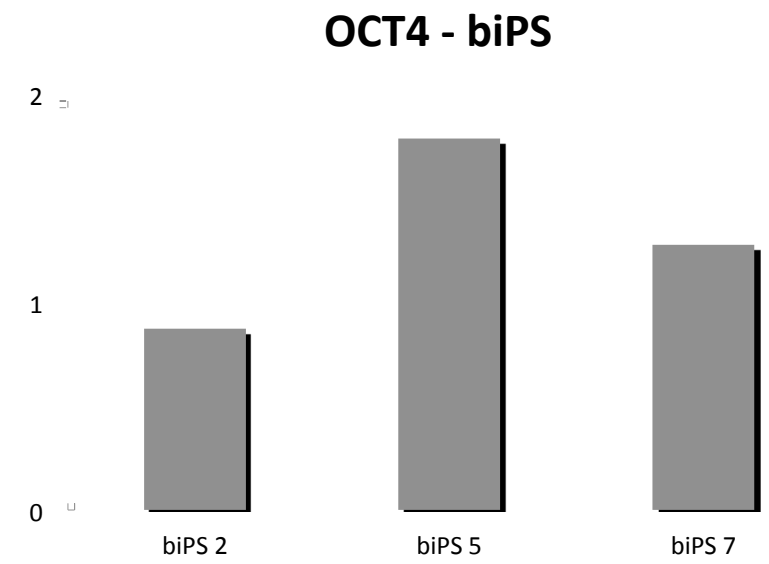

Figura 25: Expressão de OCT4 em linhagens biPS quando comparadas à bFF não modificada, em unidades arbitrárias.

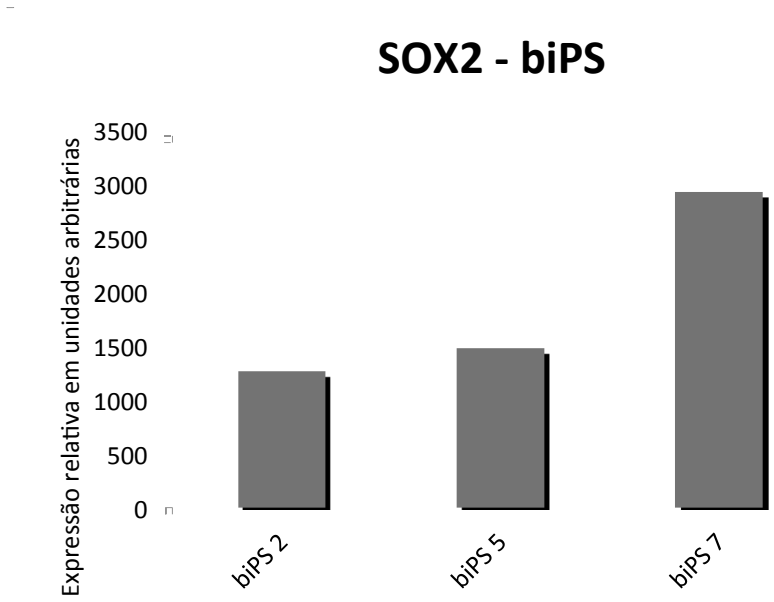

Figura 26: Expressão de SOX2 em linhagens biPS quando comparadas à bFF não modificada, em unidades arbitrárias.

Duas linhagens de biPS (biPS 2 e biPS 5) foram testadas quanto a presença da proteína OCT4 por imunofluorescência (Fig. 27). Ambas as linhagens apresentaram

presença do OCT4 em todas as células reprogramadas.

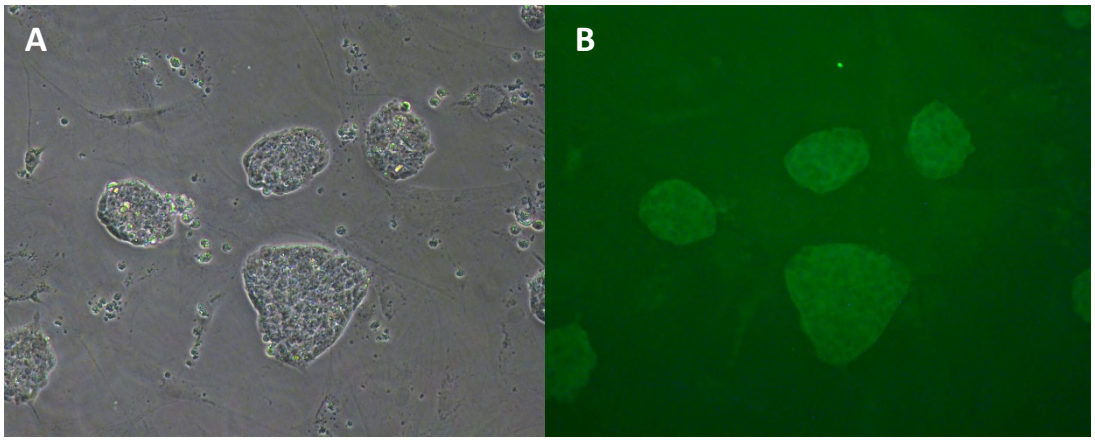

Figura 27: Detecção da proteína Oct4 em biPS. A e B: biPS2 sobre MEFs em microscopia ótica e de fluorescência, respectivamente. 200x.

Formação de corpos embrioides e diferenciação in vitro espontânea e formação de teratomas *in vivo*

A formação de corpos embrioides mostrou-se eficiente nas três linhagens de células biPS estudadas (Fig. 28).

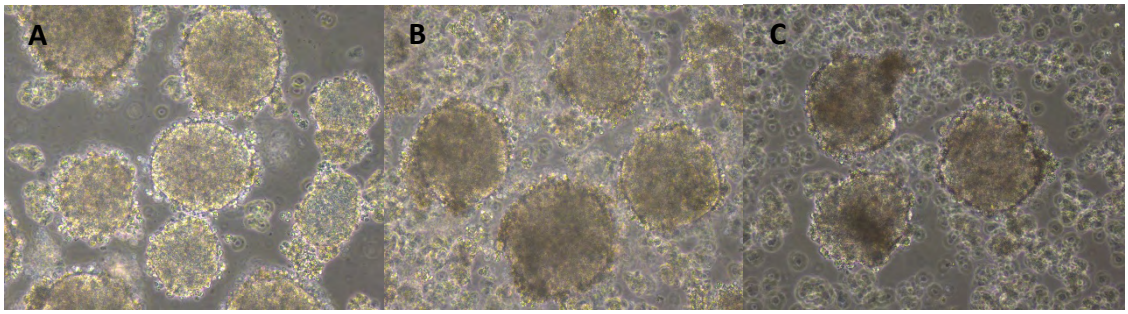

Figura 28: Corpos embrioides cultivados por 48h. A: biPS 2. B: biPS 5. C: biPS 7. 200x.

A análise da diferenciação *in vitro* espontânea foi testada nas linhagens biPS 2 e

biPS 5. Apesar de não ter sido observada uma diversidade de tipos celulares mesmo após 20 dias em cultivo sobre gelatina, foi observada a perda de características de células reprogramadas, como por exemplo, alta razão núcleo/citoplasma após 5 dias em cultivo (Fig. 29).

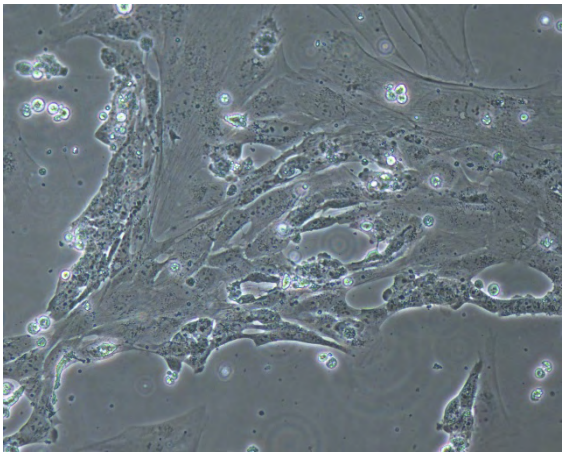

Figura 29: Cultivo de corpos embrioides em gelatina após 5 dias. 200x.

Trinta dias após a inoculação subcutânea de células biPS 2 podem ser macroscopicamente visualizados três sítios de início de formação de tumores (Fig. 30). Os possíveis teratomas foram coletados 37 dias após a inoculação. A procura por tecidos originados das três camadas germinativas (endoderme, mesoderme e ectoderme) será avaliada através de corte histológico e coloração de hematoxilina-eosina.

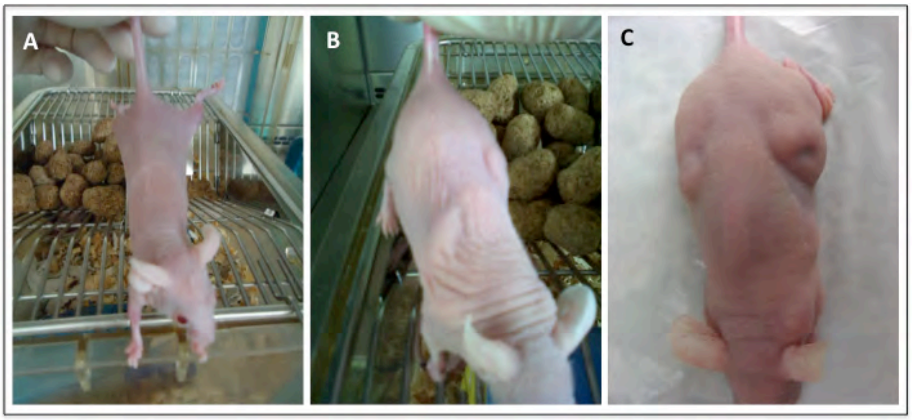

Figura 30: Camundongos nude injetados com bFF (A) ou biPS após 30 (B) e 37 (C) dias.

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES PARCIAIS DO CAPÍTULO 3

Atualmente, os critérios mais comuns de seleção para a caracterização das células-tronco embrionárias humanas e murinas são a presença de fenótipo típico, que essencialmente é descrito pela razão núcleo/citoplasma alta; o padrão de expressão de marcadores de superfície e intracelulares (ex. SSEA1, SSEA3/4, TRA1-60, TRA1-81, NANOG, OCT-4); alta atividade de telomerase e pluripotência *in vitro* e *in vivo* (SIDHU; TUCH, 2006). Em outras espécies, porém, tais critérios ainda não são bem elucidados. Em bovinos, por exemplo, apesar de relatos de isolamento de colônias embrionárias que correspondem a alguns dos critérios requeridos para as células humanas e murinas, o isolamento e cultivo destas células-tronco diferem das características apresentadas acima e também entre si (GJORRET; MADDOX-HYTTEL, 2005; WANG et al., 2005; ROACH et al., 2006; MUNOZ et al., 2008; PANT; KEEFER, 2009). Por isso, assim como em outras espécies, estas células são chamadas de semelhantes às células-tronco (do inglês *stem-cell like*).

Até o advento da tecnologia iPS, células tronco pluripotentes ou células germinativas pluripotentes não haviam sido derivadas em animais domésticos. Algumas das possíveis causas discutidas atualmente baseiam-se provavelmente em deficiências nas condições de manutenção do estado pluripotente *in vitro*, assim como a falta de conhecimento sobre os fatores que regulam células-tronco isoladas de outras espécies além da humana e murina (HALL, 2008).

No presente estudo foi realizada a reprogramação celular direta *in vitro* de uma população celular bovina. Tendo em vista a grande dificuldade de indução à pluripotência em bovinos, os experimentos foram realizados em paralelo à produção de células iPS humanas e equinas, visando o controle no processo de indução de pluripotência. A otimização do protocolo foi necessária, sendo que a produção de iPS bovinas com eficiência foi conseguida somente com a utilização de vetores murinos.

Foi utilizado para a produção de células iPS nas três espécies desse estudo o vetor policistrônico STEMCCA (Millipore). Por ser policistrônico (OCT4, SOX2, c-MYC e KLF4), espera-se que efeito da introdução de genes exógenos seja diminuído se

comparado à introdução múltipla dos fatores, colaborando com uma comparação mais efetiva e confiável.

Três artigos e uma carta ao editor reportando a derivação de células pluripotentes induzidas bovinas foram publicados nos últimos dois anos. O primeiro (SUMER et al., 2011) utilizou os vetores retrovirais murinos pMX-Oct4, pMX-Sox2, pMX-c-Myc, pMX-Klf4 e pMX-Nanog. Neste experimento, foi concluído que a presença de *Nanog* é fundamental para a reprogramação das células bovinas.

Neste presente estudo foi delineado um experimento de modo a testar o efeito do NANOG em células bovinas, plaqueadas em MEF ou Matrigel, durante o período de reprogramação celular *in vitro* (dados não mostrados). Células humanas também foram submetidas ao mesmo procedimento, tornando-se um controle do processo. As células humanas completaram a reprogramação independente da presença de NANOG, sendo que as colônias derivadas em MEF apresentaram-se morfologicamente mais características do que aquelas cultivadas em Matrigel. Já as células bovinas não apresentaram colônias, independentemente da adição do NANOG ou do substrato utilizado. Entretanto, novamente houve o aparecimento de estruturas semelhantes a colônias em aproximadamente 15 dias pós-transdução, porém, tais formações não se mantiveram por mais de 4 dias.

Resultados preliminares da análise de expressão diferencial realizada através de sequenciamento de RNA entre células bovinas cultivadas em Matrigel transduzidas com hSTEMCCA ou hSTEMMCA+NANOG evidenciaram cerca de 250 genes com resultado significativo de um total aproximado de 6000 genes encontrados. Dentre os genes diferencialmente expressos podem ser observados genes relacionados à sinalização intracelular via de MAP quinase (MAPK6), desenvolvimento embrionário e de tecidos (FOXJ3), replicação e reparo de DNA mitocondrial (TFAM), MHC classe 1 (BOLA), metabolismo intracelular (TMED), apoptose (FADD), divisão celular (MZT1, STAG2), e metabolismo (IBP5, IGF2), dentre outros. É interessante ressaltar que a regulação epigenética do gene IGF2, em especial, é sabidamente importante na reprogramação correta através da transferência de núcleo (PERECIN et al., 2009).

No nosso estudo, a expressão gênica de células iPS humanas apresentou, além dos já esperados OCT4 e SOX2, NANOG específico endógeno, uma vez que o vetor STEMCCA não contem este cDNA. Nestas células, é possível afirmar que o NANOG pode

ser considerado um repórter de pluripotência, uma vez que sua expressão foi ativada e encontra-se presente em células cultivadas por longo tempo *in vitro*. A expressão do NANOG endógeno bovino, porém, não foi encontrada nas células iPS bovinas, apesar destas comprovadamente apresentarem diferenciação em corpos embrioides, perda de morfologia após diferenciação *in vitro* e, especialmente, a formação tumoral *in vivo*.

Como descrito em Material e Métodos, as células foram cultivadas em Matrigel por 24h antes da coleta para extração do RNA, com a finalidade de evitar a contaminação de cada amostra com as MEFs, que sabidamente expressam OCT4. É possível que essas células tenham expressado NANOG e tal expressão foi perdida nas 24h de cultivo em Matrigel, como será discutido no Capítulo 4. Outra possibilidade seria a regulação gênica diferencial entre células humanas e bovinas, onde talvez a transcrição do NANOG não tenha um papel decisivo na manutenção da pluripotência em bovinos. Um estudo mais profundo sobre os efeitos do NANOG em células no período de reprogramação e já reprogramadas deverá ser conduzido com a finalidade de conhecer as vias e mecanismos influenciadas por este fator de transcrição em bovinos.

No segundo artigo relatando a produção de células iPS bovinas, HUANG et al. (2011) demonstraram a produção das células com a utilização de um vetor policistrônico não integrativo contendo os cDNAs bovinos para OCT4, SOX2, KLF4 e c-MYC, sendo cada um controlado por um promotor independente. Foram utilizados LIF e inibidores de MEK1/2 e GSK3 ('2i'). Neste estudo, porém, as células em cultivo adquiriram uma característica quiescente, ou seja, as células bovinas semelhantes às iPS não foram capazes de expansão *in vitro*. Tal informação é extremamente interessante uma vez que o estado "iPS-like" descrito por Huang e colaboradores, talvez possa também ter ocorrido às nossas primeiras colônias encontradas (morfologicamente caracterizáveis, porém sem sucesso ao repique).

Já no terceiro artigo, CAO et al. (2012) descrevem a derivação de potenciais células pluripotentes bovinas com a utilização do vetor OCT4 contendo cDNA humano, e dos vetores SOX2, C-MYC e KLF4 suínos. É importante ressaltar neste momento, que, os três não se reproduzem, ou seja, quando afirmado que o fator NANOG seria imprescindível, outros artigos mostraram que não; além disso, foram utilizados nos três artigos cDNAs de espécies diferentes (murino, bovino, suíno), e que

resultaram em células com características diferentes.

Na carta ao editor de Han e colaboradores em 2011, os autores reportaram que linhagens produzidas com os fatores OKSM mais LIN28 e NANOG mantiveram morfologia típica por mais de 16 passagens, enquanto que linhagens produzidas com somente os fatores OKSM bovinos ou humanos não puderam ser repicadas por mais de seis passagens. As células que foram reprogramadas eficientemente, assim como no nosso estudo, não apresentaram expressão de NANOG quando analisadas quantitativamente, porém, apresentaram a proteína NANOG analisada por imunofluorescência. No presente estudo, portanto, a detecção de NANOG endógeno por imunofluorescência será realizada, e sendo esta constatada, poderemos afirmar que as biPS descritas aqui serão similares às biPS reportadas por Han e colaboradores (Han et al., 2011).

A produção de células iPS humanas, equinas e bovinas mostrou-se eficiente e reproduzível, atestando o sucesso quanto à reprogramação induzida (Tabela 2). Ainda é necessária a detecção de marcadores de superfície como SSEA1, SSEA4, TRA-1-60 e TRA-1-81 para completar a caracterização destas céulas. Tornou-se claro que para a indução da pluripotência em bovinos foram necessárias modificações na indução destas células à pluripotência.

Tabela 2: Resumo das características encontradas na células iPS humanas, equinas e bovinas geradas neste estudo.

	hiPS	eiPS	biPS
Vetor	hSTEMCCA	hSTEMCCA	mSTEMCCA
Repique	manual	enzimático	enzimático
FA	+	+	+
CEs	+	+	+
NANOG	n/a	+	-
Diferenciação *in vitro* espontânea	+	-	+
Formação tumoral *in vivo*	-	-	+

Em consequência da ainda não existência de células-tronco pluripotentes embrionárias nesta espécie, porém, da possibilidade de reprogramação de células bovinas mediantes fatores de transcrição específicos, assim como através da transferência de núcleo, uma atuação conjunta destas tecnologias poderá ser benéfica ao entendimento do processo de reprogramação como um todo. Desta maneira, no próximo capítulo as células bIPS foram adicionalmente caracterizadas quanto à sua origem e contribuição para o desenvolvimento de organismos geneticamente idênticos a estas células.

