



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

**ENUCLEAÇÃO QUÍMICA DE OVÓCITOS BOVINOS E REPROGRAMAÇÃO
CELULAR POR FATORES DEFINIDOS EM MURINOS**

MARCELO TIGRE MOURA

TESE DE DOUTORADO EM CIÊNCIAS ANIMAIS

BRASÍLIA/DF
MARÇO DE 2011



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**ENUCLEAÇÃO QUÍMICA DE OVÓCITOS BOVINOS E REPROGRAMAÇÃO
CELULAR POR FATORES DEFINIDOS EM MURINOS**

MARCELO TIGRE MOURA

ORIENTADORA: CAROLINA MADEIRA LUCCI

TESE DE DOUTORADO EM CIÊNCIAS ANIMAIS

PUBLICAÇÃO: 43D/2011

**BRASÍLIA/DF
MARÇO DE 2011**

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**ENUCLEAÇÃO QUÍMICA DE OVÓCITOS BOVINOS E REPROGRAMAÇÃO
CELULAR POR FATORES DEFINIDOS EM MURINOS**

MARCELO TIGRE MOURA

**TESE DE DOUTORADO SUBMETIDA AO PROGRAMA DE
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS ANIMAIS, COMO
PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS À OBTENÇÃO
DO GRAU DE DOUTOR EM CIÊNCIAS ANIMAIS.**

APROVADA POR:

**Carolina Madeira Lucci, D.Sc. (Universidade de Brasília – UnB).
(ORIENTADORA)**

**Alexandre Rodrigues Caetano, Ph.D. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia).
(EXAMINADOR INTERNO)**

**Maurício Machaim Franco, D.Sc. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia).
(EXAMINADOR EXTERNO)**

**Cristiano Castro Lacorte, Ph.D. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia).
(EXAMINADOR EXTERNO)**

**Márcio José Poças Fonseca, D.Sc. (Universidade de Brasília – UnB).
(EXAMINADOR EXTERNO)**

Brasília/DF, 18 de Março de 2011.

*“Poucas obras propiciam muito amor-próprio,
muito trabalho propicia infinita modéstia”*

Honoré de Balzac
(1799-1850)

**“Dedico ao meu Pai,
pelos valiosos ensinamentos sobre ciência,
e principalmente, sobre a vida”**

**Agradecimento especial ao Dr. Rodolfo Rumpf,
pelo apoio durante o desenvolvimento do presente trabalho.**

AGRADECIMENTOS

In memoriam... Minha avó Dolores, com quem compartilhava o amor pela verdadeira arte.

Aos meus pais, Romero e Teresa, pelo amor incondicional durante toda minha vida.

Aos meus irmãos Francisco, Romero, Helena e Virgínia.

Aos meus primos e tios pelo carinho e apoio contínuos.

À minha madrinha Adriana.

À galera do Colégio de Aplicação do Recife, CAP98, vocês são.... vocês sabem!!

Ao meu co-orientador Kevin Eggen, pela oportunidade de desenvolver um projeto sob sua orientação, pela confiança e apoio contínuo.

A Profa. Carolina Lucci, pelo apoio para realização deste trabalho.

Ao amigo Regivaldo que teve grande contribuição no minha formação durante o período na Embrapa.

Aos pesquisadores Eduardo e Maurício, pela amizade e discussões que contribuíram para o desenvolvimento do projeto.

Aos amigos do Cenargen e todos os membros da Fazenda Sucupira.

Aos amigos nos EUA, Justin, Luis, Gabriella, Evangelos, Esther, Sophie, Inna, Peter, Nick, Julia, Shila, Diane, Kara, Steve, Sinisha, Claire, Lee, Ângela, funcionários e professores da Universidade de Harvard com quem convivi durante minha estada.

A Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia pelo suporte financeiro para a realização deste trabalho.

A UnB, funcionários e professores, pela contribuição nesta etapa de minha formação.

A Universidade de Harvard, pela experiência enriquecedora que em muito contribuiu para minha formação profissional.

A Geneal Biotecnologia Animal que contribuiu para realização de experimentos fundamentais para o projeto da minha tese de doutorado.

A CAPES, pelo apoio financeiro.

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE TABELAS	xii
LISTA DE QUADROS	xiv
LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIACÕES	xv
GLOSSÁRIO	xvii
RESUMO	xix
ABSTRACT	xx
CAPÍTULO 1 – Enucleação química de ovócitos bovinos e reprogramação celular por fatores definidos em murinos	
1.1 INTRODUÇÃO	1
1.2 PROBLEMÁTICA E RELEVÂNCIA	6
1.3 OBJETIVOS	11
1.4 REVISÃO DA LITERATURA	12
1.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	35
CAPÍTULO 2 - Análise da toxicidade e aprimoramento da enucleação química de ovócitos bovinos pela actinomicina D	
2.1 RESUMO	61
2.2 ABSTRACT	62
2.3 INTRODUÇÃO	63
2.4 MATERIAL E MÉTODOS	66
2.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	73
2.6 CONCLUSÕES	79
2.7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	80
CAPÍTULO 3 -Análise da especificidade da actinomicina D na enucleação química de ovócitos destinados a transferência nuclear.	
3.1 RESUMO	88
3.2 ABSTRACT	89
3.3 INTRODUÇÃO	90
3.4 MATERIAL E MÉTODOS	93
3.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	99
3.6 CONCLUSÕES	112
3..7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	113
CAPÍTULO 4 - Tentativas de induzir a pluripotência por fatores definidos em células somáticas na ausência de oct4 exógeno.	
4.1 RESUMO	120

4.2 ABSTRACT	121
4.3 INTRODUÇÃO	122
4.4 MATERIAL E MÉTODOS	126
4.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	130
4.6 CONCLUSÕES	136
4.7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	137
CAPÍTULO 5 - Considerações finais	147
5.1 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	149

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1	Página
Figura 1.1. Transferência nuclear em mamíferos.	3
Figura 1.2. Reprogramação de células somáticas para pluripotência.	4
Figura 1.3. Reprogramação epigenética para produção de animais transgênicos.	6
Figura 1.4. Principais eventos durante a reprogramação epigenética em mamíferos.	8
Figura 1.5. Dinâmica da cromatina durante o desenvolvimento e reprogramação epigenética.	9
Figura 1.6. Alternativas para a enucleação de ovócitos de mamíferos.	16
Figura 1.7. Células-tronco embrionárias (CTE) de camundongos.	21
Figura 1.8. Estabelecimento e conversão dos estados pluripotentes em mamíferos.	24
Figura 1.9. Células iPS de camundongos.	26
Figura 1.10. Células pluripotentes humanas.	27
Figura 1.11. Potencial terapêutico das células iPS.	29
CAPÍTULO 2	
Figura 2.1. Efeito das células do <i>cumulus</i> na toxicidade da actinomicina D durante a maturação <i>in vitro</i> de ovócitos bovinos.	70
Figura 2.2. Avaliação do efeito da transcrição das células do <i>cumulus</i> na toxicidade da actinomicina D durante a maturação <i>in vitro</i> de ovócitos bovinos.	71
CAPÍTULO 3	

Figura 3.1. Formação de blastocistos após transferência nuclear com ovócitos enucleados pela actinomicina D.	101
Figura 3.2. Mecanismo de resposta a danos no DNA em ovócitos e embriões.	102
Figura 3.3. Bezerra obtida no grupo TN (C) no experimento da enucleação de ovócitos com actinomicina D.	106
Figura 3.4. Gestação obtida a partir de ovócito tratado com actinomicina D, enucleado por micropipeta, e reconstruído com células somática.	106
Figura 3.5. Efeito da enucleação pela actinomicina D no desenvolvimento embrionário.	110
CAPÍTULO 4	
Figura 4.1. Linhagem celular iPS obtida sem Oct4 exógeno.	131
Figura 4.2. Efeito da prostaglandina E2 na reprogramação de fibroblastos por fatores definidos.	134
Figura 4.3 - Reprogramação de hepatócitos por fatores definidos.	135

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2	Página
Tabela 2.1 - Efeito das células do <i>cumulus</i> na toxicidade da actinomicina D durante a maturação <i>in vitro</i> de ovócitos bovinos.	74
Tabela 2.2 - Efeito da transcrição das células do <i>cumulus</i> na toxicidade da actinomicina D durante a maturação <i>in vitro</i> de ovócitos bovinos.	75
Tabela 2.3 - Desenvolvimento embrionário partenogênético bovino após o tratamento de ovócitos com diferentes concentrações de actinomicina D por duas horas.	76
Tabela 2.4 - Desenvolvimento embrionário partenogênético bovino após tratamento de ovócitos com 5 µg mL ⁻¹ de actinomicina D por diferentes períodos.	77
Tabela 2.5 - Desenvolvimento embrionário partenogênético bovino após tratamento de ovócitos com 5 µg mL ⁻¹ de actinomicina D por períodos de até uma hora.	77
Tabela 2.6 - Desenvolvimento embrionário partenogênético bovino após tratamento de ovócitos com diferentes concentrações de actinomicina D por quinze minutos.	78
CAPÍTULO 3	
Tabela 3.1 - Desenvolvimento embrionário a partir de ovócitos enucleados pela actinomicina D e reconstruídos com células somáticas.	99
Tabela 3.2 - Efeito do tratamento de ovócitos com actinomicina D na qualidade dos embriões reconstruídos após dois dias de cultivo.	101
Tabela 3.3 - Apoptose em embriões obtidos a partir ovócitos enucleados pela actinomicina D e reconstruídos com células somáticas.	104
Tabela 3.4 - Desenvolvimento <i>in vivo</i> de embriões obtidos por transferência nuclear de células somáticas em ovócitos enucleados pela actinomicina D.	106
Tabela 3.5 - Desenvolvimento embrionário partenogênético bovino após o tratamento de ovócitos com mitomicina C.	108
Tabela 3.6 - Desenvolvimento embrionário a partir de ovócitos tratados com mitomicina C e reconstruídos com células somáticas.	109