CAPÍTULO 4: CONTRIBUIÇÃO DAS BIPS EM ESTRATÉGIAS REPRODUTIVAS PARA A PRODUÇÃO DE INDIVÍDUOS GENETICAMENTE IDÊNTICOS *IN VITRO*

CAPÍTULO 4: CONTRIBUIÇÃO DAS BIPS EM ESTRATÉGIAS REPRODUTIVAS PARA A PRODUÇÃO DE INDIVÍDUOS GENETICAMENTE IDÊNTICOS *IN VITRO*

INTRODUÇÃO

A reprogramação de células somáticas a um estado indiferenciado, similar à pluripotência embrionária, vem sendo realizada há tempos através de diferentes processos. No processo de fusão celular, uma célula somática é fusionada a uma célula embrionária, sendo reprogramada ao estado pluripotente. As células resultantes, porém, tornam-se tetraplóides, uma grande desvantagem para sua utilização visando a terapia celular. Já o processo de transferência de um núcleo somático ou clonagem já mostrou-se capaz de produzir milhares de animais saudáveis de diferentes espécies (CIBELLI, J., 2007a). A eficiência desta técnica, porém, ainda é comprometida provavelmente por falhas epigenéticas, levando a uma baixa taxa de sucesso de nascimentos de animais saudáveis. Mais recentemente, através de um experimento revolucionário, a reprogramação nuclear direta na célula somática foi alcançada com a introdução e expressão de fatores de transcrição conhecidos, designados fatores de indução à pluripotência (TAKAHASHI; YAMANAKA, 2006; OKITA; ICHISAKA; YAMANAKA, 2007; TAKAHASHI et al., 2007; WERNIG et al., 2007).

Os mecanismos pelos quais a pluripotência induzida e a transferência nuclear atuam reprogramando uma célula diferenciada ainda não são totalmente elucidados. De um lado, se os mecanismos da reprogramação nuclear realizada pelos oócitos vierem a ser entendidos, tais informações serão utilizadas para aumentar a eficiência de conversão de fibroblastos em iPSC. Por outro lado, os mecanismos de expressão gênica pelos quais a indução da pluripotência ocorre podem ser dissecados a ponto de serem repetidos em experimentos de transferência nuclear. Em especial, as próprias células iPS são provavelmente o próximo passo para a clonagem, se o conceito de facilidade em reprogramar células menos comprometidas ou indiferenciadas manter-se válido.

Neste trabalho estudou-se a possibilidade de produzir embriões derivados de agregação ou TNCS, completando desta maneira a caracterização da pluripotência das células iPS realizada no capítulo 3, e também viabilizando a produção de animais geneticamente idênticos.

Desta maneira, foram analisados o desenvolvimento *in vitro* e *in vivo* inicial de bovinos clonados produzidos a partir de células iPS bovinas sabidamente pluripotentes, assim como a possibilidade de geração de embriões após agregação entre biPS e trofectoderma derivado de embriões produzidos por fertilização *in vitro*. É esperado que as biPS produzidas neste estudo sejam capazes de contribuir integralmente para a geração e desenvolvimento de animais geneticamente idênticos, além de exercerem um efeito benéfico na capacidade de desenvolvimento embrionário, reconhecimento e manutenção da gestação, podendo ser resultante de uma melhor reprogramação nuclear pela clonagem.

MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos aqui descritos são aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos – FZEA/USP (anexo 1).

Células doadoras de núcleo

Fibroblastos fetais bovinos foram recuperados de uma gestação *Bos indicus* x *Bos taurus* de aproximadamente 40 dias de gestação, macho, como descrito anteriormente no capítulo 3. A produção das células iPS bovinas está descrita no capítulo 3. Neste estudo foram utilizadas as linhagens biPS 2 e bFF, esta como controle.

Todas as rotinas de transferência de núcleo incluíram o grupo biPS, consistindo nos embriões reconstituídos com células iPS, assim como o grupo fibroblasto, consistindo nos embriões reconstituídos com fibroblastos fetais. Ambas as linhagens celulares utilizadas como doadoras de núcleo foram genotipadas em empresa especializada (Genoa Biotecnologia). Para tal, o DNA de bFF e biPS foi extraído com o *Tissue and Blood kit* (Qiagen) segundo recomendações do fabricante, quantificado em Nanodrop (Nanodrop 2000) e enviado à empresa. Segundo esta, a genotipagem foi baseada na amplificação dos lócus polimórficos de microssatélites de acordo com protocolo da *International Society for Animal Genetics* (ISAG). Os produtos de amplificação foram analisados em sequenciador através de sistema de eletroforese em capilar com auxílio de softwares.

Em uma das rotinas de transferência de núcleo realizadas foram utilizadas células biPS 2 expressando o gene repórter eGFP, para uma visualização clara da origem celular na produção embrionária. O processo de produção das células biPS2-GFP está descrito a seguir:

Introdução do gene repórter eGFP nas biPSC

Células iPS da linhagem biPS2 cultivadas em MEFs foram transduzidas com o lentivírus contendo a o gene repórter da proteína Fluorescente Verde (*enhanced Green Fluorescent Protein*, eGFP) segundo protocolo descrito no capítulo 3, como pequenas modificações. Resumidamente, o vetor lentiviral FUGW (LOIS et al., 2002; BRESSAN et al., 2011) (Fig. 31) foi transfectado por lipofecção em células 293FT. O meio de cultivo utilizado para a produção viral consistiu no meio iPS. A coleta do meio de cultivo foi realizada às 24 e 48h após a transfecção. As células biPS 2 cultivadas em placas de 35mm recobertas com MEFs foram incubadas por 12 a 16 horas com 2ml do sobrenadante filtrado coletado, adicionado de polibreno. bFF também foram transduzidas como controle experimental.

Figura 31: Mapa do vetor lentiviral FUGW que contém, além da região codificadora da eGFP (*enhanced* GFP), o promotor constitutivo para ubiquitina. Figura adaptada – Addgene, plasmídeo n. 14883.

Análise da expressão gênica de fatores relacionados à pluripotência

As linhagens celulares utilizadas como doadoras de núcleo em cada rotina foram submetidas à análise de expressão gênica dos genes relacionados à pluripotência OCT4, SOX2 e NANOG, como previamente descrito no capítulo 3 e tabela 1.

Transferência nuclear de célula somática

Foram realizadas um total de cinco rotinas de transferência de núcleo, sendo que destas, quatro foram realizadas com o grupo biPS 2 (passagens 5 a 14) e bFF (passagens 6 a 10), compreendendo um total de 356 oócitos reconstruídos, sendo 203 com biPS e 153 com bFF. Para a análise estatística foi utilizado o teste de Qui-quadrado com um nível de significância de 5% (SAS, 1994). Foi também realizada uma rotina de TNCS com o grupo biPS2-GFP (um total de 102 oócitos reconstruídos, sendo 63 com biPS na passagem 21 e 39 com bFF na passagem 11).

Nas rotinas em que não foram utilizadas biPS-GFP, foi necessário o plaqueamento anterior das células biPS em Matrigel para que fossem retiradas as MEFs do cultivo. Células biPS2 cultivadas em Matrigel por 48h em restrição de soro (KSR) por 24h, assim como bFF cultivados restrição de soro (SFB) por 24h foram utilizadas como doadoras de núcleo nas rotinas de clonagem. Foi considerada restrição de soro o cultivo com meio suplementado com 0,5% de KSR ou SFB, ao invés de 20% KSR e 10% SFB em biPSC e bFFs.

A eficiência da sincronização do ciclo celular foi analisada com a utilização do kit BD Cycletest™ Plus (BD Biosciences) segundo recomendações do fabricante. Foram testadas bFF e biPS sem restrição de soro (controle), com 24 e 48 em restrição de soro. A

leitura do ciclo foi realizada em FACSCalibur (BD Biosciences) e software *Cell Quest*, enquanto que a análise em software *ModFit*, com a colaboração da pesquisadora técnica responsável pelo Setor de citometria de fluxo do Hemocentro de Ribeirão Preto Patrícia Vianna Bonini Palma.

A linhagem biPS2-FUGW foi analisada quanto à presença da eGFP através de microscopia de fluorescência 72h após transdução. Na rotina de transferência de núcleo em que foram utilizadas biPS-GFP, a análise e sorting das células positivas foram realizados imediatamente antes da reconstrução oocitária (FACSAria, Becton Dickinson).

A metodologia utilizada na TNCS é descrita a seguir:

Coleta dos ovários, seleção dos oócitos e maturação in vitro

Oócitos foram coletados de ovários de vacas zebus ou azebuadas oriundas de abatedouro localizado no estado de São Paulo. Os oócitos foram selecionados e maturados em meio de maturação (TCM199 suplementado com 10% de SFB, 0,2 mM de piruvato, 0,5 µg/mL de FSH, 5,0 µg/mL de LH e antibióticos) em microgotas de 90 µl, cobertas com óleo mineral e levados à incubadora a 38,5°C, 5% de CO_2 em ar e máxima umidade.

Retirada do Cumulus oophorus e Seleção do 1º Corpúsculo Polar

Após 18 h do início da maturação, os oócitos foram retirados das gotas de maturação e desnudados em solução de hialuronidase a 2mg/ml em PBS. Sob estereomicroscópio, os oócitos foram selecionados quanto à presença do 1º corpúsculo polar (1ºCP).

Enucleação dos Oócitos e Reconstrução oocitária

Oócitos apresentando o 1ºCP foram incubados por 15 minutos em meio de cultivo contendo 7,5µg/mL de citocalasina B e 10µg/mL de Hoescht 33342 em atmosfera controlada. Após a incubação os oócitos foram transferidos para a gota de micromanipulação constituída de uma solução tamponada.

Com o auxílio de micropipetas montadas em um micromanipulador, os oócitos foram enucleados mediante a aspiração do 1ºCP junto com cerca de 20% do citoplasma adjacente. Em seguida, células somáticas modificadas ou não foram aspiradas no interior da micropipeta de injeção e inseridas no espaço perivitelínico do oócito. Foi realizada a reconstrução embrionária através da fusão das membranas celulares do oócito e da célula. Para tal, os conjuntos foram posicionados entre dois eletrodos paralelos de platina (200 µm de espaço) de uma câmara de fusão em solução de manitol (0,3M) e são submetidos a duas descargas elétricas de 1,75 KV/cm por 45 µs para promover a fusão das membranas do oócito e da célula.

Ativação partenogenética e cultivo embrionário in vitro

Os conjuntos fundidos foram ativados partenogeneticamente 26h após o início da MIV. Resumidamente, os conjuntos foram incubados a temperatura ambiente e no escuro em 5 µM de ionomicina por 5 min em TCM-199 tamponado com Hepes e suplementado com 0,1% de albumina bovina sérica (BSA; Sigma), 22 µg/ml de piruvato de sódio e antibióticos. Em seguida os mesmos foram lavados em TCM-199 tamponado com Hepes e saturado com BSA (3%), seguido da incubação em estufa por 3 h em 2,0 mM de 6-dimetilaminopurina (6-DMAP) diluído em meio de cultivo mSOF (ARNOLD et al., 2006). Por fim, os zigotos (em grupos de 15 a 20) foram lavados e cultivados *in vitro* (CIV) sob óleo mineral em gotas de 90 µL de meio de cultivo com co-cultivo de células do *cumulus* em incubadora a 38,5°C, 5% de CO_2 em ar e máxima

umidade. Após sete dias de cultivo, os embriões clones e partenogenéticos foram avaliados quanto taxa de capacidade de desenvolvimento a blastocisto e qualidade morfológica, transferidos a fêmeas receptoras ou armazenados para estudos posteriores.

Análise da capacidade de desenvolvimento de embriões clonados com células reprogramadas bovinas in vivo

Até o momento foram transferidos um total de 13 embriões, sendo 7 embriões clones reconstruídos com as células biPS 2 e 6 embriões do grupo controle, reconstruídos com a linhagem bFF. Os procedimentos para a transferência de embriões estão descritos a seguir:

Sincronização das vacas receptoras

O ciclo reprodutivo de vacas ou novilhas foi sincronizado segundo o protocolo esquematizado na figura 32.

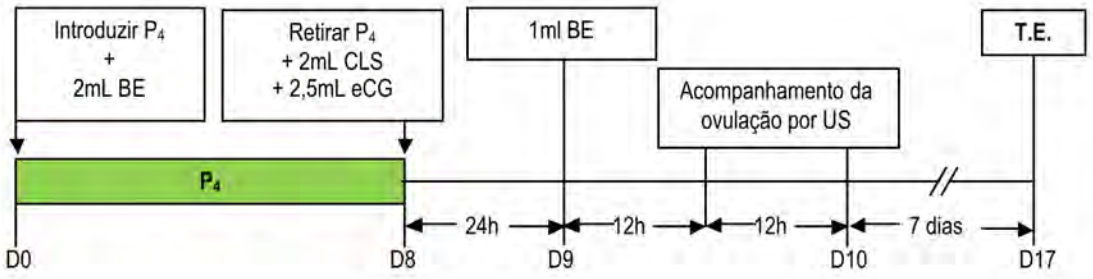

Figura 32: Esquema do delineamento experimental utilizado para a sincronização das vacas receptoras. P4: implante de progesterona, BE: benzoato de estradiol, CLS: cloprostenol sódico, análogo sintético da prostaglandina F2α, US: ultrassonografia, T.E.: transferência de embriões.

Transferência de embriões

Aos sete dias de cultivo *in vitro*, embriões em estágio de blastocisto, blastocisto expandido ou eclodindo foram classificados e envasados para a transferência de embriões. O envase foi realizado em meio H199 suplementado com 2% de SFB, 1% piruvato e 1% antibiótico) em palhetas de 0,25ml (IMV) e lacrados (WTA). As palhetas foram acondicionadas em transportador de embriões (WTA) até o momento da transferência.

Diagnóstico de gestação

O diagnóstico de gestação foi realizado mediante exame de ultrassonografia (Mindrray) aos 30 e 55 dias de gestação.

Reconstrução de blastocistos mediante agregação

A produção de embriões através da agregação de células biPS e pedaços de trofectoderma de embriões fertilizados *in vitro* foi realizada pela doutoranda Isabele Picada Emanuelli (UNESP-Botucatu), sendo esta técnica desenvolvida durante seu doutorado intitulado "Avaliação da exequibilidade da técnica e da taxa de gestação de quimeras bovinas: agregação entre o trofectoderma, produzido *in vivo*, com a massa celular interna oriunda da produção *in vitro* ou de raça termossensível" sob orientação

do Prof. Dr. Marcelo Fábio Vieira Nogueira pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Área de Farmacologia, na Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho", UNESP Campus Botucatu.

Para a obtenção dos fragmentos de TE, blastocistos em D8 ou D9 (em expansão, expandidos ou eclodidos) foram seccionados. Os blastocistos foram depositados em gota de meio TCM Hepes, localizada no centro da tampa de uma placa de Petri (100x20mm,) e submetidos à micromanipulação. Em microscópio invertido com micromanipuladores acoplados, as secções foram realizadas com o auxílio de uma lâmina de aço oxidável. Os embriões foram imobilizados pela pipeta *holding* (VacuTip, Eppendorf) mediante vácuo, e seccionados com um movimento vertical da micro lâmina produzindo, assim, dois fragmentos. A secção foi padronizada para ser, o máximo possível, tangencial à MCI e produzir dois fragmentos. Um deles continha, exclusivamente, TE e o restante toda a MCI e minimamente TE, o qual neste estudo foi descartado.

As células biPS usadas neste experimento foram previamente à agregação incubadas com 10µg/mL de corante de DNA Hoescht 33342 por 10 min e imediatamente lavadas em meio SOF. Como controle, foram realizadas agregações com bFFs também previamente incubados com Hoescht.

Os fragmentos de trofectoderma e as células foram depositados em micro poços feitos em placa de cultivo (IVF 4-*well dishes*, NUNC), preenchidos com meio de cultivo embrionário (SOF) e cobertos com óleo mineral (Sigma). Os micro poços foram produzidos baseados no sistema *Well of the Well* de VAJTA et al. (2000). Os fragmentos e as células foram aproximados entre si (manualmente e mediante um micro capilar com a ponta obliterada) e com uma leve pressão, para que houvesse o máximo de contato entre as partes. Foram utilizadas aproximadamente 15 células por micro poço. Em seguida, eles foram cultivados por 24 horas em incubadora (38,3ºC, 5% CO_2 e umidade saturada). Após o cultivo, a presença de uma agregação embrionária foi verificada pela detecção de uma única e coesa massa celular.

A agregação foi considerada bem sucedida quando, após o cultivo, havia um blastocisto morfologicamente normal no micro poço.

RESULTADOS

Células doadoras de núcleo

A genotipagem das células doadoras de núcleo revelou a mesma origem entre biPS e bFF, como mostrado na tabela 3.

Tabela 3 - Sequenciamento de alelos específicos em células biPS e bFF utilizadas como doadoras de núcleo.

alelos	bFF	biPS
AGLA293	NA/NA	NA/NA
BM1818	262/264	262/264
BM1824	180/180	180/180
BM2113	139/129	139/129
ETH10	213/219	213/219
ETH225	150/160	150/160
ETH3	114/114	114/114
ILSTS006	NA/NA	NA/NA
INRA23	202/200	202/200
SPS115	248/252	248/252
TGLA122	NA/NA	NA/NA
TGLA126	121/121	121/121
TGLA227	77/89	77/89
TGLA53	NA/NA	NA/NA
TGLA57	NA/NA	NA/NA

Análise do ciclo celular das células doadoras de núcleo

A análise do ciclo celular das células doadoras de núcleo mostrou que, apesar de a sincronização do ciclo celular ser eficiente com a restrição de soro nos fibroblastos, não houve sincronização do ciclo nas células iPS quando analisados por citometria de fluxo (tabela 3 e Fig. 33). Nas bFFs a porcentagem de 60,94% de fase G1 encontrada no controle (que apesar de não em restrição de soro, estava entrando em confluência) aumentou para 96,48% e 97,92% quando privadas de soro por 24 e 48h, respectivamente.

No cultivo de células bIPS, apesar de ter sido realizada a restrição do KSR, não foi possível a retirada do fator de crescimento bFGF, uma vez que em experimentos não descritos aqui, a retirada do fator por 24h implica na perda de morfologia típica de células iPS. Células iPS cultivadas em Matrigel sem restrição de KSR apresentaram 45,02% de células em G1, quando em restrição por 24h 36,21% e quando em restrição por 48h, 50,06% (tabela 4).

Tabela 4 - Porcentagens de células doadoras de núcleo em cada estágio do ciclo celular

		Gráfico na figura 33	% G1	% S	% G2
bFF	Ctrl	A	60,94	38,54	0,51
	24h	B	96,48	3,34	0,18
	48h	C	97,92	0,97	1,11
biPS	Ctrl	D	45,02	46,98	8,0
	24h	E	36,21	51,76	12,03
	48h	F	50,06	41,94	8,00

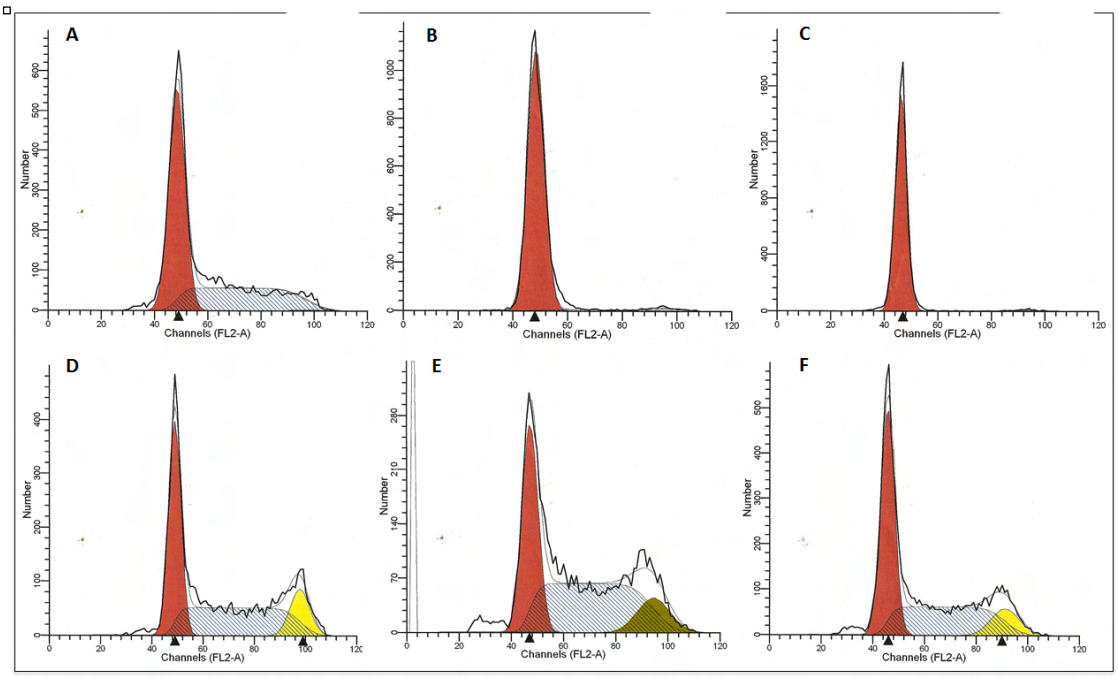

Figura 33: Análise fluxo-citométrica do ciclo celular de células utilizadas como doadoras de núcleo. A: bFF sem restrição. B: bFF com 24h de restrição. C: bFF com 48h de restrição. D: biPS sem restrição. E: biPS com 24h de restrição. F: biPS com 48h de restrição. Vermelho: células G1, cinza: células na fase S, amarelo: células em G2.

Foi observado que durante o cultivo das células doadoras biPS em Matrigel, a morfologia típica das células foi alterada. As células quando repicadas de MEF para Matrigel mantinham a morfologia típica durante as primeiras 24h, a partir de quando células começavam a apresentar formato epitelióide e perder a razão de volume núcleo/citoplasma. A restrição de KSR durante este período parece contribuir para o processo de perda da morfologia típica e possível começo de diferenciação (Fig. 34).

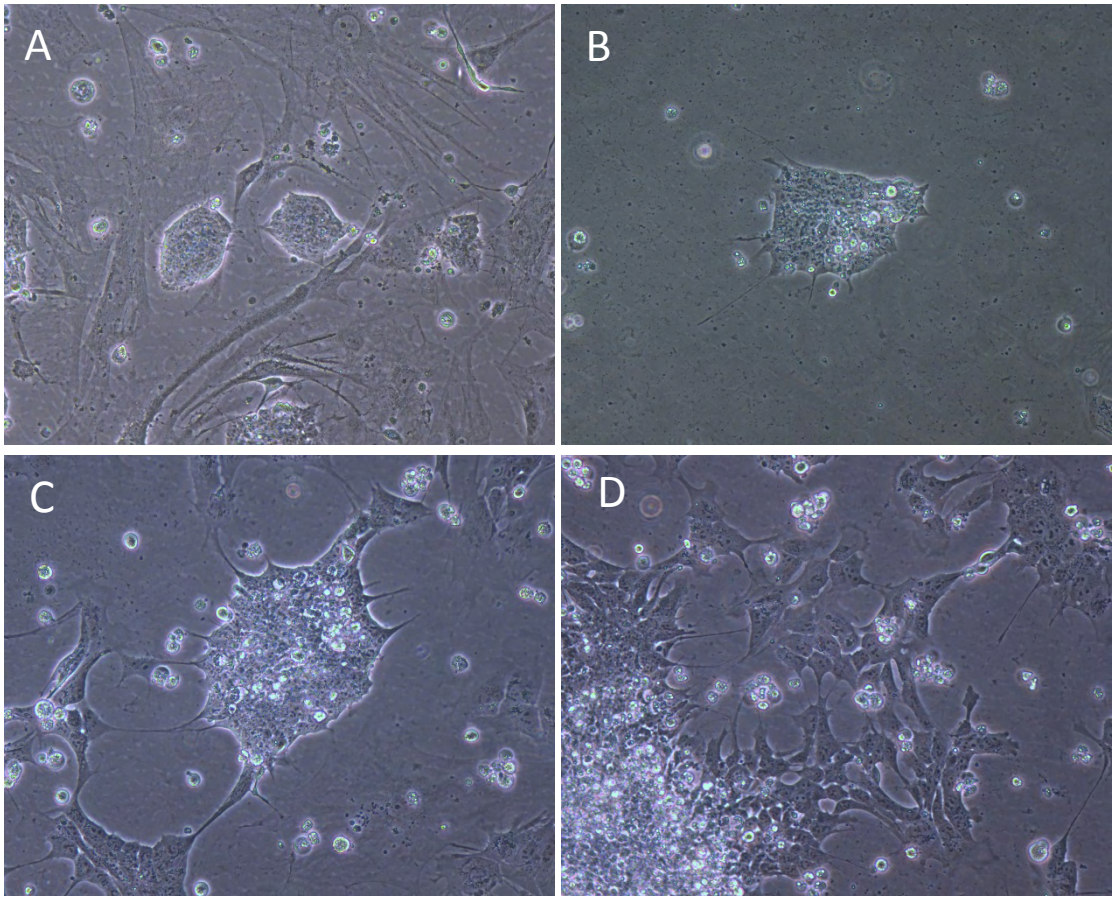

Figura 34: biPSC cultivadas em MEF ou Matrigel em diferentes períodos de restrição de KSR. A: cultivo em MEFs sem restrição de KSR. B: cultivo em Matrigel por 24h sem restrição de KSR. C: cultivo em Matrigel por 48h e restrição de KSR por 24h. D: cultivo em Matrigel por 72h e restrição de KSR por 48h. 200x.

Análise da expressão gênica de fatores relacionados à pluripotência

As células bFF e biPS utilizadas na reconstrução por TNCS foram analisadas quanto a expressão gênica de OCT4, SOX2 e NANOG, considerando como controle destas a linhagem bFF não submetida à restrição de SFB. bFFs e biPS2 expressaram OCT4, sendo que a expressão foi relativamente maior no grupo biPS (Fig. 35). biPS mas não bFF

expressaram SOX2 (Fig. 36). De maneira interessante, assim como no Capítulo 3, não foi encontrada expressão de NANOG em ambos os grupos.

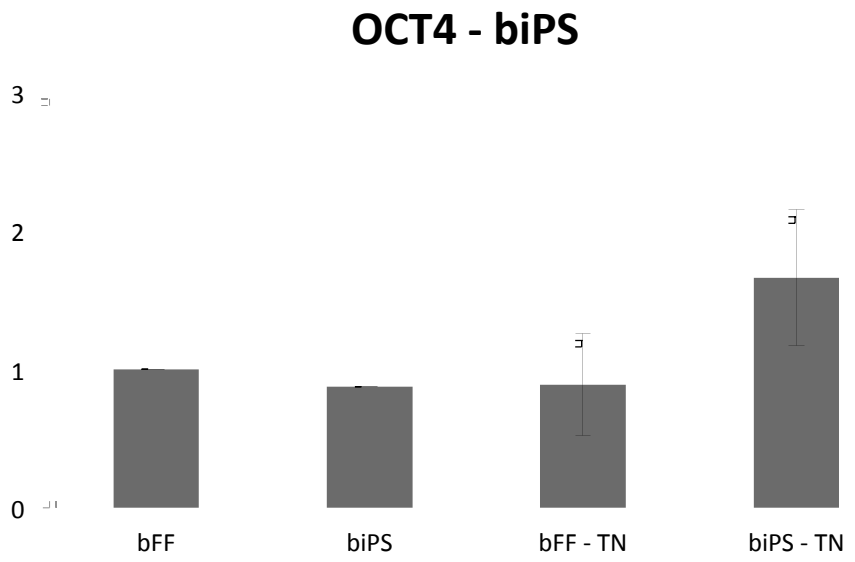

Figura 35: Expressão de OCT4 em linhagens biPS e bFF utilizadas como doadoras de núcleo (em restrição de soro por 24h) quando comparadas à bFF e bIPS não sincronizadas, em unidades arbitrárias.

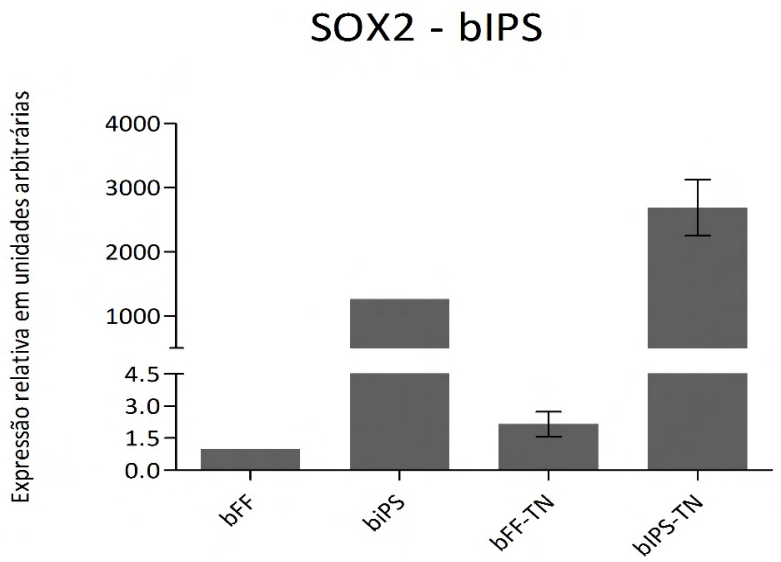

Figura 36: Expressão de SOX2 em linhagens biPS e bFF utilizadas como doadoras de núcleo (em restrição de soro por 24h) quando comparadas à bFF não sincronizada, em unidades arbitrárias.

Transferência Nuclear de Célula Somática

Quando analisadas diferenças na taxa de fusão, clivagem no segundo de cultivo e capacidade de desenvolvimento a blastocisto no sétimo dia de cultivo *in vitro* entre embriões clones reconstruídos com células modificadas ou não, foram constadas diferenças somente na taxa de fusão ($p<0,05$). Pode ser notado, porém, uma diminuição numérica na taxa de clivagem e na capacidade de desenvolvimento a blastocisto, o que pode ter sido causada pela não sincronização do ciclo celular através da restrição de KSR nas biPS ou ainda pelo possível início de perda de pluripotência devido ao plaqueamento das células em Matrigel. Os resultados estão expressos na figura 37.

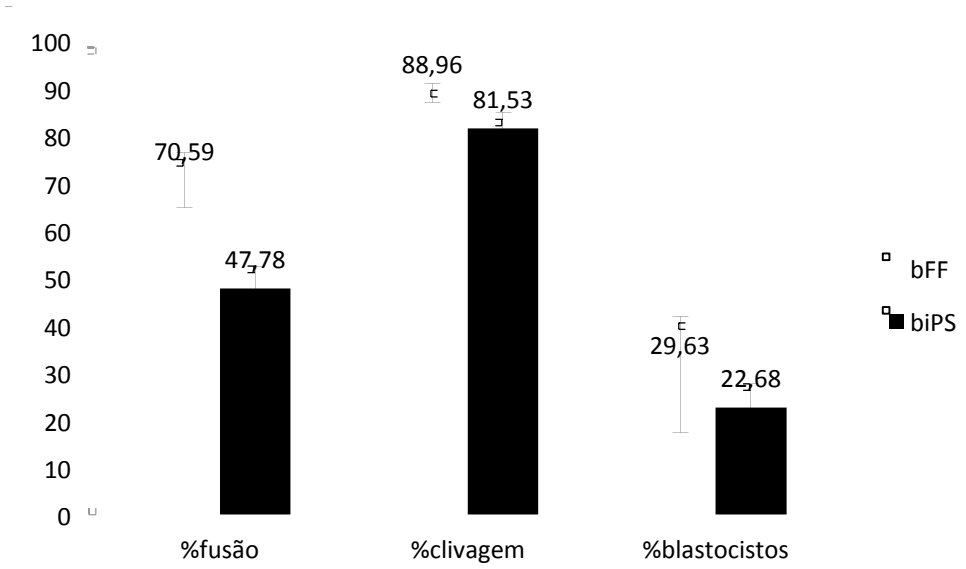

Figura 37: Porcentagens de fusão, clivagem e blastocistos no sétimo dia de cultivo produzidos através da transferência de núcleo de bFF ou células biPS.

Na rotina de transferência de núcleo utilizando as células positivas para GFP (Fig. 38 e 39), as células foram cultivadas em restrição de soro por 24h, porém em MEFs, uma vez que a separação das células biPS positivas pode ser feita das MEFS ou células iPS negativas através do sorting (Fig. 40). Pode ser observado um aumento numérico na produção embrionária a partir de células reconstruídas com biPS, mesmo essas não

sincronizadas quanto ao ciclo celular (Fig. 41). Essa taxa deverá ainda ser confirmada com a realização de repetições de rotinas de clonagem com as células expressando o gene repórter.

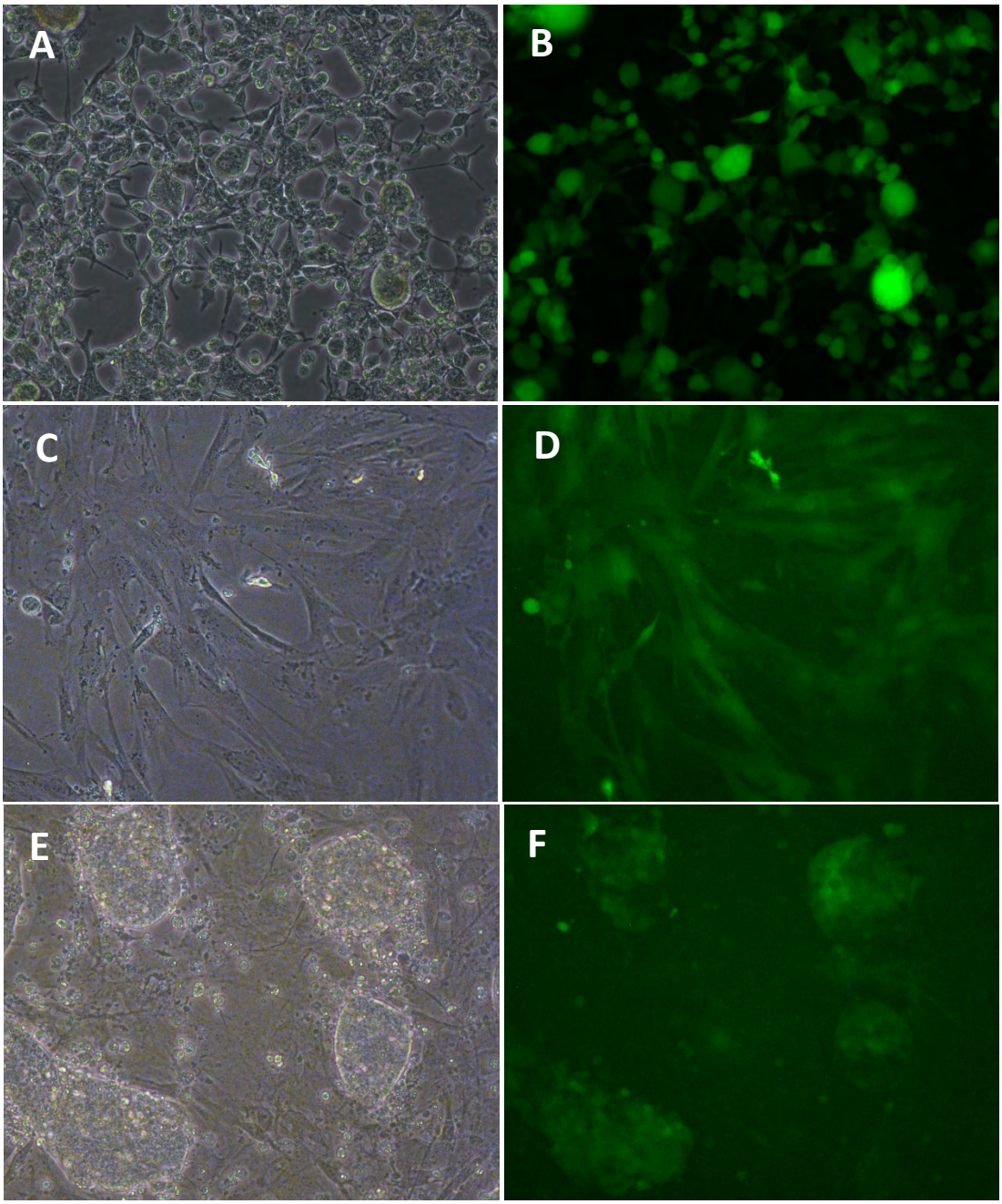

Figura 38: Produção de células biPS expressando eGFP. A e B: células 293 FT após 24h de transfecção com o vetor FUGW. C e D: fibroblastos fetais bovinos utilizados como controle da transdução. E e F: células biPS expressando a eGFP. 200x.