Tabela 3.7. Desenvolvimento <i>in vivo</i> de embriões obtidos pela transferência nuclear de células somáticas em ovócitos enucleados pela Mitomicina C.	109
CAPÍTULO 4	
Tabela 4.1. Efeito da expressão do Nr5a2 na reprogramação por fatores definidos de fibroblastos em células pluripotentes.	131
Tabela 4.2. Efeito da concentração de Nr5a2 na reprogramação de fibroblastos em células pluripotentes por fatores definidos sem Oct4 exógeno.	132
Tabela 4.3 - Efeito da prostaglandina E2 na reprogramação de fibroblastos por fatores definidos.	133

LISTA DE QUADROS

CAPÍTULO 1	Página
Quadro 1.1. Comparação entre tecnologias de reprogramação epigenética.	7
Quadro 1.2 - Uso de moléculas para reduzir o número de fatores de transcrição necessários para produção de células iPS.	31

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIACÕES

6DMAP	<i>6-Dimethylaminopurine</i>
cDNA	DNA complementar
CO ₂	Dióxido de Carbono
CP	Corpúsculo Polar
DMEM	<i>Dulbecco's Minimum Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
FSH	<i>Follicle Stimulating Hormone</i>
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>
HCG	<i>Human Chorionic Gonadotropin</i>
HGF	<i>Hepatocyte growth factor</i>
iPS	<i>Induced pluripotent stem</i>
KSR	<i>Knockout Serum Replacement</i>
LAV	Meio de Lavagem
LH	<i>Luteinizing Hormone</i>
LIF	<i>Leukaemia Inhibitory Factor</i>
MI	Metáfase I
MII	Metáfase II
MCP	Morte Celular Programada
MIV	Maturação <i>in vitro</i>
MPF	<i>Metaphase Promoting Factor</i>
O ₂	Oxigênio
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PGE2	Prostaglandina E2
PMSG	<i>Pregnant Mare Serum Gonadotropin</i>
RNA	Ácido ribonucléico
SFB	Soro Fetal Bovino
SOFaaci	Fluido Sintético de Oviduto com Aminoácidos, citrato e mio-inositol
TII	Telófase II

TN	Transferência Nuclear
UV	Ultravioleta
VPA	<i>Valproic acid</i>

GLOSSÁRIO

cDNA: DNA complementar sintetizado por uma enzima transcriptase reversa utilizando como molde uma molécula de RNA.

Células-tronco embrionárias: Células que apresentam a capacidade de proliferar em estado indiferenciado e quando estimuladas se diferenciam em tipos celulares pertencentes aos três folhetos germinativos.

Clonagem animal: Produção de animais geneticamente idênticos a partir da técnica de transferência nuclear.

Clonagem gênica: é o processo de construção, propagação e seleção de moléculas de DNA recombinante.

Efeito Parácrino: A ação de uma molécula produzida por uma célula sobre as células vizinhas.

Epigenética: é a área da genética que estuda o estudo dos mecanismos que causam variação na atividade gênica mas que não dependem de mudanças na sequência primária do DNA e cujos efeitos podem ser herdados.

Fator de transcrição: proteína que regula a atividade gênica pelo contato com sequências específicas de DNA e recrutamento de cofatores.

Hidropsia: é caracterizada pelo acúmulo anormal de líquido nos tecidos ou cavidades do organismo.

Metilação de DNA: Uma modificação química do DNA (adição de um grupo metil na posição cinco da citosina) que pode regular a atividade gênica ao interferir na capacidade de proteínas em associar-se ao DNA e/ou pelo recrutamento de proteínas não-histônicas para geralmente compactar a cromatina.