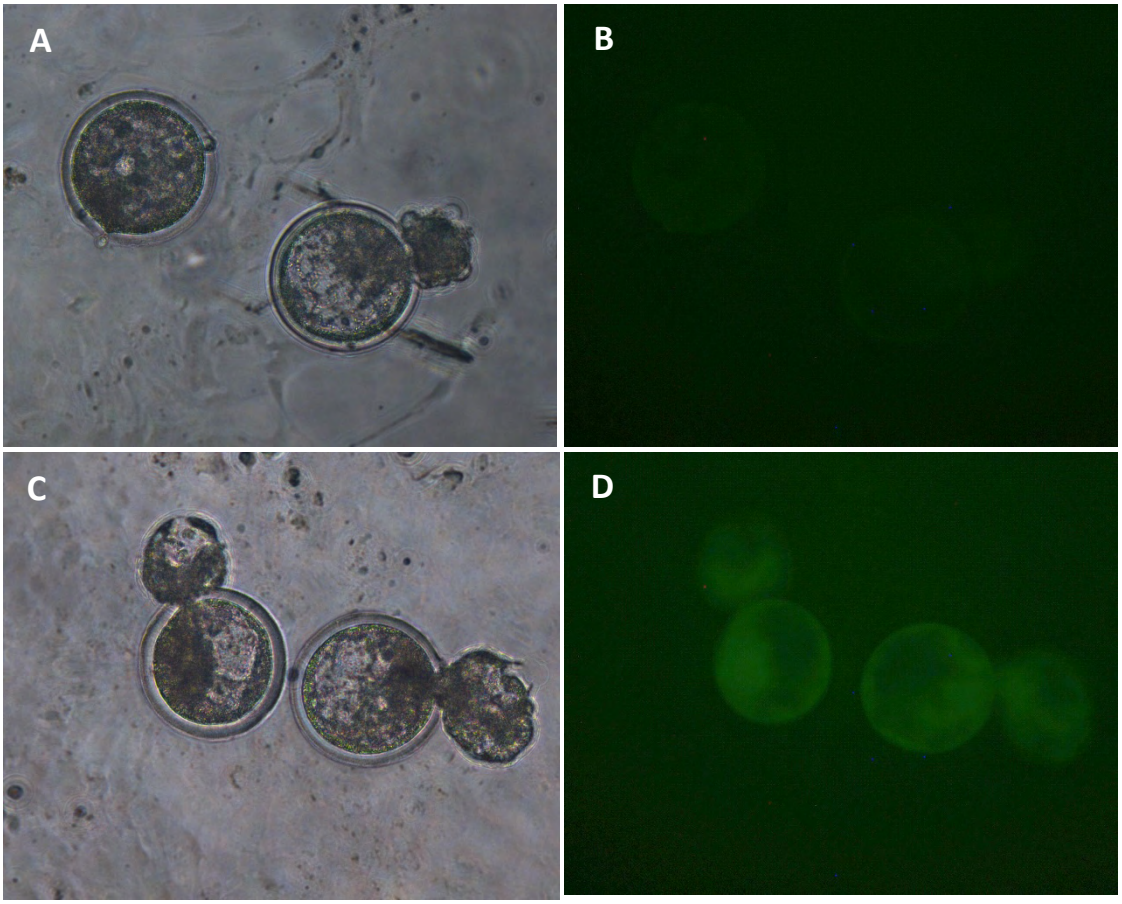

Figura 39: Produção de embriões clones a partir de bFF ou biPS expressando eGFP. A e B: embriões clones reconstruídos com bFF sob luz branca e luz UV, respectivamente. C e D: embriões clones reconstruídos com biPS2-GFP sob luz branca e luz UV, respectivamente. 200x.

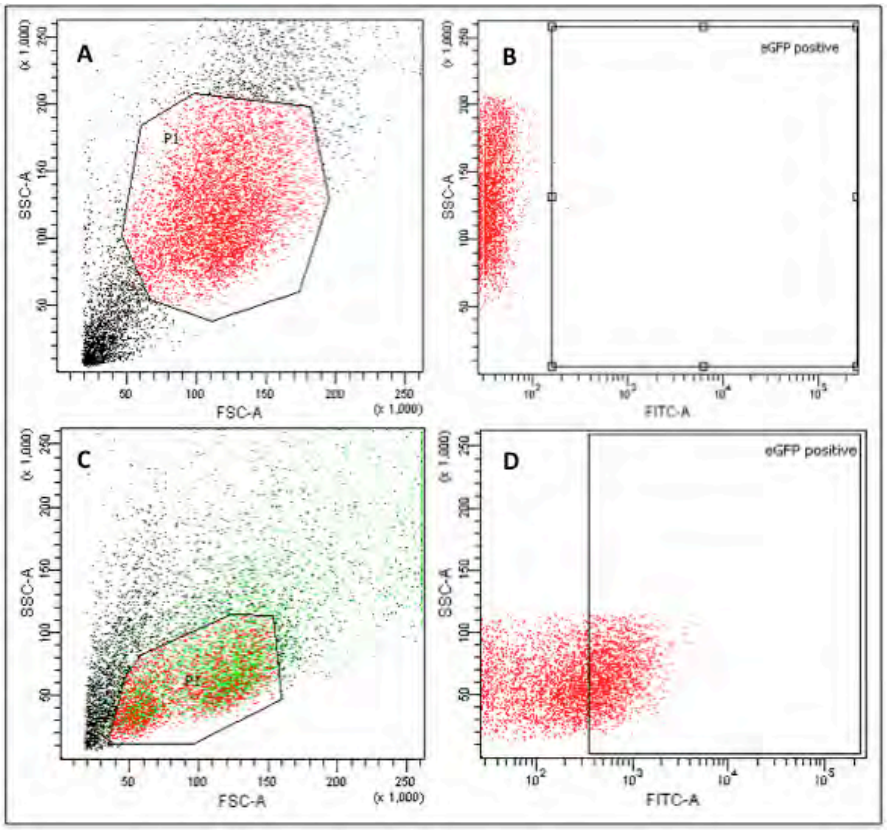

Figura 40: Análise fluxo-citométrica de das populações bFF (A e B) e iPS-GFP (C e D) apresentando a relação entre tamanho e complexidade celular (A e C) e fluorescência da eGFP (B e D).

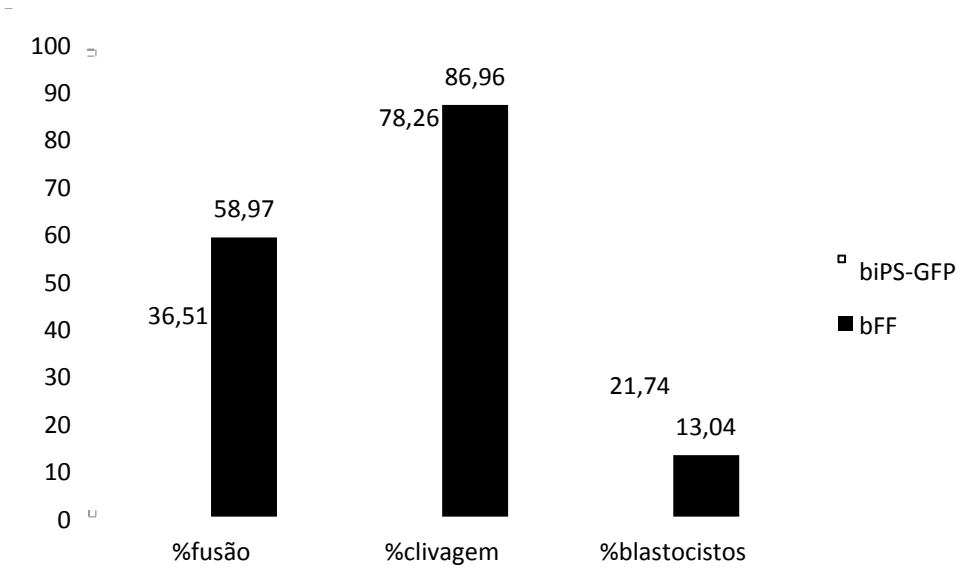

Figura 41: Porcentagens de fusão, clivagem e blastocistos no sétimo dia de cultivo produzidos através da transferência de núcleo de bFF ou células biPS-GFP.

Análise da capacidade de desenvolvimento de embriões clonados com células reprogramadas bovinas in vivo

A capacidade de desenvolvimento *in vivo* inicial está sendo analisada através da transferência de embriões reconstituídos com biPS ou bFF. Aos 30 dias de gestação, quatro dentre sete receptoras foram diagnosticadas como prenhes de embriões derivados de biPS (57,14%) enquanto que quatro dentre seis receptoras foram diagnosticadas como prenhes de embriões derivados de bFF (66,67%). Já aos 55 dias de gestação, somente uma receptora que recebeu embrião reconstruído com biPS, e três receptoras que receptoras que receberam embriões reconstruídos com bFF estavam prenhes (tabela 5).

Tabela 5 - Diagnóstico de gestação de embriões clonados com células biPS ou bFF aos 30 e 55 dias de gestação.

	TE (n)	% DG30	% DG55
biPS	7	57,14 (4/7)	14,29 (1/7)
bFF	6	66,67 (4/6)	50,0 (3/6)
Total	13	61,53 (8/13)	38,46 (5/13)

Reconstrução de blastocisto mediante agregação

Após 24h de cultivo no sistema de micro poços, as duas rotinas de agregação de células biPS com trofectoderma de embriões FIV produziram embriões apresentando agregação de células biPS (coradas com Hoechst) de maneira coesa, morfologicamente

semelhante à formação de uma massa celular interna, em 78,57% das agregações (tabela 5, Fig. 42). Não foram encontradas agregações nos trofectodermas cultivados com bFFs (n=4).

Tabela 5 - Agregação de trofectoderma derivado por FIV com células biPS.

Tentativas de agregação (*n*)	% Agregação de todas as células (*n*)	% Agregação de parte das células (*n*)	% Agregação total (*n* de todas as células+ *n* parte das células)	% Ausência de agregação (*n)*
28	35,71 (10)	42,86 (12)	78,57 (22)	21,43 (6)

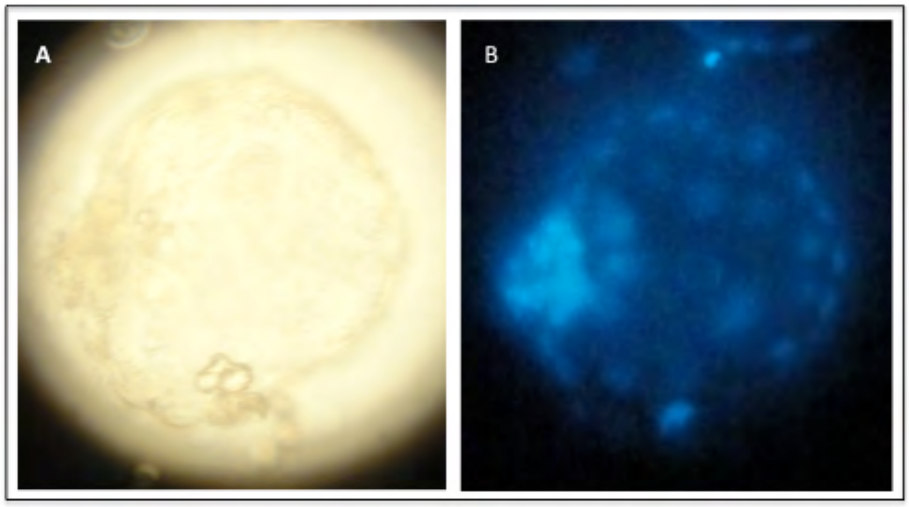

Figura 42: Imagens de um blastocisto reconstituído a partir de pedaços de trofectoderma de embriões FIV e células biPS.

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES PARCIAIS DO CAPÍTULO 4

Este capítulo mostra a possibilidade de geração de embriões e gestações derivados de células iPS bovinas.

A agregação de trofectodermas oriundos de embriões FIV às células iPS é mais uma prova da pluripotência destas células. Ainda serão necessários estudos que incluam o desenvolvimento *in vitro* destes embriões para a confirmação da contribuição das biPS na formação de um novo indivíduo, e principalmente, na contribuição nas células germinativas. O modelo biPS expressando eGFP poderá será adotado para tal, facilitando desta maneira a visualização da contribuição celular. Além de mostrar a pluripotência definitiva destas células, a agregação embrionária ainda pode servir como estratégia de produção de animais geneticamente idênticos ou clones. Para tal, células adultas podem ser reprogramas à pluripotência (produção de células iPS como descrito neste estudo), utilizadas na agregação embrionária com trofectoderma de embriões produzidos *in vitro* ou mesmo *in vivo*. Desta maneira, a placenta deste animal deverá será originada destes embriões, e portanto, espera-se que a falha na reprogramação epigenética encontrada na placenta de animais clones, não seja observada nestes produtos de agregação.

Nos experimentos de reprogramação mediante transferência de núcleo, fatores complicadores foram encontrados quando utilizadas células biPS como doadoras de núcleo. É sabido que a sincronização do ciclo celular em G0/G1 de células doadoras núcleo celular é importante para o sucesso da técnica de TNCS como descrita neste estudo, utilizando oócitos em metáfase 2 (CAMPBELL, 1999; WELLS et al., 2003). Essa sincronização normalmente é realizada através de duas maneiras, ou da combinação destas: a restrição de soro no meio de cultivo ou então o cultivo das células em confluência, onde há a inibição da divisão celular mediada por contato.

No cultivo das células iPS, assim como seria com as células-tronco embrionárias, a sincronização por contato (confluência) não é possível devido à característica de crescimento destas células, que se organizam em colônias e não suportam a confluência

sem diferenciarem.

Quando o KSR foi utilizado em restrição no meio de cultivo para sincronização do ciclo celular, de maneira semelhante ao protocolo de restrição utilizado em fibroblastos (restrição de SFB), não houve a sincronização do ciclo nestas células. A não retirada do fator bFGF pode ser um fator favorável à não sincronização celular; porém, um estudo específico sobre a sincronização celular de células iPS a serem submetidas à transferência de núcleo é necessária para um melhor entendimento do comportamento destas células durante o processo de transferência de núcleo.

Quando analisadas as taxas de fusão, clivagem e desenvolvimento a blastocisto, houve uma diminuição na taxa de fusão célula-oócito quando iPSC foram comparadas a bFF, mas não da clivagem ou taxa a blastocisto. Duas características destas células podem ter contribuído para tal diferença: o tamanho menor, diminuindo assim a superfície de contato entre célula e oócito; e talvez alguma mudança na composição de sua membrana celular, uma vez que essas células se organizam de modo diferente, agrupadas em colônias, e portanto sua junções comunicantes e de adesão devem ser diferentes das encontradas em bFF.

Apesar de a capacidade de desenvolvimento *in vitro* de embriões não ter se mostrado diferente ou melhor nas células iPS quando comparada às bFF, se forem levadas em consideração a proporção de células em G1/G0 de biPS e bFF doadoras de núcleo, relacionando-as com as taxas de desenvolvimento a blastocisto, ou seja, se as células iPS estivessem sincronizadas do mesmo modo que as bFF, considerando somente o efeito da sincronização célula na produção embrionária, as células biPS teriam produzido 2,66 vezes mais embriões (uma taxa de 60,43%) do que as bFF. Esse número é somente uma estimativa do potencial das iPS em serem melhor reprogramadas pela TNCS, lembrando que o desenvolvimento de protocolos visando o aumento de eficiência da utilização de células pluripotentes na clonagem deverá ser realizado.

Desta maneira, uma vez que a sincronização do ciclo celular não é possível nas células iPS mediante restrição de soro ou confluência celular, alternativas deverão ser procuradas e testadas para a utilização destas células na clonagem. Uma possibilidade bastante exequível é a realização da TNCS com oócitos em telófase, além da

sincronização celular utilizando fármacos como a roscovitina. Em um estudo reportado por BORDIGNON; SMITH (2006), células tratadas com roscovitina, apresentando alta porcentagem de células em S/G2 foram utilizadas na reconstrução de oócitos em telófase II, resultando em taxas de desenvolvimento a blastocisto similares àquelas obtidas quando células sincronizadas em G0/G1 por confluência foram utilizadas na reconstrução de oócitos me metáfase II (BORDIGNON; SMITH, 2006).

Outra observação a ser discutida é a perda de morfologia típica das células doadoras de núcleo quando cultivadas em Matrigel. Como demonstrado em resultados, com 48h de cultivo na matriz algumas células do cultivo já se apresentam menos arredondadas e mais epitelioides, e com menor razão núcleo/citoplasma. É de se esperar, portanto, que a expressão gênica relacionada à manutenção da pluripotência destas células seja diferente daquelas cultivadas em MEFs. Uma solução elegante para tal é a introdução de um gene repórter, preferencialmente de manifestação visual, como por exemplo, a expressão de proteínas fluorescentes. Desta maneira, a separação das células biPS positivas das células biPS negativas, e principalmente, das MEFs, negativas, é de simples execução através da citometria de fluxo e *sorting*. Tal estratégia deverá ser melhor explorada em experimentos futuros.

Da mesma maneira que as biPS não submetidas à privação de soro, células biPS utilizadas nas rotinas de TNCS não apresentaram expressão endógena de NANOG. Como discutido no capítulo 3, Han et al., em 2011, reportaram a produção de células iPS bovinas com a transdução de 6 fatores bovinos (OKSM + Lin28 e NANOG) que também não expressaram NANOG na análise de expressão gênica quantitativa, porém, a proteína NANOG foi detectada através de imunofluorescência. Também neste trabalho, estas células foram utilizadas na TNCS e resultaram em embriões com morfologia e número de células similares entre os grupos reconstruídos com biPS; porém, não é descrita a informação sobre a sincronização do ciclo celular anterior à TNCS ou mesmo sobre a comparação da capacidade de desenvolvimento a blastocisto entre os embriões reconstruídos com iPS ou fibroblastos.

A utilização de iPS na TNCS também foi recentemente realizada em camundongos (ZHOU et al., 2010; LIU, Z. et al., 2012) e em suínos (CHENG et al., 2012). A TNCS de iPS

em camundongos foi realizada com a sincronização do ciclo celular em metáfase com demecolcina, um protocolo de TNCS diferente do usualmente utilizado para bovinos. No estudo em suínos, foi reportado que a utilização das células iPS não levou a uma maior taxa de desenvolvimento a blastocisto quando analisadas as taxas em cima de embriões cultivados, porém, apresentou uma maior taxa de desenvolvimento em relação ao controle quando analisadas em cima de clonagem. Entretanto, a descrição da TNCS deste estudo não indica se foi e como foi realizada a sincronização do ciclo celular nas células doadoras de núcleo.

Finalmente, sendo discutidos aqui alguns fatores complicadores para a utilização de células iPS na TNCS, fica clara a necessidade de estudar vias de execução da TNCS com células sabidamente expressando os fatores relacionados à pluripotência, e utilizá-los como doadores de núcleo. Neste sentido, bFF sabidamente expressando os dois fatores de transcrição mais importantes na aquisição e manutenção da pluripotência celular - OCT4 e SOX2, juntamente a proteínas fluorescentes repórteres diferentes foram utilizados como doadores de núcleo para a análise de um possível efeito individual destes na produção *in vitro* de clones bovinos, como descrito no capítulo 5.

CAPÍTULO 5: ESTUDO DA CONTRIBUIÇÃO DE FATORES RELACIONADOS À PLURIPOTÊNCIA NO DESENVOLVIMENTO *IN VITRO* DE EMBRIÕES BOVINOS

CAPÍTULO 5: ESTUDO DA CONTRIBUIÇÃO DE FATORES RELACIONADOS À PLURIPOTÊNCIA NO DESENVOLVIMENTO *IN VITRO* DE EMBRIÕES BOVINOS

INTRODUÇÃO

Com o objetivo de obter maior conhecimento sobre os mecanismos da diferenciação celular, a hipótese dos experimentos mais iniciais sobre a reprogramação celular foi que células pluripotentes expressam um conjunto único de fatores responsáveis pelo estado de indiferenciação ou pluripotência. Dois fatores de transcrição, o OCT4 e o NANOG, foram os primeiros a serem identificados como essenciais para tanto o desenvolvimento embrionário inicial quanto para a manutenção da pluripotência de células-tronco (NICHOLS et al., 1998; MITSUI et al., 2003). Foi mostrado também que o SOX2, outro fator de transcrição, heterodimeriza com o OCT4, atuando na regulação de diversos genes em células pluripotentes (BOYER et al., 2005). Desta maneira, é conhecido hoje que os fatores OCT4, SOX2 e NANOG, apesar de não os únicos, são essenciais para a regulação do estado de pluripotência encontrado nas células embrionárias.