Nucleossomo: Unidade fundamental da cromatina. O nucleossomo é formado por oito proteínas denominadas de histonas que compactam a molécula de DNA. Por meio de diversas modificações covalentes, a interação entre o nucleossomo e o DNA varia, permitindo ou não a realização de diversos processos celulares como a transcrição, replicação, reparos no DNA, e segregação dos cromossomos durante a divisão celular.

Pluripotência: Capacidade celular de diferenciação em todos os tecidos que compõem o organismo.

Receptor nuclear: são receptores intracelulares que apresentam atividade como fatores de transcrição mediada por moléculas sinal ou metabólitos intracelulares.

Senescência: Um processo de bloqueio irreversível da proliferação celular devido ao encurtamento dos telômeros, ativação do locus INK4a/ARF, ou danos ao genoma.

Totipotência: Capacidade celular de diferenciação em todos os tecidos que compõem o organismo, placenta e anexos placentários.

Transdução: método viral de introdução de DNA exógeno em células.

Transfecção: método não viral de introdução de DNA a células, como a eletroporação ou o uso de lipossomos.

Transformação oncogênica: Processo pelo qual uma célula passa para um estado cancerígeno.

CAPÍTULO 1. ENUCLEAÇÃO QUÍMICA DE OVÓCITOS BOVINOS E REPROGRAMAÇÃO CELULAR POR FATORES DEFINIDOS EM MURINOS

Marcelo Tigre Moura ^(1,2), Carolina Madeira Lucci ⁽¹⁾, e Rodolfo Rumpf ^(1,2,3)

⁽¹⁾ Universidade de Brasília (UnB), Brasília, DF.

⁽²⁾ Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF.

⁽³⁾ Geneal Biotecnologia Animal, Uberaba, MG.

RESUMO

O processo de diferenciação celular foi por muito tempo considerado progressivo e irreversível. O desenvolvimento da clonagem por transferência nuclear e da indução da pluripotência por fatores definidos (*Oct4*, *Sox2*, *cMyc*, e *Klf4*) demonstrou inequivocamente que células somáticas podem ser reprogramadas para um estado indiferenciado. No entanto, essas tecnologias permanecem pouco eficientes devido a fatores técnicos e biológicos. A enucleação dos ovócitos representa um dos principais fatores limitantes da transferência nuclear, enquanto que a integração dos transgenes no genoma durante a indução da pluripotência pode afetar negativamente o fenótipo das células. Por isso, os objetivos do presente trabalho foram: aprimorar a enucleação química de ovócitos pela actinomicina D e investigar um mecanismo que permita reprogramar para pluripotência sem *Oct4* exógeno, ao compensar a atividade do transgene com moléculas. A investigação da enucleação por actinomicina D permitiu eliminar a toxidez da abordagem durante a maturação dos ovócitos, aumentar a eficiência do procedimento e reduzir drasticamente o período de incubação com a actinomicina D. Diferentes abordagens *in vitro* e *in vivo* permitiram determinar que a principal limitação do desenvolvimento embrionário após a enucleação pela actinomicina D é a presença dos cromossomos expostos a actinomicina D dentro gameta. A ativação do gene *Nr5a2* foi testada como mecanismo para substituir o *Oct4* exógeno na indução da pluripotência, baseando-se na importância desse receptor nuclear na regulação do *Oct4* durante o desenvolvimento. A expressão forçada do *Nr5a2* não aumentou a eficiência da reprogramação com *Oct4*, *Sox2*, e *Klf4* em fibroblastos, e em conjunto com *Sox2* e *Klf4* apenas não resultou em células reprogramadas. As tentativas de ajustar a estequiometria das partículas virais e de elevar a expressão endógena do *Nr5a2* pelo uso de agonistas também não foram bem sucedidas. Esforços mais recentes utilizando hepatócitos podem determinar se existem limitações tecido-específicas. Apesar das evidências recentes na literatura em suporte ao modelo, ainda não foi possível repetir tais resultados.

Palavras chave: Reprogramação, epigenética, transferência nuclear, células-tronco.

CHEMICAL ENUCLEATION OF BOVINE OOCYTES AND CELLULAR REPROGRAMMING BY DEFINED FACTORS IN MICE

Marcelo Tigre Moura ^(1,2), Carolina Madeira Lucci ⁽¹⁾, e Rodolfo Rumpf ^(1,2,3)

⁽¹⁾ Universidade de Brasília (UnB), Brasília, DF.

⁽²⁾ Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF.

⁽³⁾ Geneal Biotecnologia Animal, Uberaba, MG.

ABSTRACT

Cell differentiation has long been considered a progressive and irreversible process. The development of cloning by nuclear transfer and induced pluripotency by defined factors (*Oct4*, *Sox2*, *cMyc*, and *Klf4*) demonstrated unequivocally that somatic cells can be reprogrammed to an undifferentiated state. However, both technologies hold low efficiencies due to technical and biological factors. The enucleation of oocytes represents one of the main limiting factors for nuclear transfer, while the integration of reprogramming vectors in the genome during the induction of pluripotency can negatively affect cell phenotype. Due to these facts, the objectives of the present research were: to improve oocyte chemical enucleation by actinomycin D and to investigate a mechanism that would allow reprogramming in the absence of exogenous Oct4, by replacing the transgene with small molecules. The investigation of oocyte enucleation by actinomycin D conferred with the possibility to eliminate the toxic effect of the approach on oocyte maturation, to increase enucleation efficiency and drastically reduce incubation period with the inhibitor. Different *in vitro* and *in vivo* approaches altogether allowed the conclusion that the main limiting factor to embryonic development after enucleation by actinomycin D is the presence of chromosomes exposed to the inhibitor inside the oocyte. The induction of Nr5a2 expression was tested as a possible mechanism to replace exogenous Oct4 during reprogramming to pluripotency based on upstream roles of the nuclear receptor on Oct4 levels during development. The ectopic expression of Nr5a2 did not increase reprogramming efficiency with Oct4, Sox2, and Klf4 in fibroblasts, and concomitant with Sox2 and Klf4 only did not yield reprogrammed cells. Fine-tuning of viral stoichiometry and attempts to induce endogenous expression of Nr5a2 by agonists were unsuccessful. Recent efforts with hepatocytes might shed some light on possible cell type specific limitations. In spite of recent literature in accordance with this model, it has been challenging to reproduce such results.

Keywords: Reprogramming, epigenetics, nuclear transfer, stem cells.

1.1. INTRODUÇÃO

O processo de fecundação permite que os genomas haplóides do ovócito e do espermatozóide se unam e formem um novo organismo euplóide. Mas antes que haja a singamia, os núcleos dos gametas precisam passar por profundas mudanças. O genoma do espermatozóide apresenta-se em grande parte associado a proteínas denominadas protaminas (revisto por MCLAY & CLARKE, 2003; OOI & HENIKOFF, 2007), fato que aumenta consideravelmente a compactação dos cromossomos (SASSONE-CORSI, 2002; KIMMINS & SASSONE-CORSI, 2005). Poucas horas após a penetração do espermatozóide no ovócito, o genoma paterno sofre importantes modificações, como a substituição das protaminas por histonas e a desmetilação ativa do DNA (MAYER et al., 2000; OSWALD et al., 2000; MCLAY & CLARKE, 2003). Estas mudanças garantem que os cromossomos do espermatozóide sejam corretamente duplicados e que os genes contidos nesses cromossomos possam ser transcritos nas divisões celulares subsequentes.

Concomitante à formação da membrana nuclear dos genomas haplóides (agora denominados pró-núcleos) começa a replicação dos cromossomos, e quando concluída, os pró-núcleos se fundem para a realização da primeira divisão mitótica do embrião. Durante as divisões subsequentes existe uma redução gradativa do volume celular, apesar da manutenção do potencial de diferenciação dos blastômeros (MOORE et al., 1968; WILLADSEN, 1981; CHAN et al., 2000). Embora estas células mantenham-se semelhantes em morfologia durante múltiplas clivagens, o genoma é submetido a um novo remodelamento, contemplando por exemplo, uma redução passiva dos níveis de metilação de DNA (RIDEOUT et al., 2001; FENG et al., 2010). Durante o período de compactação dos embriões, os níveis globais de metilação de DNA começam a ser restabelecidos e estabilizam no estágio de blastocisto (REIK et al., 2001; FENG et al., 2010).

O embrião no estágio de blastocisto delimita o primeiro evento de diferenciação celular do organismo: a formação do embrioblasto (células que darão origem aos diversos tecidos do animal) e o trofoblasto, que compreende as células responsáveis pela formação da placenta e anexos placentários (revisto por ROSSANT & TAM, 2009). A determinação do embrioblasto representa apenas o início de um gradual e complexo mecanismo de restrição de potencial de

diferenciação, que resulta em mais de duzentos tipos celulares diferentes que compõem o organismo adulto (TAM & LOEBEL, 2007).