Desta maneira, este estudo objetivou utilizar células doadoras de núcleo expressando fatores de transcrição sabidamente importantes no processo de indução e manutenção de pluripotência – OCT4 e SOX2 no processo de transferência nuclear. Um melhor entendimento sobre a influência de cada fator reprogramador é necessária para a promoção de uma melhor reprogramação nuclear, além da geração de um modelo de estudo dos mecanismos de expressão gênica responsáveis pela indução à pluripotência.

MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos aqui descritos são aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos – FZEA/USP (anexo 1).

Cultivo celular

Fibroblastos fetais bovinos foram derivados e cultivados como descrito no capítulo 3 e utilizados também no capítulo 4.

Preparação dos vetores lentivirais

Vetores lentivirais contendo os genes Oct4-vexGFP e Sox2-mCitrine, reportados pela literatura por Papapetrou e colaboradores em 2009 (Fig. 43) foram utilizados neste estudo.

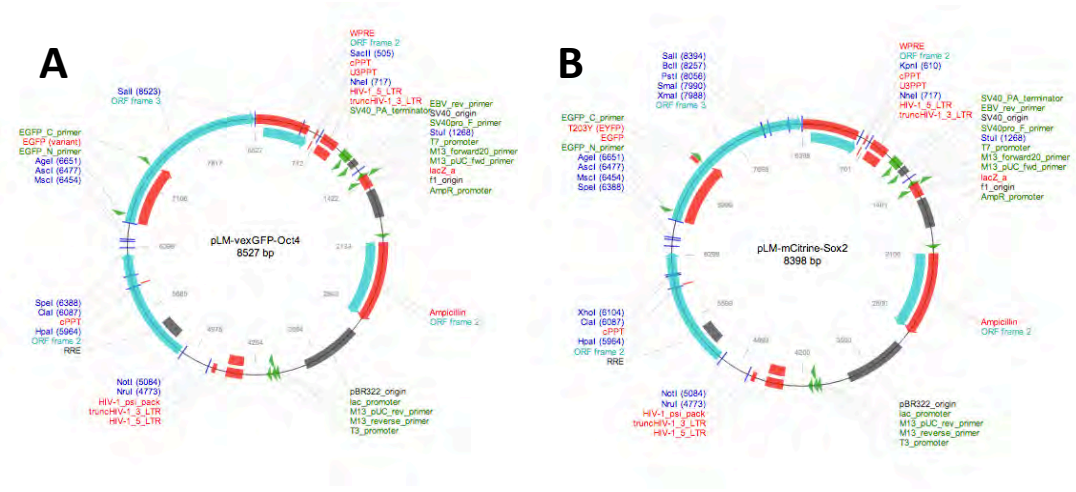

Figura 43: Mapa dos vetores lentivirais pLM-vexGFP-Oct4 (A) e pLM- mCitrine- Sox2 (B). Figura adaptada – Addgene, plasmídeos n. 22240 e n. 23242, respectivamente.

Preparação dos plasmídeos

Os plasmídeos foram providos em *stabs* bacterianos à temperatura ambiente. Ao recebimento, as culturas foram inoculadas em placas de ágar Luria-Bertani (LB) e deixadas em estufas a 37ºC por aproximadamente 16 horas. Uma colônia isolada contendo cada plasmídeo de interesse foi submetida à preparação de plasmídeo pelo kit MaxiPrep EndoFree Qiagen, segundo recomendações do fabricante.

Produção das partículas lentivirais

Antes da produção viral, todos os plasmídeos foram testados funcionalmente em transfecções de células 293FT (Invitrogen), empacotados com plasmídeos auxiliares para produção de lentivírus de terceira geração (Fig. 44). A produção lentiviral foi realizada como descrito no capítulo 3. O resultado foi analisado por microscopia de fluorescência (Fig. 45).

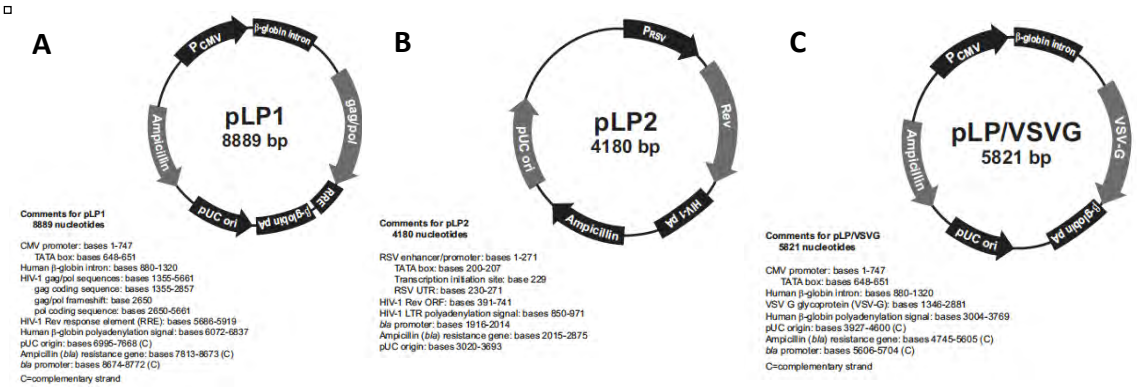

Figura 44: Mapa dos vetores auxiliares para produção lentiviral de terceira geração. A: pLP1, contendo gag/pol. B: pLP2 contendo Rev. C: pLP/VSVG. Figura adaptada do catálogo *Virapower lentiviral kit* (Life Technologies).

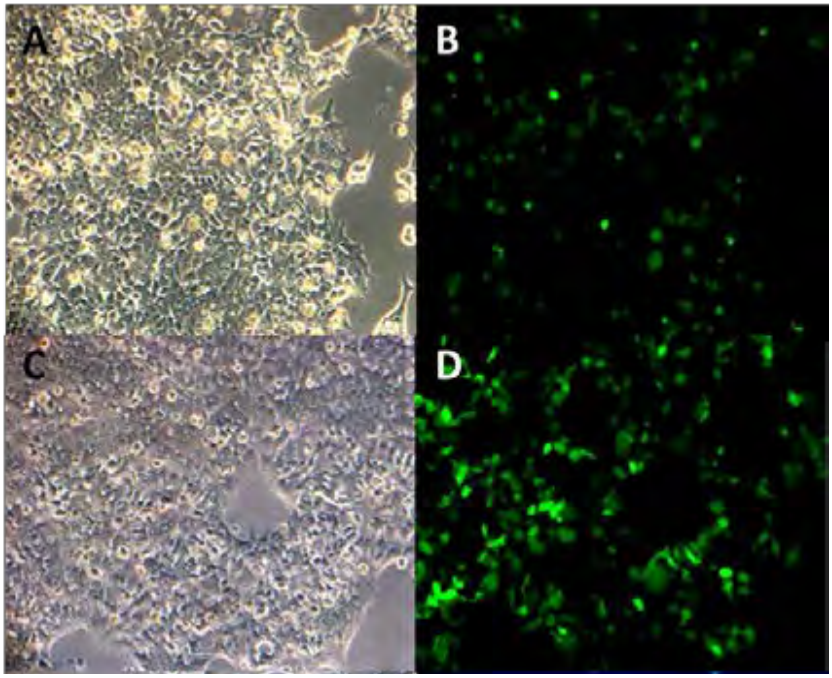

Figura 45: Células 293FT em luz branca (A, C) e expostas à fluorescência (B, D) após transfecção com os vetores Oct4-vexGFP ou Sox2-mCitrine, respectivamente. 200x.

Produção das linhagens de fibroblastos estáveis para os fatores de transcrição

Para a produção de tais linhagens estáveis, o protocolo é descrito a seguir: fibroblastos bovinos foram cultivados (2 x 10^5 células em um poço de placa de 6 poços) e transduzidos com os lentivírus na presença de 8µg/ml polibreno (Sigma) utilizando 50uL de sobrenadante viral filtrado e concentrado.

A porcentagem de células positivas para os genes repórteres foi quantificada por citometria de fluxo; servindo como parâmetro de eficiência de transdução lentiviral. Tal mensuração é válida para a análise qualitativa e quantitativa da eficiência de integração do transgene, uma vez que a multiplicidade de infecção destes vetores resulta em um título linear da intensidade média de fluorescência de cada proteína fluorescente correspondente (PAPAPETROU et al., 2009). As linhagens foram analisadas e submetidas ao *sorting* de seis a sete dias após transdução. As linhagens geradas são utilizadas em baixa passagem para os experimentos de transferência nuclear.

As linhagens Sox2-mCitrine e Oct4-vexGFP foram utilizadas como doadoras de núcleo na transferência nuclear (Fig.47).

Células expressando ambos Oct4 e Sox2 (dupla- positivas para VexGFP e mCitrine) foram produzidas e caracterizadas. Tais células, porém, ao serem reconduzidas ao cultivo apresentam comportamento diferente das demais, sendo observada uma altíssima proliferação seguida de uma precoce senescência. Tal comportamento foi observado ao longo de três repetições.

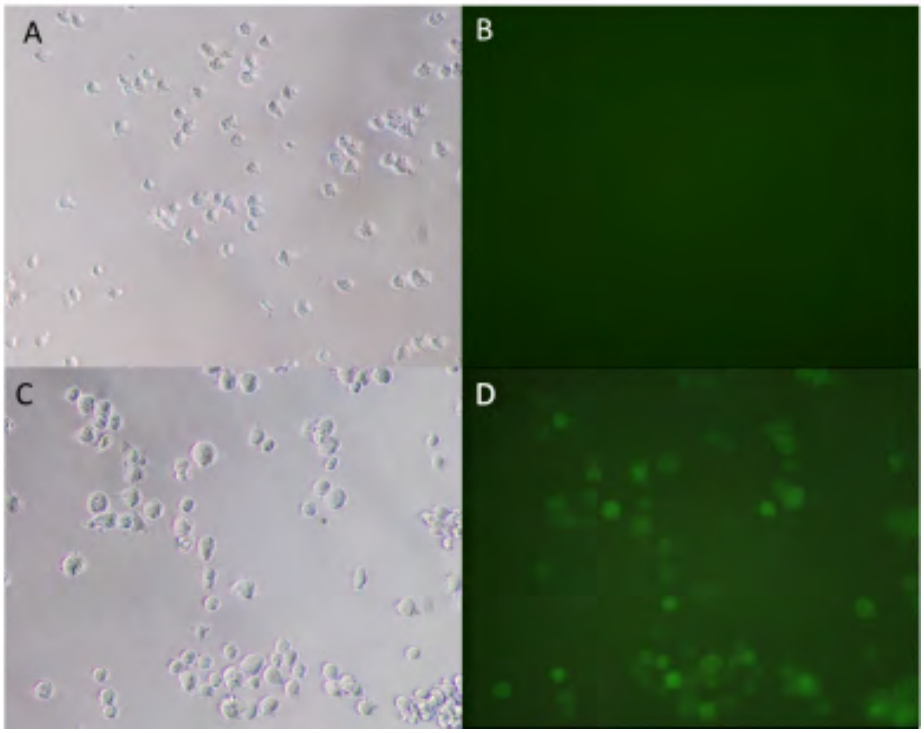

Figura 46: Exemplo de linhagem de fibroblasto bovino utilizado como doador de núcleo na TNCS. A e B: fibroblastos não geneticamente modificados (grupo controle) em luz branca e UV, respectivamente. C e D: fibroblastos expressando SOX2 (expressão do repórter mCitrine), em luz branca e fluorescência, respectivamente. 200X.

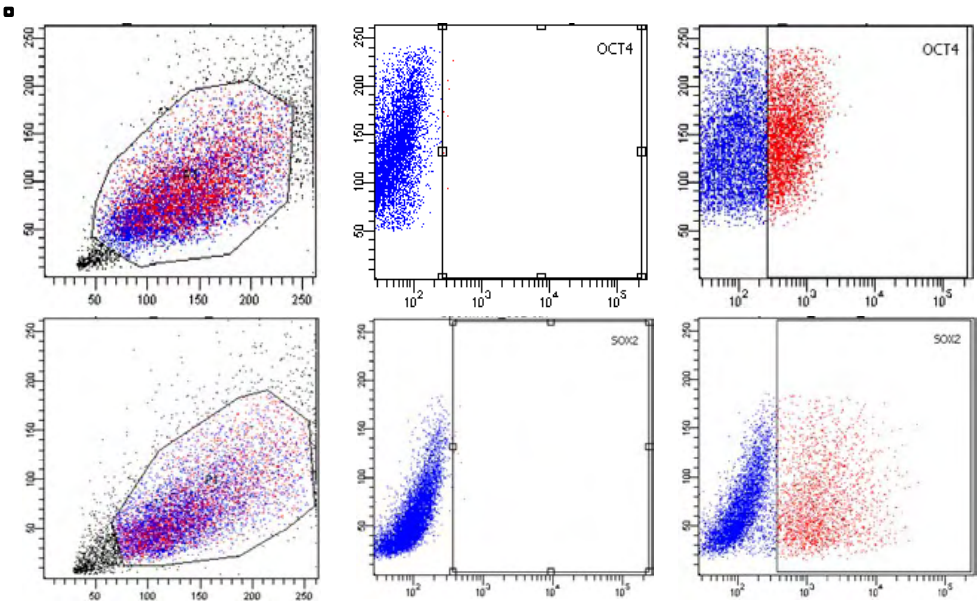

Figura 47: Análise fluxo-citométrica das linhagens estáveis expressando OCT4-vexGFP e SOX2-mCitrine utilizadas para o *sorting* das células doadoras de núcleo.

Extração de RNA e síntese e determinação da quantidade relativa de cDNA

Para a análise de expressão gênica das linhagens celulares, os cultivos foram tripsinizados, as células foram lavadas em PBS, o sobrenadante retirado e o pellet estocado a -80°C até o momento da extração, ou então, submetidos à extração de DNA e RNA imediatamente.

O RNA total de cultivos celulares foi isolado como descrito anteriormente no capítulo 3.

Transferência Nuclear de Célula Somática

Foram realizadas quatro rotinas de transferência de núcleo utilizando como células doadoras de núcleo fibroblastos expressando OCT4-vexGFP (n=182) ou fibroblastos não modificados (n=178) e outras quatro rotinas de transferência de núcleo utilizando como células doadoras de núcleo fibroblastos expressando SOX2-mCitrine (n=203) ou fibroblastos não modificados (n=149). Foi utilizado o teste de Qui-quadrado com um nível de significância de 5% (SAS, 1995). O protocolo do procedimento de TNCS está descrito no capítulo 4.

RESULTADOS

Expressão de genes relacionados à pluripotência em células expressando fatores de pluripotência exógenos

Foram produzidas linhagens celulares bovinas estáveis expressando fatores de reprogramação relacionados à pluripotência. Estas linhagens estão caracterizadas e foram utilizadas como células doadoras de núcleo com o objetivo de determinar a influência de cada fator no processo de reprogramação celular.

bFFs expressando OCT4 ou SOX2 e fibroblastos fetais bovinos não modificados foram analisados quanto à expressão dos genes relacionados à pluripotência OCT4, SOX2 e NANOG bovino. Quando linhagens controle, positiva para OCT4 e positiva SOX2 foram verificadas quanto à expressão dos genes OCT4 e NANOG bovino, foi possível perceber que células OCT4+ conforme esperado expressaram mais OCT4 quando comparada ao controle, mas não expressaram NANOG. Em células expressando SOX2, o OCT4 não foi aumentado, ou seja, provavelmente a expressão exógena de SOX2 não é suficiente para induzir a expressão endógena de OCT4, entretanto as células SOX2 apresentaram aumento relativo na expressão de NANOG endógeno quando comparado ao controle (Fig. 44), indicando que o SOX2 está envolvido na ativação de NANOG bovino, concordando com estudos publicados recentemente (PICANCO-CASTRO; RUSSO-CARBOLANTE; COVAS, 2012).

O gráfico representativo da análise do NANOG bovino, em unidades arbitrárias, encontra-se abaixo (Fig. 48).

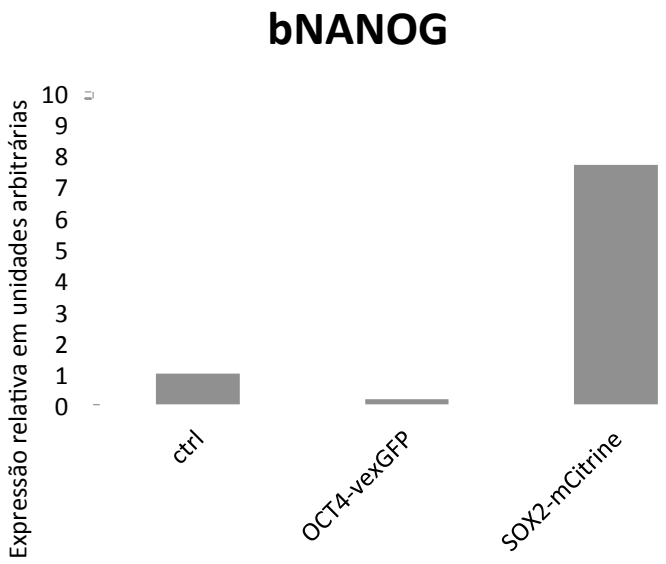

Figura 48: Expressão de bNANOG na linhagens bFF submetidas à TNCS quando comparadas à bFF não modificada, em unidades arbitrárias. Ctrl: linhagem não modificada, OCT4: linhagem expressando vexGFP e SOX2: linhagem expressando mCitrine.

Transferência nuclear utilizando linhagens expressando SOX2-mCitrine como doadoras de núcleo

Não foram constatadas diferenças na taxa de fusão, clivagem, porcentual de embriões em 8 células no segundo de cultivo e capacidade de desenvolvimento a blastocisto no sétimo dia de cultivo *in vitro* entre embriões clones reconstruídos com células modificadas ou não. Os resultados estão expressos na figura 49, e os embriões produzidos estão representados na figura 50.

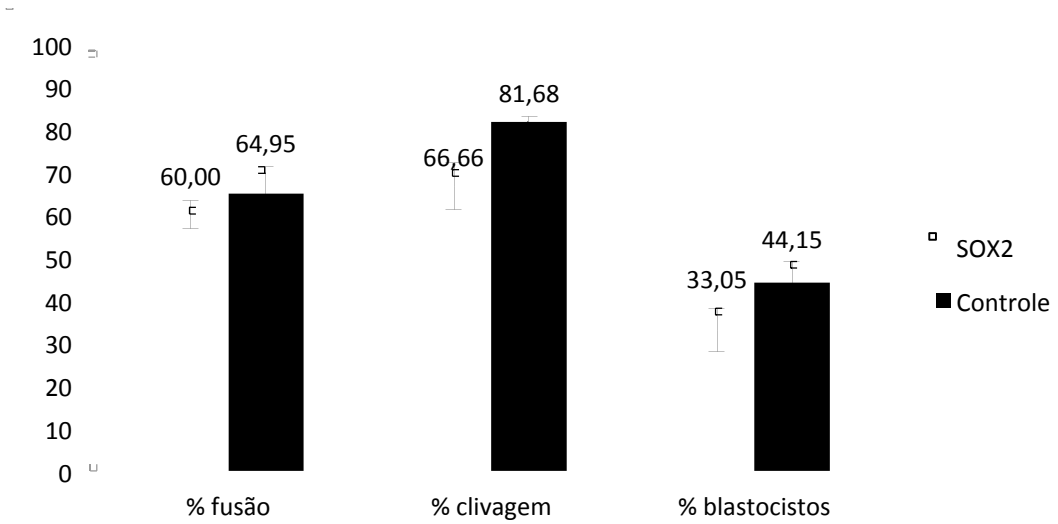

Figura 49: Porcentagens de fusão, clivagem e embriões em oito células no segundo dia de cultivo e blastocistos no sétimo dia de cultivo produzidos através da transferência de núcleo de células modificadas ou não.

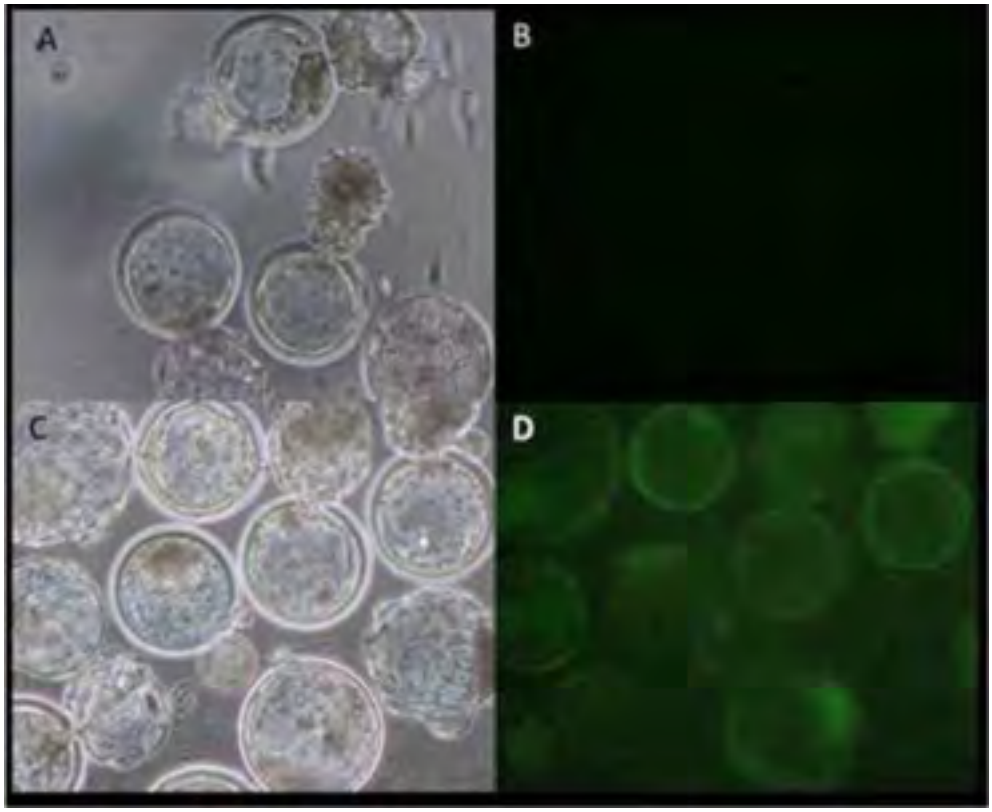

Figura 50: Embriões clonados a partir de linhagem de fibroblasto bovino utilizado como doador de núcleo na TNCS. A e B: embriões produzidos a partir de fibroblastos não geneticamente modificados em luz branca e fluorescência, respectivamente. C e D: embriões produzidos a partir de fibroblastos expressando SOX2 (expressão do repórter mCitrine), em luz branca e fluorescência, respectivamente. Aumento de 20X.

Transferência nuclear utilizando linhagens expressando OCT4-vexGFP como doadoras de núcleo

Não foram constatadas diferenças na taxa de fusão, clivagem, porcentual de embriões em 8 células no segundo de cultivo e capacidade de desenvolvimento a blastocisto no sétimo dia de cultivo *in vitro* entre embriões clones reconstruídos com células modificadas ou não. Os resultados estão expressos na figura 51.

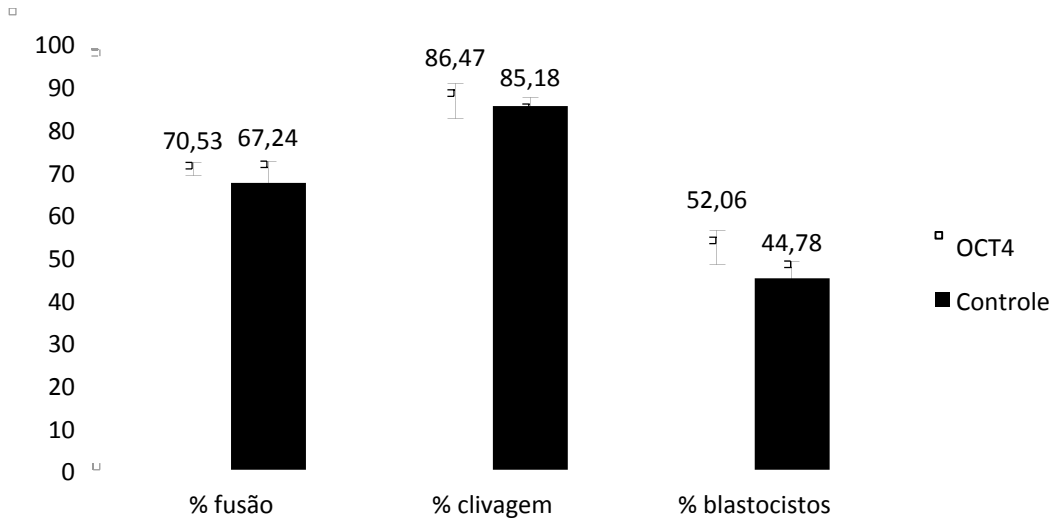

Figura 51: Porcentagens de fusão, clivagem e embriões em oito células no segundo dia de cultivo e blastocistos no sétimo dia de cultivo produzidos através da transferência de núcleo de células modificadas ou não.

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES PARCIAIS DO CAPÍTULO 5

Neste estudo foi analisada a influência da super expressão dos fatores de reprogramação OCT4 e SOX2 sobre o desenvolvimento *in vitro* embrionário bovino. Para tal, foram utilizados vetores contendo os fatores de pluripotência conjugados com genes codificantes para proteínas repórteres diferentes, como descrito em Papapetrou et al., 2009. Neste estudo, além de identificar de maneira mais fácil a expressão dos fatores exógenos, é possível a análise de populações celulares bovinas expressando os fatores de reprogramação humanos, isoladamente ou em combinações, e suas consequências.

De uma maneira bastante simplificada, a possibilidade de avaliar a expressão dos genes repórteres por citometria de fluxo permite analisar a influência de cada fator relacionado à pluripotência durante o processo de reprogramação nuclear através de transferência de núcleo. Além disso, a separação de populações positivas (i.e. expressando um ou múltiplos fatores) pode ser realizada, e desta maneira, somente as células que incorporaram os fatores podem ser cultivadas, resultando teoricamente em um aumento a eficiência da produção de colônias em relação ao número de células iniciais.

A expressão de OCT4 e NANOG em células submetidas à clonagem confirmou que a separação por fluorescência dos vetores é eficaz como "repórter" do gene alvo. Além disso, tal análise permite a interpretação biológica do mecanismo de regulação entre os genes mais importantes ligados à manutenção da pluripotência (OCT4, SOX2 e NANOG).

Não foram encontradas diferenças no sucesso de desenvolvimento embrionário ao estágio de blastocisto quando comparadas estes grupos ao controle. É constatado por nosso grupo de pesquisa e outros que a taxa de produção de blastocistos não é a medida mais relacionada ao sucesso na reprogramação por TNCS normal, verificada pela produção de animais a termo vivos saudáveis. Um dos gargalos mais evidentes neste processo é o sucesso de manutenção de prenhez, principalmente até o período de 150 dias. Desta maneira, clonagens com células expressando outros fatores, e principalmente, a análise de desenvolvimento *in vivo* destes embriões ainda necessita ser avaliada.

CAPÍTULO 6: CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

CAPÍTULO 6: CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

Este estudo propôs o estabelecimento de uma linhagem geneticamente induzida de células-tronco bovinas (iPS), uma ferramenta importante para o estudo e caracterização dos mecanismos de indução à pluripotência na espécie bovina, além do desenvolvimento inicial de embriões gerados a partir destas.

Foi realizada a geração das células pluripotentes induzidas no modelo bovino, além dos modelos humano e equino, que foram caracterizadas e tornaram-se importantes ferramentas para o reconhecimento da eficácia no funcionamento dos vetores lentivirais e condições de cultivo celular durante a reprogramação *in vitro* descrita no presente estudo.

Quando células sabidamente pluripotentes foram utilizadas como doadoras de núcleo na clonagem, nas condições apresentadas a capacidade de desenvolvimento embrionário não foi aumentada em relação à utilização de células diferenciadas (fibroblastos), porém, foi possível a manutenção inicial do desenvolvimento embrionário e fetal *in vivo*. Além disso, é importante ressaltar que embriões e fetos geneticamente idênticos às células iPS foram produzidos através de TNCS. A técnica de agregação embrionária, quando associada à tecnologia de pluripotência direta induzida *in vitro*, também deve possibilitar a produção embrionária derivada de células adultas.

A influencia da super expressão de fatores de transcrição conhecidamente importantes na aquisição e pluripotência celular foi analisada quanto à capacidade de reprogramação de núcleo através da TNCS quando utilizadas células doadoras de núcleo expressando hOCT4 ou hSOX2 com células controle não modificadas. A capacidade de desenvolvimento *in vitro* descrita neste estudo pela taxa de desenvolvimento a blastocisto apresentou-se similar entre os grupos. Como discutido anteriormente, é conhecido que a taxa de produção de blastocistos não é a medida mais relacionada ao sucesso na reprogramação por TNCS normal, sendo a melhor avaliação a viabilidade dos animais durante a gestação e a consequente produção de animais a termo vivos saudáveis.

Desta maneira, apesar de a geração de células pluripotentes induzidas bovinas, assim como a produção de embriões derivadas destas ter sido possível, a utilização

das células iPS como doadoras de núcleo não levou a uma maior eficiência de produção de blastocistos produzidos *in vitro* nas condições experimentais descritas. Como discutido anteriormente, a padronização do cultivo e sincronização do ciclo celular das bIPS deverá ser realizada para que conclusões mais específicas e claras sobre o processo de reprogramação nuclear utilizando estas células sejam encontradas. A capacidade de manutenção do desenvolvimento *in vivo* no período inicial da gestação, que por sua vez indicaria uma melhor reprogramação nuclear, ainda precisa ser adequadamente testada e analisada.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

ARNHOLD, S.; KLEIN, H.; SEMKOVA, I.; ADDICKS, K.; SCHRAERMEYER, U. Neurally selected embryonic stem cells induce tumor formation after long-term survival following engraftment into the subretinal space. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, v. 45, n. 12, p. 4251-4255, 2004.

ARNOLD, D. R.; BORDIGNON, V.; LEFEBVRE, R.; MURPHY, B. D.; SMITH, L. C. Somatic cell nuclear transfer alters peri-implantation trophoblast differentiation in bovine embryos. **Reproduction**, v. 132, n. 2, p. 279-290, 2006.

AVILION, A. A.; NICOLIS, S. K.; PEVNY, L. H.; PEREZ, L.; VIVIAN, N.; LOVELL-BADGE, R. Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. **Genes Dev**, v. 17, n. 1, p. 126-140, 2003.

BAGUISI, A.; BEHBOODI, E.; MELICAN, D. T.; POLLOCK, J. S.; DESTREMPES, M. M.; CAMMUSO, C.; WILLIAMS, J. L.; NIMS, S. D.; PORTER, C. A.; MIDURA, P.; PALACIOS, M. J.; AYRES, S. L.; DENNISTON, R. S.; HAYES, M. L.; ZIOMEK, C. A.; MEADE, H. M.; GODKE, R. A.; GAVIN, W. G.; OVERSTROM, E. W.; ECHELARD, Y. Production of goats by somatic cell nuclear transfer. **Nat Biotechnol**, v. 17, n. 5, p. 456-461, 1999.

BAO, L.; HE, L.; CHEN, J.; WU, Z.; LIAO, J.; RAO, L.; REN, J.; LI, H.; ZHU, H.; QIAN, L.; GU, Y.; DAI, H.; XU, X.; ZHOU, J.; WANG, W.; CUI, C.; XIAO, L. Reprogramming of ovine adult fibroblasts to pluripotency via drug-inducible expression of defined factors. **Cell Res**, v. 21, n. 4, p. 600-608, 2011.

BEISEL, C.; PARO, R. Dissection of gene regulatory networks in embryonic stem cells by means of high-throughput sequencing. **Biol Chem**, v. 390, n. 11, p. 1139-1144, 2009.

BEN-NUN, I. F.; MONTAGUE, S. C.; HOUCK, M. L.; TRAN, H. T.; GARITAONANDIA, I.; LEONARDO, T. R.; WANG, Y. C.; CHARTER, S. J.; LAURENT, L. C.; RYDER, O. A.; LORING, J. F. Induced pluripotent stem cells from highly endangered species. **Nat Methods**, v. 8, n. 10, p. 829-831, 2011.

BERG, D. K.; SMITH, C. S.; PEARTON, D. J.; WELLS, D. N.; BROADHURST, R.; DONNISON, M.; PFEFFER, P. L. Trophectoderm lineage determination in cattle. **Dev Cell**, v. 20, n. 2, p. 244-255, 2011.

BIRD, A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. **Genes Dev**, v. 16, n. 1, p. 6-21, 2002.

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**, v. 24, n. 9, p. 2007-2013, 2006.

BONK, A. J.; CHEONG, H. T.; LI, R.; LAI, L.; HAO, Y.; LIU, Z.; SAMUEL, M.; FERGASON, E. A.; WHITWORTH, K. M.; MURPHY, C. N.; ANTONIOU, E.; PRATHER, R. S. Correlation of developmental differences of nuclear transfer embryos cells to the methylation profiles of nuclear transfer donor cells in Swine. **Epigenetics**, v. 2, n. 3, p. 179-186, 2007.

BORDIGNON, V.; SMITH, L. C. Telophase-stage host ooplasts support complete reprogramming of roscovitine-treated somatic cell nuclei in cattle. **Cloning Stem Cells**, v. 8, n. 4, p. 305-317, 2006.

BORTVIN, A.; EGGAN, K.; SKALETSKY, H.; AKUTSU, H.; BERRY, D. L.; YANAGIMACHI, R.; PAGE, D. C.; JAENISCH, R. Incomplete reactivation of Oct4-related genes in mouse embryos cloned from somatic nuclei. **Development**, v. 130, n. 8, p. 1673-1680, 2003.

BOURC'HIS, D.; LE BOURHIS, D.; PATIN, D.; NIVELEAU, A.; COMIZZOLI, P.; RENARD, J. P.; VIEGAS-PEQUIGNOT, E. Delayed and incomplete reprogramming of chromosome methylation patterns in bovine cloned embryos. **Curr Biol**, v. 11, n. 19, p. 1542-1546, 2001.

BOYER, L. A.; LEE, T. I.; COLE, M. F.; JOHNSTONE, S. E.; LEVINE, S. S.; ZUCKER, J. P.; GUENTHER, M. G.; KUMAR, R. M.; MURRAY, H. L.; JENNER, R. G.; GIFFORD, D. K.; MELTON, D. A.; JAENISCH, R.; YOUNG, R. A. Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. **Cell**, v. 122, n. 6, p. 947-956, 2005.

BRAMBRINK, T.; HOCHEDLINGER, K.; BELL, G.; JAENISCH, R. ES cells derived from cloned and fertilized blastocysts are transcriptionally and functionally indistinguishable. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 103, n. 4, p. 933-938, 2006.

BRESSAN, F. F.; DOS SANTOS MIRANDA, M.; PERECIN, F.; DE BEM, T. H.; PEREIRA, F. T.; RUSSO-CARBOLANTE, E. M.; ALVES, D.; STRAUSS, B.; BAJGELMAN, M.; KRIEGER, J. E.; BINELLI, M.; MEIRELLES, F. V. Improved production of genetically modified fetuses with homogeneous transgene expression after transgene integration site analysis and recloning in cattle. **Cell Reprogram**, v. 13, n. 1, p. 29-36, 2011.

BREVINI, T. A.; ANTONINI, S.; PENNAROSSA, G.; GANDOLFI, F. Recent progress in embryonic stem cell research and its application in domestic species. **Reprod Domest Anim**, v. 43 Suppl 2, n., p. 193-199, 2008.

BRIGGS, R.; KING, T. J. Transplantation of Living Nuclei From Blastula Cells into Enucleated Frogs' Eggs. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 38, n. 5, p. 455-463, 1952.

BUEHR, M.; MEEK, S.; BLAIR, K.; YANG, J.; URE, J.; SILVA, J.; MCLAY, R.; HALL, J.; YING, Q. L.; SMITH, A. Capture of authentic embryonic stem cells from rat blastocysts. **Cell**, v. 135, n. 7, p. 1287-1298, 2008.

BYRNE, J. A.; PEDERSEN, D. A.; CLEPPER, L. L.; NELSON, M.; SANGER, W. G.; GOKHALE, S.; WOLF, D. P.; MITALIPOV, S. M. Producing primate embryonic stem cells by somatic cell nuclear transfer. **Nature**, v.

450, n. 7169, p. 497-502, 2007.

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

CAO, H.; YANG, P.; PU, Y.; SUN, X.; YIN, H.; ZHANG, Y.; ZHANG, Y.; LI, Y.; LIU, Y.; FANG, F.; ZHANG, Z.; TAO, Y.; ZHANG, X. Characterization of bovine induced pluripotent stem cells by lentiviral transduction of reprogramming factor fusion proteins. **Int J Biol Sci**, v. 8, n. 4, p. 498-511, 2012.

CHAN, E. M.; RATANASIRINTRAWOOT, S.; PARK, I. H.; MANOS, P. D.; LOH, Y. H.; HUO, H.; MILLER, J. D.; HARTUNG, O.; RHO, J.; INCE, T. A.; DALEY, G. Q.; SCHLAEGER, T. M. Live cell imaging distinguishes bona fide human iPS cells from partially reprogrammed cells. **Nat Biotechnol**, v. 27, n. 11, p. 1033-1037, 2009.