As células apresentam grande estabilidade fenotípica ao fim do processo de diferenciação. Os tecidos em mamíferos adultos são renovados preferencialmente por mitose de células diferenciadas ou pela diferenciação de células-tronco tecido-específicas (DOR et al., 2004; ORKIN & ZON, 2008). O isolamento e cultivo *in vitro* de células somáticas resulta em senescência na ausência de mudanças morfológicas ou reversão do estado diferenciado (RUBIN, 2002). Tentativas de desestabilizar o estado diferenciado com estímulos parácrinos *in vitro* por meio de co-cultivos não foram bem sucedidos (YING et al., 2002; TERADA et al., 2002).

Apesar da vasta evidência da estabilidade fenotípica das células somáticas, em peixes e anfíbios, algumas espécies apresentam a capacidade de regenerar tecidos e órgãos, mediados por eventos de des-diferenciação (BROCKES & KUMAR 2003; TANAKA, 2003). Além disso, tumores originários de células germinativas podem apresentar células cancerígenas diferenciadas em osso, cartilagem, pele, dentre outros tecidos (CHAMBERS & SMITH, 2004). Estes fenômenos em conjunto sugerem que, sob determinadas condições, o processo de especialização celular pode ser revertido. O desenvolvimento da técnica de transferência nuclear (TN) permitiu investigar diretamente a reversibilidade da diferenciação celular (Figura 1.1).

Baseando-se na capacidade dos ovócitos de remodelar o núcleo do espermatozóide, diversos autores utilizaram a TN em anfíbios para demonstrar que a introdução do núcleo diferenciado pode revertê-lo para uma condição equivalente ao zigoto, ou seja, o estado de totipotência (BRIGGS & KING, 1952; GURDON et al., 1958; GURDON & BYRNE, 2003; TAGARELLI et al., 2004; GURDON & MELTON, 2008). Outra importante conclusão desta série de experimentos foi a demonstração inequívoca da equivalência genômica entre as células do organismo. Este fato demonstra que a sequência primária do DNA não é o único nível de regulação gênica, e que a transição entre estados epigenéticos seria importante para a reversão fenotípica das células somáticas. Por isso, este fenômeno é denominado de reprogramação epigenética. O estabelecimento da clonagem por TN em mamíferos demonstrou que a tecnologia não está restrita aos anfíbios e peixes (WILMUT et al., 1997, 2002; RIDEOUT et al., 2001; MEISSNER & JAENISCH, 2006; YANG et al., 2007).