CHEN, L.; DALEY, G. Q. Molecular basis of pluripotency. **Hum Mol Genet**, v. 17, n. R1, p. R23-27, 2008.

CHENG, D.; GUO, Y.; LI, Z.; LIU, Y.; GAO, X.; GAO, Y.; CHENG, X.; HU, J.; WANG, H. Porcine induced pluripotent stem cells require LIF and maintain their developmental potential in early stage of embryos. **PLoS One**, v. 7, n. 12, p. e51778, 2012.

CHO, H. J.; LEE, C. S.; KWON, Y. W.; PAEK, J. S.; LEE, S. H.; HUR, J.; LEE, E. J.; ROH, T. Y.; CHU, I. S.; LEEM, S. H.; KIM, Y.; KANG, H. J.; PARK, Y. B.; KIM, H. S. Induction of pluripotent stem cells from adult somatic cells by protein-based reprogramming without genetic manipulation. **Blood**, v. 116, n. 3, p. 386-395, 2010.

CIBELLI, J. Developmental biology. A decade of cloning mystique. **Science**, v. 316, n. 5827, p. 990-992, 2007a.

CIBELLI, J. Development. Is therapeutic cloning dead? **Science**, v. 318, n. 5858, p. 1879-1880, 2007b.

CIBELLI, J. B.; STICE, S. L.; GOLUEKE, P. J.; KANE, J. J.; JERRY, J.; BLACKWELL, C.; PONCE DE LEON, F. A.; ROBL, J. M. Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblasts. **Science**, v. 280, n. 5367, p. 1256-1258, 1998.

COWAN, C. A.; ATIENZA, J.; MELTON, D. A.; EGGAN, K. Nuclear reprogramming of somatic cells after fusion with human embryonic stem cells. **Science**, v. 309, n. 5739, p. 1369-1373, 2005.

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. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 98, n. 24, p. 13734-13738, 2001.

DING, J.; GUO, Y.; LIU, S.; YAN, Y.; CHANG, G.; KOU, Z.; ZHANG, Y.; JIANG, Y.; HE, F.; GAO, S.; SANG, J.

Embryonic stem cells derived from somatic cloned and fertilized blastocysts are post-transcriptionally indistinguishable: a MicroRNA and protein profile comparison. **Proteomics**, v. 9, n. 10, p. 2711-2721, 2009.

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. **Anim Reprod Sci**, v. 98, n. 1-2, p. 129-146, 2007.

ESTEBAN, M. A.; XU, J.; YANG, J.; PENG, M.; QIN, D.; LI, W.; JIANG, Z.; CHEN, J.; DENG, K.; ZHONG, M.; CAI, J.; LAI, L.; PEI, D. Generation of induced pluripotent stem cell lines from Tibetan miniature pig. **J Biol Chem**, v. 284, n. 26, p. 17634-17640, 2009.

EZASHI, T.; TELUGU, B. P.; ALEXENKO, A. P.; SACHDEV, S.; SINHA, S.; ROBERTS, R. M. Derivation of induced pluripotent stem cells from pig somatic cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 106, n. 27, p. 10993-10998, 2009.

FANG, Z. F.; GAI, H.; HUANG, Y. Z.; LI, S. G.; CHEN, X. J.; SHI, J. J.; WU, L.; LIU, A.; XU, P.; SHENG, H. Z. Rabbit embryonic stem cell lines derived from fertilized, parthenogenetic or somatic cell nuclear transfer embryos. **Exp Cell Res**, v. 312, n. 18, p. 3669-3682, 2006.

FRENCH, A. J.; ADAMS, C. A.; ANDERSON, L. S.; KITCHEN, J. R.; HUGHES, M. R.; WOOD, S. H. Development of human cloned blastocysts following somatic cell nuclear transfer with adult fibroblasts. **Stem Cells**, v. 26, n. 2, p. 485-493, 2008.

GJORRET, J. O.; MADDOX-HYTTEL, P. Attempts towards derivation and establishment of bovine embryonic stem cell-like cultures. **Reprod Fertil Dev**, v. 17, n. 1-2, p. 113-124, 2005.

GONG, G.; DAI, Y.; ZHU, H.; WANG, H.; WANG, L.; LI, R.; WAN, R.; LIU, Y.; LI, N. Generation of cloned calves from different types of somatic cells. **Sci China C Life Sci**, v. 47, n. 5, p. 470-476, 2004.

GREEN, A. L.; WELLS, D. N.; OBACK, B. Cattle cloned from increasingly differentiated muscle cells. **Biol Reprod**, v. 77, n. 3, p. 395-406, 2007.

GURDON, J. B.; ELSDALE, T. R.; FISCHBERG, M. Sexually mature individuals of Xenopus laevis from the transplantation of single somatic nuclei. **Nature**, v. 182, n. 4627, p. 64-65, 1958.

HALL, V. Porcine embryonic stem cells: a possible source for cell replacement therapy. **Stem Cell Rev**, v. 4, n. 4, p. 275-282, 2008.

HAN, J. W.; YOON, Y. S. Induced Pluripotent Stem Cells: Emerging Techniques for Nuclear Reprogramming. **Antioxid Redox Signal**, v., n., p., 2011.

HAN, X.; HAN, J.; DING, F.; CAO, S.; LIM, S. S.; DAI, Y.; ZHANG, R.; ZHANG, Y.; LIM, B.; LI, N. Generation of induced pluripotent stem cells from bovine embryonic fibroblast cells. **Cell Res**, v. 21, n. 10, p. 1509-1512, 2011.

HEYMAN, Y.; CHAVATTE-PALMER, P.; LEBOURHIS, D.; CAMOUS, S.; VIGNON, X.; RENARD, J. P. Frequency and occurrence of late-gestation losses from cattle cloned embryos. **Biol Reprod**, v. 66, n. 1, p. 6-13, 2002.

HEYMAN, Y. Nuclear transfer: a new tool for reproductive biotechnology in cattle. **Reprod Nutr Dev**, v. 45, n. 3, p. 353-361, 2005.

HIIRAGI, T.; SOLTER, D. Reprogramming is essential in nuclear transfer. **Mol Reprod Dev**, v. 70, n. 4, p. 417-421, 2005.

HILL, J. R.; ROUSSEL, A. J.; CIBELLI, J. B.; EDWARDS, J. F.; HOOPER, N. L.; MILLER, M. W.; THOMPSON, J. A.; LOONEY, C. R.; WESTHUSIN, M. E.; ROBL, J. M.; STICE, S. L. Clinical and pathologic features of cloned transgenic calves and fetuses (13 case studies). **Theriogenology**, v. 51, n. 8, p. 1451-1465, 1999.

HOCHEDLINGER, K.; JAENISCH, R. Nuclear transplantation: lessons from frogs and mice. **Curr Opin Cell Biol**, v. 14, n. 6, p. 741-748, 2002.

HOCHEDLINGER, K.; PLATH, K. Epigenetic reprogramming and induced pluripotency. **Development**, v. 136, n. 4, p. 509-523, 2009.

HONDA, A.; HIROSE, M.; HATORI, M.; MATOBA, S.; MIYOSHI, H.; INOUE, K.; OGURA, A. Generation of induced pluripotent stem cells in rabbits: potential experimental models for human regenerative medicine. **J Biol Chem**, v. 285, n. 41, p. 31362-31369, 2010.

HUANG, B.; LI, T.; ALONSO-GONZALEZ, L.; GORRE, R.; KEATLEY, S.; GREEN, A.; TURNER, P.; KALLINGAPPA, P. K.; VERMA, V.; OBACK, B. A virus-free poly-promoter vector induces pluripotency in quiescent bovine cells under chemically defined conditions of dual kinase inhibition. **PLoS One**, v. 6, n. 9, p. e24501, 2011.

HUANGFU, D.; OSAFUNE, K.; MAEHR, R.; GUO, W.; EIJKELENBOOM, A.; CHEN, S.; MUHLESTEIN, W.; MELTON, D. A. Induction of pluripotent stem cells from primary human fibroblasts with only Oct4 and Sox2. **Nat Biotechnol**, v. 26, n. 11, p. 1269-1275, 2008.

HUMPHERYS, D.; EGGAN, K.; AKUTSU, H.; HOCHEDLINGER, K.; RIDEOUT, W. M., 3RD; BINISZKIEWICZ, D.; YANAGIMACHI, R.; JAENISCH, R. Epigenetic instability in ES cells and cloned mice. **Science**, v. 293, n. 5527, p. 95-97, 2001.

INOUE, K.; WAKAO, H.; OGONUKI, N.; MIKI, H.; SEINO, K.; NAMBU-WAKAO, R.; NODA, S.; MIYOSHI,

H.; KOSEKI, H.; TANIGUCHI, M.; OGURA, A. Generation of cloned mice by direct nuclear transfer from natural killer T cells. **Curr Biol**, v. 15, n. 12, p. 1114-1118, 2005.

IQBAL, K.; JIN, S. G.; PFEIFER, G. P.; SZABO, P. E. Reprogramming of the paternal genome upon fertilization involves genome-wide oxidation of 5-methylcytosine. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 108, n. 9, p. 3642-3647, 2011.

IVANOVA, N.; DOBRIN, R.; LU, R.; KOTENKO, I.; LEVORSE, J.; DECOSTE, C.; SCHAFER, X.; LUN, Y.; LEMISCHKA, I. R. Dissecting self-renewal in stem cells with RNA interference. **Nature**, v. 442, n. 7102, p. 533-538, 2006.

JOHNSON, B. V.; SHINDO, N.; RATHJEN, P. D.; RATHJEN, J.; KEOUGH, R. A. Understanding pluripotency--how embryonic stem cells keep their options open. **Mol Hum Reprod**, v. 14, n. 9, p. 513-520, 2008.

KANG, Y. K.; KOO, D. B.; PARK, J. S.; CHOI, Y. H.; KIM, H. N.; CHANG, W. K.; LEE, K. K.; HAN, Y. M. Typical demethylation events in cloned pig embryos. Clues on species-specific differences in epigenetic reprogramming of a cloned donor genome. **J Biol Chem**, v. 276, n. 43, p. 39980-39984, 2001.

KATO, Y.; TANI, T.; SOTOMARU, Y.; KUROKAWA, K.; KATO, J.; DOGUCHI, H.; YASUE, H.; TSUNODA, Y. Eight calves cloned from somatic cells of a single adult. **Science**, v. 282, n. 5396, p. 2095-2098, 1998.

KIM, J. B.; ZAEHRES, H.; WU, G.; GENTILE, L.; KO, K.; SEBASTIANO, V.; ARAUZO-BRAVO, M. J.; RUAU, D.; HAN, D. W.; ZENKE, M.; SCHOLER, H. R. Pluripotent stem cells induced from adult neural stem cells by reprogramming with two factors. **Nature**, v. 454, n. 7204, p. 646-650, 2008.

KIM, M. K.; JANG, G.; OH, H. J.; YUDA, F.; KIM, H. J.; HWANG, W. S.; HOSSEIN, M. S.; KIM, J. J.; SHIN, N. S.; KANG, S. K.; LEE, B. C. Endangered wolves cloned from adult somatic cells. **Cloning Stem Cells**, v. 9, n. 1, p. 130-137, 2007.

KUES, W. A.; NIEMANN, H. The contribution of farm animals to human health. **Trends Biotechnol**, v. 22, n. 6, p. 286-294, 2004.

LI, P.; TONG, C.; MEHRIAN-SHAI, R.; JIA, L.; WU, N.; YAN, Y.; MAXSON, R. E.; SCHULZE, E. N.; SONG, H.; HSIEH, C. L.; PERA, M. F.; YING, Q. L. Germline competent embryonic stem cells derived from rat blastocysts. **Cell**, v. 135, n. 7, p. 1299-1310, 2008.

LI, Y.; CANG, M.; LEE, A. S.; ZHANG, K.; LIU, D. Reprogramming of sheep fibroblasts into pluripotency under a drug-inducible expression of mouse-derived defined factors. **PLoS One**, v. 6, n. 1, p. e15947, 2011.

LI, Z.; YANG, C. S.; NAKASHIMA, K.; RANA, T. M. Small RNA-mediated regulation of iPS cell generation.

EMBO J, v. 30, n. 5, p. 823-834, 2011.

LIU, H.; ZHU, F.; YONG, J.; ZHANG, P.; HOU, P.; LI, H.; JIANG, W.; CAI, J.; LIU, M.; CUI, K.; QU, X.; XIANG, T.; LU, D.; CHI, X.; GAO, G.; JI, W.; DING, M.; DENG, H. Generation of induced pluripotent stem cells from adult rhesus monkey fibroblasts. **Cell Stem Cell**, v. 3, n. 6, p. 587-590, 2008.

LIU, N.; LU, M.; TIAN, X.; HAN, Z. Molecular mechanisms involved in self-renewal and pluripotency of embryonic stem cells. **J Cell Physiol**, v. 211, n. 2, p. 279-286, 2007.

LIU, Z.; WAN, H.; WANG, E.; ZHAO, X.; DING, C.; ZHOU, S.; LI, T.; SHUAI, L.; FENG, C.; YU, Y.; ZHOU, Q.; BEAUJEAN, N. Induced pluripotent stem-induced cells show better constitutive heterochromatin remodeling and developmental potential after nuclear transfer than their parental cells. **Stem Cells Dev**, v. 21, n. 16, p. 3001-3009, 2012.

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**, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001.

LOH, Y. H.; WU, Q.; CHEW, J. L.; VEGA, V. B.; ZHANG, W.; CHEN, X.; BOURQUE, G.; GEORGE, J.; LEONG, B.; LIU, J.; WONG, K. Y.; SUNG, K. W.; LEE, C. W.; ZHAO, X. D.; CHIU, K. P.; LIPOVICH, L.; KUZNETSOV, V. A.; ROBSON, P.; STANTON, L. W.; WEI, C. L.; RUAN, Y.; LIM, B.; NG, H. H. The Oct4 and Nanog transcription network regulates pluripotency in mouse embryonic stem cells. **Nat Genet**, v. 38, n. 4, p. 431-440, 2006.

LOIS, C.; HONG, E. J.; PEASE, S.; BROWN, E. J.; BALTIMORE, D. Germline transmission and tissue-specific expression of transgenes delivered by lentiviral vectors. **Science**, v. 295, n. 5556, p. 868-872, 2002.

LUCIFERO, D.; SUZUKI, J.; BORDIGNON, V.; MARTEL, J.; VIGNEAULT, C.; THERRIEN, J.; FILION, F.; SMITH, L. C.; TRASLER, J. M. Bovine SNRPN methylation imprint in oocytes and day 17 in vitro-produced and somatic cell nuclear transfer embryos. **Biol Reprod**, v. 75, n. 4, p. 531-538, 2006.

MAHERALI, N.; SRIDHARAN, R.; XIE, W.; UTIKAL, J.; EMINLI, S.; ARNOLD, K.; STADTFELD, M.; YACHECHKO, R.; TCHIEU, J.; JAENISCH, R.; PLATH, K.; HOCHEDLINGER, K. Directly reprogrammed fibroblasts show global epigenetic remodeling and widespread tissue contribution. **Cell Stem Cell**, v. 1, n. 1, p. 55-70, 2007.

MANN, M. R.; BARTOLOMEI, M. S. Epigenetic reprogramming in the mammalian embryo: struggle of the clones. **Genome Biol**, v. 3, n. 2, p. REVIEWS1003, 2002.

MARKOULAKI, S.; MEISSNER, A.; JAENISCH, R. Somatic cell nuclear transfer and derivation of embryonic stem cells in the mouse. **Methods**, v. 45, n. 2, p. 101-114, 2008.

MARUOTTI, J.; MUNOZ, M.; DEGRELLE, S. A.; GOMEZ, E.; LOUET, C.; MONFORTE, C. D.; DE

LONGCHAMP, P. H.; BROCHARD, V.; HUE, I.; CAAMANO, J. N.; JOUNEAU, A. Efficient derivation of bovine embryonic stem cells needs more than active core pluripotency factors. **Mol Reprod Dev**, v., n., p., 2012.

MEIRELLES, F. V.; BIRGEL, E. H.; PERECIN, F.; BERTOLINI, M.; TRALDI, A. S.; PIMENTEL, J. R.; KOMNINOU, E. R.; SANGALLI, J. R.; NETO, P. F.; NUNES, M. T.; POGLIANI, F. C.; MEIRELLES, F. D.; KUBRUSLY, F. S.; VANNUCCHI, C. I.; SILVA, L. C. Delivery of cloned offspring: experience in Zebu cattle (Bos indicus). **Reprod Fertil Dev**, v. 22, n. 1, p. 88-97, 2010.

MITSUI, K.; TOKUZAWA, Y.; ITOH, H.; SEGAWA, K.; MURAKAMI, M.; TAKAHASHI, K.; MARUYAMA, M.; MAEDA, M.; YAMANAKA, S. The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. **Cell**, v. 113, n. 5, p. 631-642, 2003.

MUNOZ, M.; RODRIGUEZ, A.; DE FRUTOS, C.; CAAMANO, J. N.; DIEZ, C.; FACAL, N.; GOMEZ, E. Conventional pluripotency markers are unspecific for bovine embryonic-derived cell-lines. **Theriogenology**, v. 69, n. 9, p. 1159-1164, 2008.

MUNSIE, M. J.; MICHALSKA, A. E.; O'BRIEN, C. M.; TROUNSON, A. O.; PERA, M. F.; MOUNTFORD, P. S. Isolation of pluripotent embryonic stem cells from reprogrammed adult mouse somatic cell nuclei. **Curr Biol**, v. 10, n. 16, p. 989-992, 2000.

NAFEE, T. M.; FARRELL, W. E.; CARROLL, W. D.; FRYER, A. A.; ISMAIL, K. M. Epigenetic control of fetal gene expression. **BJOG**, v. 115, n. 2, p. 158-168, 2008.

NAGY, K.; SUNG, H. K.; ZHANG, P.; LAFLAMME, S.; VINCENT, P.; AGHA-MOHAMMADI, S.; WOLTJEN, K.; MONETTI, C.; MICHAEL, I. P.; SMITH, L. C.; NAGY, A. Induced Pluripotent Stem Cell Lines Derived from Equine Fibroblasts. **Stem Cell Rev**, v., n., p., 2011.

NAKAGAWA, M.; KOYANAGI, M.; TANABE, K.; TAKAHASHI, K.; ICHISAKA, T.; AOI, T.; OKITA, K.; MOCHIDUKI, Y.; TAKIZAWA, N.; YAMANAKA, S. Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. **Nat Biotechnol**, v. 26, n. 1, p. 101-106, 2008.

NETTERSHEIM, D.; BIERMANN, K.; GILLIS, A. J.; STEGER, K.; LOOIJENGA, L. H.; SCHORLE, H. NANOG promoter methylation and expression correlation during normal and malignant human germ cell development. **Epigenetics**, v. 6, n. 1, p. 114-122, 2011.

NG, H. H.; BIRD, A. DNA methylation and chromatin modification. **Curr Opin Genet Dev**, v. 9, n. 2, p. 158-163, 1999.

NICHOLS, J.; ZEVNIK, B.; ANASTASSIADIS, K.; NIWA, H.; KLEWE-NEBENIUS, D.; CHAMBERS, I.; SCHOLER, H.; SMITH, A. Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. **Cell**, v. 95, n. 3, p. 379-391, 1998.

NOWAK-IMIALEK, M.; KUES, W.; CARNWATH, J. W.; NIEMANN, H. Pluripotent stem cells and reprogrammed cells in farm animals. **Microsc Microanal**, v. 17, n. 4, p. 474-497, 2011.

OHGANE, J.; YAGI, S.; SHIOTA, K. Epigenetics: the DNA methylation profile of tissue-dependent and differentially methylated regions in cells. **Placenta**, v. 29 Suppl A, n., p. S29-35, 2008.

OKITA, K.; ICHISAKA, T.; YAMANAKA, S. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. **Nature**, v. 448, n. 7151, p. 313-317, 2007.

OKITA, K.; NAKAGAWA, M.; HYENJONG, H.; ICHISAKA, T.; YAMANAKA, S. Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors. **Science**, v. 322, n. 5903, p. 949-953, 2008.

OLIVEIRA, C.S.; DE SOUZA, M.M.; SARAIVA, N.Z.; TETZNER, T.A.; LIMA, M.R.; LOPES, F.L.; GARCIA, J.M. In vitro culture of bovine embryos in murine ES cell conditioned media negatively affects expression of pluripotency-related markers OCT4, SOX2 and SSEA1. **Reprod Domest Anim**, v. 47, n. 3, p. 428-35, 2012.

ONO, Y.; SHIMOZAWA, N.; MUGURUMA, K.; KIMOTO, S.; HIOKI, K.; TACHIBANA, M.; SHINKAI, Y.; ITO, M.; KONO, T. Production of cloned mice from embryonic stem cells arrested at metaphase. **Reproduction**, v. 122, n. 5, p. 731-736, 2001.

PANT, D.; KEEFER, C. L. Expression of pluripotency-related genes during bovine inner cell mass explant culture. **Cloning Stem Cells**, v. 11, n. 3, p. 355-365, 2009.

PAPAPETROU, E. P.; TOMISHIMA, M. J.; CHAMBERS, S. M.; MICA, Y.; REED, E.; MENON, J.; TABAR, V.; MO, Q.; STUDER, L.; SADELAIN, M. Stoichiometric and temporal requirements of Oct4, Sox2, Klf4, and c-Myc expression for efficient human iPSC induction and differentiation. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 106, n. 31, p. 12759-12764, 2009.

PARK, I. H.; ZHAO, R.; WEST, J. A.; YABUUCHI, A.; HUO, H.; INCE, T. A.; LEROU, P. H.; LENSCH, M. W.; DALEY, G. Q. Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors. **Nature**, v. 451, n. 7175, p. 141-146, 2008.

PERECIN, F.; MEO, S. C.; YAMAZAKI, W.; FERREIRA, C. R.; MERIGHE, G. K.; MEIRELLES, F. V.; GARCIA, J. M. Imprinted gene expression in in vivo- and in vitro-produced bovine embryos and chorio-allantoic membranes. **Genet Mol Res**, v. 8, n. 1, p. 76-85, 2009.

PESCE, M.; SCHOLER, H. R. Oct-4: control of totipotency and germline determination. **Mol Reprod Dev**, v. 55, n. 4, p. 452-457, 2000.

PICANCO-CASTRO, V.; RUSSO-CARBOLANTE, E.; REIS, L. C.; FRAGA, A. M.; DE MAGALHAES, D. A.; ORELLANA, M. D.; PANEPUCCI, R. A.; PEREIRA, L. V.; COVAS, D. T. Pluripotent reprogramming of fibroblasts by lentiviral mediated insertion of SOX2, C-MYC, and TCL-1A. **Stem Cells Dev**, v. 20, n. 1, p. 169-180, 2011.

PICANCO-CASTRO, V.; RUSSO-CARBOLANTE, E.; COVAS, D. T. Forced expression of nanog in human bone marrow-derived endothelial cells activates other six pluripotent genes. **Cell Reprogram**, v. 14, n. 3, p. 187-192, 2012.

PICK, M.; STELZER, Y.; BAR-NUR, O.; MAYSHAR, Y.; EDEN, A.; BENVENISTY, N. Clone- and gene-specific aberrations of parental imprinting in human induced pluripotent stem cells. **Stem Cells**, v. 27, n. 11, p. 2686-2690, 2009.

PLATH, K.; LOWRY, W. E. Progress in understanding reprogramming to the induced pluripotent state. **Nat Rev Genet**, v. 12, n. 4, p. 253-265, 2011.

POLEJAEVA, I. A.; CHEN, S. H.; VAUGHT, T. D.; PAGE, R. L.; MULLINS, J.; BALL, S.; DAI, Y.; BOONE, J.; WALKER, S.; AYARES, D. L.; COLMAN, A.; CAMPBELL, K. H. Cloned pigs produced by nuclear transfer from adult somatic cells. **Nature**, v. 407, n. 6800, p. 86-90, 2000.

RIDEOUT, W. M., 3RD; WAKAYAMA, T.; WUTZ, A.; EGGAN, K.; JACKSON-GRUSBY, L.; DAUSMAN, J.; YANAGIMACHI, R.; JAENISCH, R. Generation of mice from wild-type and targeted ES cells by nuclear cloning. **Nat Genet**, v. 24, n. 2, p. 109-110, 2000.

RIDEOUT, W. M., 3RD; EGGAN, K.; JAENISCH, R. Nuclear cloning and epigenetic reprogramming of the genome. **Science**, v. 293, n. 5532, p. 1093-1098, 2001.

ROACH, M.; WANG, L.; YANG, X.; TIAN, X. C. Bovine embryonic stem cells. **Methods Enzymol**, v. 418, n., p. 21-37, 2006.

ROSSANT, J. Stem cells from the Mammalian blastocyst. **Stem Cells**, v. 19, n. 6, p. 477-482, 2001.

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. **Curr Biol**, v. 13, n. 13, p. 1116-1121, 2003.

SANTOS, F.; DEAN, W. Epigenetic reprogramming during early development in mammals. **Reproduction**, v. 127, n. 6, p. 643-651, 2004.

SAS, S. I. I. **USER'S GUIDE: Basic and Statistic**: secondary title. Cary, NC: SAS Institute Inc., 1995.

SHI, D.; LU, F.; WEI, Y.; CUI, K.; YANG, S.; WEI, J.; LIU, Q. Buffalos (Bubalus bubalis) cloned by nuclear transfer of somatic cells. **Biol Reprod**, v. 77, n. 2, p. 285-291, 2007.

SIDHU, K. S.; TUCH, B. E. Derivation of three clones from human embryonic stem cell lines by FACS sorting and their characterization. **Stem Cells Dev**, v. 15, n. 1, p. 61-69, 2006.

SILVA, J.; BARRANDON, O.; NICHOLS, J.; KAWAGUCHI, J.; THEUNISSEN, T. W.; SMITH, A. Promotion of reprogramming to ground state pluripotency by signal inhibition. **PLoS Biol**, v. 6, n. 10, p. e253, 2008.

SOLTER, D. Mammalian cloning: advances and limitations. **Nat Rev Genet**, v. 1, n. 3, p. 199-207, 2000.

SRIDHARAN, R.; TCHIEU, J.; MASON, M. J.; YACHECHKO, R.; KUOY, E.; HORVATH, S.; ZHOU, Q.; PLATH, K. Role of the murine reprogramming factors in the induction of pluripotency. **Cell**, v. 136, n. 2, p. 364-377, 2009.

STADTFELD, M.; NAGAYA, M.; UTIKAL, J.; WEIR, G.; HOCHEDLINGER, K. Induced pluripotent stem cells generated without viral integration. **Science**, v. 322, n. 5903, p. 945-949, 2008.

SUMER, H.; LIU, J.; MALAVER ORTEGA, L. F.; LIM, M. L.; KHODADADI, K.; VERMA, P. J. NANOG is a key factor for induction of pluripotency in bovine adult fibroblasts. **J Anim Sci**, v., n., p., 2011.

SURANI, M. A. Imprinting and the initiation of gene silencing in the germ line. **Cell**, v. 93, n. 3, p. 309-312, 1998.

SUZUKI, J., JR.; 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. **Biol Reprod**, v. 84, n. 5, p. 947-956, 2011.

TADA, M.; TADA, T. Nuclear reprogramming of somatic nucleus hybridized with embryonic stem cells by electrofusion. **Methods Mol Biol**, v. 329, n., p. 411-420, 2006.

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. 663-676, 2006.

TAKAHASHI, K.; TANABE, K.; OHNUKI, M.; NARITA, M.; ICHISAKA, T.; TOMODA, K.; YAMANAKA, S. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. **Cell**, v. 131, n. 5, p. 861-872, 2007.

TALBOT, N. C.; POWELL, A. M.; CAMP, M.; EALY, A. D. Establishment of a bovine blastocyst-derived cell line collection for the comparative analysis of embryos created in vivo and by in vitro fertilization, somatic cell nuclear transfer, or parthenogenetic activation. **In Vitro Cell Dev Biol Anim**, v. 43, n. 2, p. 59-71, 2007.

TELUGU, B. P.; EZASHI, T.; ROBERTS, R. M. The promise of stem cell research in pigs and other ungulate species. **Stem Cell Rev**, v. 6, n. 1, p. 31-41, 2010.

TERAMOTO, K.; HARA, Y.; KUMASHIRO, Y.; CHINZEI, R.; TANAKA, Y.; SHIMIZU-SAITO, K.; ASAHINA, K.; TERAOKA, H.; ARII, S. Teratoma formation and hepatocyte differentiation in mouse liver transplanted with mouse embryonic stem cell-derived embryoid bodies. **Transplant Proc**, v. 37, n. 1, p. 285-286, 2005.

VAJTA, G.; PEURA, T. T.; HOLM, P.; PALDI, A.; GREVE, T.; TROUNSON, A. O.; CALLESEN, H. New method for culture of zona-included or zona-free embryos: the Well of the Well (WOW) system. **Mol Reprod Dev**, v. 55, n. 3, p. 256-264, 2000.

WADDINGTON, H. K. Fetal salvage in abruptio placentae. **Am J Obstet Gynecol**, v. 73, n. 4, p. 816-821, 1957.

WAKAYAMA, T.; PERRY, A. C.; ZUCCOTTI, M.; JOHNSON, K. R.; YANAGIMACHI, R. Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. **Nature**, v. 394, n. 6691, p. 369-374, 1998.

WAKAYAMA, T.; RODRIGUEZ, I.; PERRY, A. C.; YANAGIMACHI, R.; MOMBAERTS, P. Mice cloned from embryonic stem cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 96, n. 26, p. 14984-14989, 1999.

WAKAYAMA, T.; YANAGIMACHI, R. Mouse cloning with nucleus donor cells of different age and type. **Mol Reprod Dev**, v. 58, n. 4, p. 376-383, 2001.

WAKITANI, S.; TAKAOKA, K.; HATTORI, T.; MIYAZAWA, N.; IWANAGA, T.; TAKEDA, S.; WATANABE, T. K.; TANIGAMI, A. Embryonic stem cells injected into the mouse knee joint form teratomas and subsequently destroy the joint. **Rheumatology (Oxford)**, v. 42, n. 1, p. 162-165, 2003.

WANG, L.; DUAN, E.; SUNG, L. Y.; JEONG, B. S.; YANG, X.; TIAN, X. C. Generation and characterization of pluripotent stem cells from cloned bovine embryos. **Biol Reprod**, v. 73, n. 1, p. 149-155, 2005.

WANI, N. A.; WERNERY, U.; HASSAN, F. A.; WERNERY, R.; SKIDMORE, J. A. Production of the first cloned camel by somatic cell nuclear transfer. **Biol Reprod**, v. 82, n. 2, p. 373-379, 2010.

WELLS, D. N.; LAIBLE, G.; TUCKER, F. C.; MILLER, A. L.; OLIVER, J. E.; XIANG, T.; FORSYTH, J. T.; BERG, M. C.; COCKREM, K.; L'HUILLIER, P. J.; TERVIT, H. R.; OBACK, B. Coordination between donor cell type and cell cycle stage improves nuclear cloning efficiency in cattle. **Theriogenology**, v. 59, n. 1, p. 45-59, 2003.

WERNIG, M.; MEISSNER, A.; FOREMAN, R.; BRAMBRINK, T.; KU, M.; HOCHEDLINGER, K.; BERNSTEIN, B. E.; JAENISCH, R. In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state. **Nature**, v. 448, n. 7151, p. 318-324, 2007.

WHITWORTH, K. M.; PRATHER, R. S. Somatic cell nuclear transfer efficiency: how can it be improved through nuclear remodeling and reprogramming? **Mol Reprod Dev**, v. 77, n. 12, p. 1001-1015, 2010.

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. 810-813, 1997.

WILMUT, I. Cloning and stem cells. **Cloning Stem Cells**, v. 4, n. 2, p. 103-104, 2002.

WU, Z.; CHEN, J.; REN, J.; BAO, L.; LIAO, J.; CUI, C.; RAO, L.; LI, H.; GU, Y.; DAI, H.; ZHU, H.; TENG, X.; CHENG, L.; XIAO, L. Generation of pig induced pluripotent stem cells with a drug-inducible system. **J Mol Cell Biol**, v. 1, n. 1, p. 46-54, 2009.

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. **Nat Genet**, v. 39, n. 3, p. 295-302, 2007.

YING, Q. L.; WRAY, J.; NICHOLS, J.; BATLLE-MORERA, L.; DOBLE, B.; WOODGETT, J.; COHEN, P.; SMITH, A. The ground state of embryonic stem cell self-renewal. **Nature**, v. 453, n. 7194, p. 519-523, 2008.

YU, J.; VODYANIK, M. A.; SMUGA-OTTO, K.; ANTOSIEWICZ-BOURGET, J.; FRANE, J. L.; TIAN, S.; NIE, J.; JONSDOTTIR, G. A.; RUOTTI, V.; STEWART, R.; SLUKVIN, II; THOMSON, J. A. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. **Science**, v. 318, n. 5858, p. 1917-1920, 2007.

YU, J.; HU, K.; SMUGA-OTTO, K.; TIAN, S.; STEWART, R.; SLUKVIN, II; THOMSON, J. A. Human induced pluripotent stem cells free of vector and transgene sequences. **Science**, v. 324, n. 5928, p. 797-801, 2009.

ZHAO, R.; DALEY, G. Q. From fibroblasts to iPS cells: induced pluripotency by defined factors. **J Cell Biochem**, v. 105, n. 4, p. 949-955, 2008.

ZHAO, X. Y.; LI, W.; LV, Z.; LIU, L.; TONG, M.; HAI, T.; HAO, J.; GUO, C. L.; MA, Q. W.; WANG, L.; ZENG, F.; ZHOU, Q. iPS cells produce viable mice through tetraploid complementation. **Nature**, v. 461, n. 7260, p. 86-90, 2009.

ZHOU, S.; DING, C.; ZHAO, X.; WANG, E.; DAI, X.; LIU, L.; LI, W.; LIU, Z.; WAN, H.; FENG, C.; HAI, T.; WANG, L.; ZHOU, Q. Successful generation of cloned mice using nuclear transfer from induced pluripotent stem cells. **Cell Res**, v. 20, n. 7, p. 850-853, 2010.

ANEXOS

ANEXO 1 – Parecer da Comissão da Bioética da FZEA/USP

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos
Departamento de Ciências Básicas

Pirassununga, 30 de outubro de 2009.

Assunto: Emissão de parecer do Comitê de Ética em Experimentação Animal da FZEA.

Prezado Professor,

Tendo por base os princípios estabelecidos no Regimento Geral do Comitê de Ética em Experimentação Animal da FZEA/USP, informo que o projeto de pesquisa "Efeitos da indução gênica e reprogramação através da transferência de núcleo na produção *in vitro* de embriões bovinos", coordenado pelo Prof. Dr. Flávio Vieira Meirelles recebeu parecer favorável de um pesquisador que atua na área de experimentação animal. Deste modo, a Comissão de Ética em Experimentação Animal da FZEA considerou-o aprovado.

Atenciosamente,

Prof. Dr. João Alberto Negrão
Presidente da Comissão de Ética

Prof. Dr. Flávio Vieira Meirelles
Departamento de Ciências Básicas

Av. Duque de Caxias Norte, 225 - 13635-900 – Pirassununga, SP
Fone: 19-3565.4117/4143 - Fax: 19-3561.8606 - E-mail: zab@usp.br

ANEXO 2 – Parecer do Comitê de Ética em pesquisa – HCFMRP/USP

www.hcrp.fmrp.usp.br

USP - RIBEIRÃO
assistência - ensino - pesquisa

Ribeirão Preto, 30 de setembro de 2009

Ofício nº 3253/2009
CEP/MGV

PROCESSO HCRP nº 1986/2009

Prezado Professor:

O trabalho intitulado **"GERAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO PLURIPOTENTES INDUZIDAS (iPS) HUMANAS UTILIZANDO VETORES LENTIVIRAIS E ADENOVIRAIS"**, foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em sua 296ª Reunião Ordinária realizada em 28/09/2009, e enquadrado na categoria: **APROVADO.**

Entretanto, deve-se aguardar a manifestação da CONEP, pois o projeto será encaminhado para apreciação e aprovação.

Atenciosamente,

DRª MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA
Vice-Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa do HCRP e da FMRP-USP

Ilustríssimo Senhor
PROF. DR. DIMAS TADEU COVAS
Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto

Comitê de Ética em Pesquisa HCRP e FMRP-USP - Campus Universitário
FWA – 0000 2733; IRB – 0000 2186 e Registro SISNEP/CONEP nº 4
Fone (16) 3602-2228 - E-mail : cep@hcrp.fmrp.usp.br
Monte Alegre 14048-900 Ribeirão Preto SP

ANEXO 3 – Parecer do CONEP – HCFMRP/USP

USP - RIBEIRÃO
assistência - ensino - pesquisa

Mem. nº 722/2010
GS-3/SMFK

Ribeirão Preto, 11 de junho de 2010

Prezado Senhor
PROF. DR. DIMAS TADEU COVAS
Fundação Hemocentro

Senhor Professor,

Atendendo solicitação da Vice-Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa, Drª. Marcia Guimarães Villanova, encaminho a Vossa Senhoria Parecer CONEP nº 250/2010, referente ao Projeto de Pesquisa intitulado **"GERAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO PLURIPOTENTES INDUZIDAS (iPS) HUMANAS UTILIZANDO VETORES LENTIVIRAIS E ADENOVIRAIS"**, de acordo com o Processo HCRP nº 1986/2009.

O parecer informa que seu projeto encontra-se **APROVADO na CONEP.**

Atenciosamente.

SUSIMARA FURIAMA KATO
Diretora do Serviço de Comunicações Administrativas
R.F. nº 7882

Comitê de Ética em Pesquisa HC e FMRP-USP - Campus Universitário
Fone (16) 3602-2228 - E-mail : cep@hcrp.usp.br
Monte Alegre 14048-900 Ribeirão Preto SP