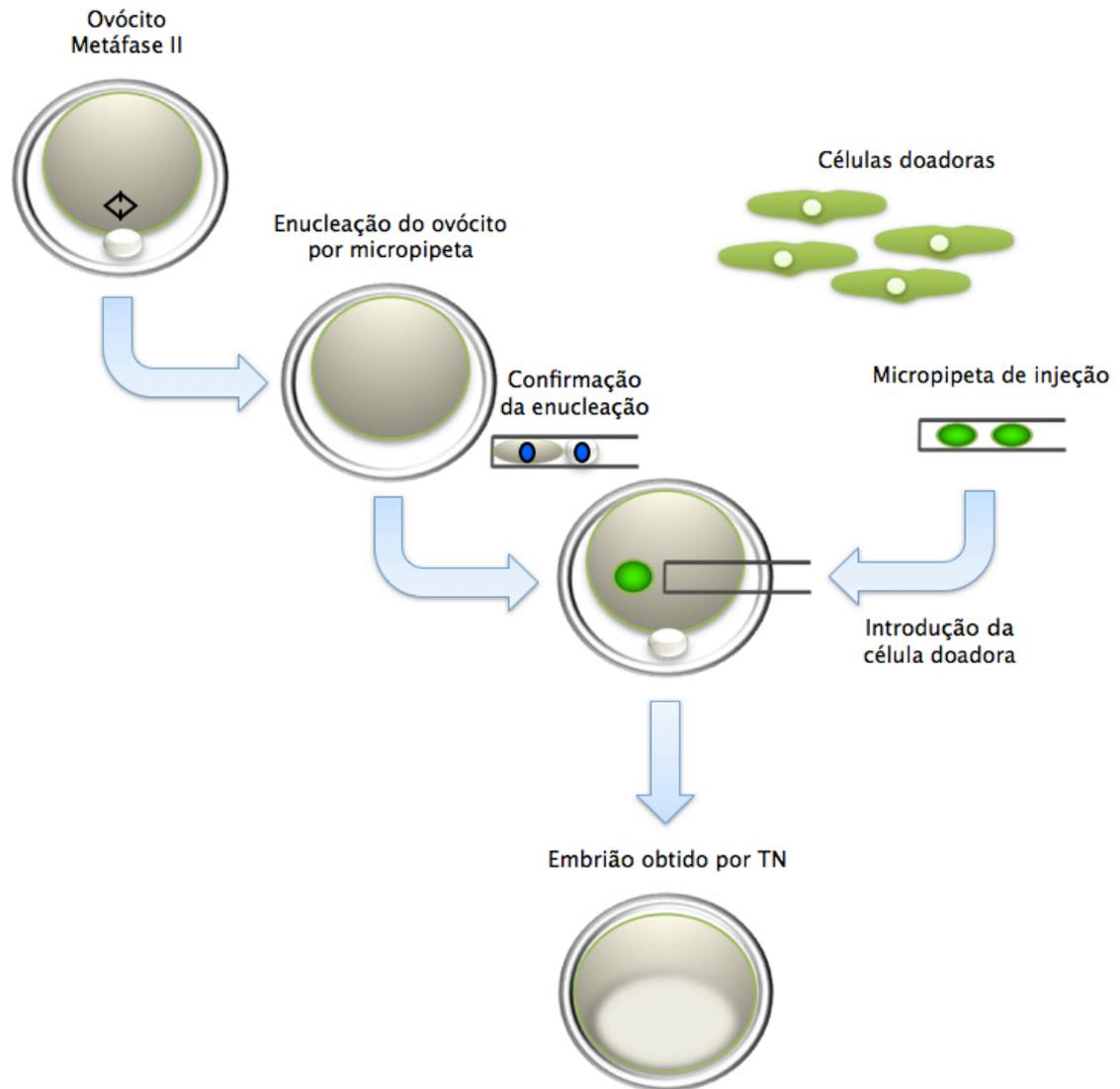


Figura 1.1 - Transferência nuclear em mamíferos. Inicialmente uma porção do citoplasma do gameta adjacente ao corpúsculo polar é removido por micropipeta. A biópsia obtida é exposta a ultravioleta para confirmar a enucleação. Em seguida, o genoma do doador é introduzido no citoplasma receptor por injeção do núcleo ou eletro fusão da célula inteira.

A capacidade de reprogramação do ovócito estimulou a investigação de outros tipos celulares ou métodos de reprogramação. A obtenção de células híbridas entre células de carcinomas embrionários demonstrou que a última apresentava um fenótipo dominante na célula tetraplóide resultante da fusão, tornando-a indiferenciada (MILLER & RUDDLE, 1976). Análises mais recentes demonstram que a fusão com células-tronco embrionárias (CTE) tem a capacidade de suprimir o estado diferenciado em células somáticas (TADA et al., 2001; COWAN et al., 2005; YU et al., 2006). Ao contrário da clonagem por TN que

reprograma as células somáticas a um estado totipotente equivalente ao zigoto, o processo de fusão de células diferenciadas com CTE produz células pluripotentes (COWAN et al., 2005; YU et al., 2006), condição semelhante ao embrioblasto no blastocisto (Figura 1.2). Devido a ausência de métodos para enuclear CTE, a reprogramação por fusão produz células tetraplóides, fato que limita o potencial desta tecnologia (HOCHEDLINGER & JAENISCH, 2006).

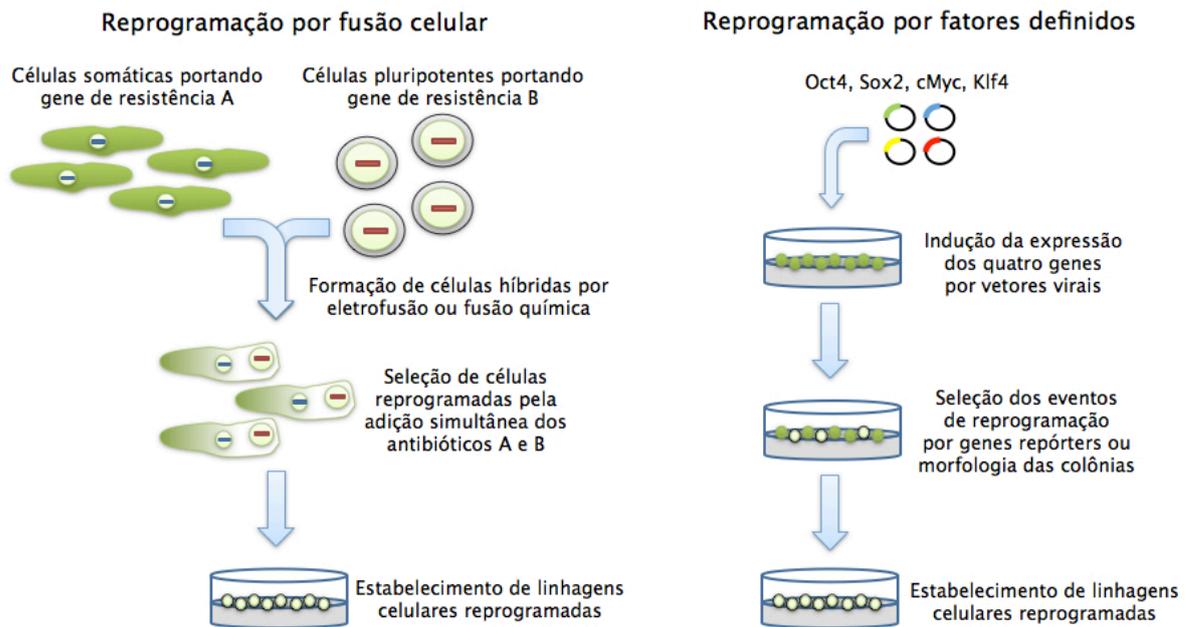


Figura 1.2 - Reprogramação de células somáticas para pluripotência. A fusão entre células somáticas e células-tronco embrionárias (CTE) seguida pela seleção dos híbridos por resistência a antibióticos resulta em células indiferenciadas poliplóides. Introdução de fatores de transcrição expressos em CTE em fibroblastos produz células pluripotentes, quando isoladas e propagadas permitem estabelecer linhagens iPS.

O avanço na elucidação do mecanismo de propagação de CTE permitiu identificar diversos fatores de transcrição como componentes importantes para manutenção da pluripotência (NICHOLS et al., 1998; CHAMBERS et al., 2003; MITSUI et al., 2003; CHAMBERS & SMITH, 2004). A demonstração do potencial de fatores de transcrição para conversão de fenótipos celulares, como por exemplo, a conversão de fibroblastos em células musculares pela expressão do produto do gene MyoD (Revisto por GRAF & ENVER, 2009), levou Takahashi & Yamanaka (2006) a propôr que os fatores que mantêm a pluripotência

poderiam ser capazes de reprogramar células somáticas (YAMANAKA, 2009). A demonstração de que quatro genes (*Oct4*, *Sox2*, *cMyc*, e *Klf4*) são suficientes para iniciar a reprogramação epigenética para pluripotência representou uma importante contribuição para o entendimento do processo (Figura 1.2). As células produzidas, denominadas *induced pluripotent stem* (iPS) apresentam a mesma capacidade de diferenciação das CTE (MAHERALI et al., 2007; OKITA et al., 2007; WERNIG et al., 2007).

As tecnologias de reprogramação têm sido extensivamente aplicadas nos âmbitos científico e comercial. A clonagem por TN tem permitido distinguir efeitos genéticos dos epigenéticos (EGGAN et al., 2004; HOCHEDLINGER et al., 2004; LI et al., 2004a), desenvolver novos modelos para pesquisa (KIRAK et al., 2010), conservar recursos genéticos (WELLS et al., 1998; WAKAYAMA et al., 2005), e replicar genomas de interesse econômico (WESTHUSIN et al., 2001). A produção de animais transgênicos tornou-se mais eficiente e conseqüentemente menos onerosa com o advento da TN com células somáticas (SCHNIEKE et al., 1997; EYESTONE, 1999; KUROIWA et al., 2009). A associação com outras tecnologias pode introduzir outras vantagens para produção de animais geneticamente modificados (Figura 1.3).

A demonstração de que CTE humanas também podem ser isoladas como descrito em diversas espécies animais, representa uma grande esperança para investigação do desenvolvimento inicial humano, estudos de toxicologia e, possivelmente, para terapia celular (THOMSON et al., 1998; SMITH, 2001). No entanto, as aplicações são limitadas pela incompatibilidade genética entre as CTE isoladas de embriões e os pacientes. A utilização de tecnologias de reprogramação epigenética representa uma forma de obtenção de CTE a partir do próprio paciente. Experimentos em animais demonstraram o isolamento de CTE a partir de embriões obtidos por TN com células somáticas, além de demonstrar o potencial terapêutico deste processo (LANZA et al., 2002, 2004; RIDEOUT et al., 2002; BARBERI et al., 2003). No entanto, o procedimento ainda não foi realizado em humanos provavelmente devido a questões técnicas e éticas (HOCHEDLINGER & JAENISCH, 2006). Com o advento das células iPS, linhagens celulares pluripotentes estão sendo estabelecidos a partir de pacientes com o intuito de desenvolver modelos *in vitro* que permitam investigar a etiologia de diversas patologias humanas (KISKINIS & EGGAN, 2010; SAHA & JAENISCH, 2009). Evidências em modelos animais sugerem que esta tecnologia também tem potencial terapêutico (HANNA et al., 2007; WERNIG et al., 2008a).

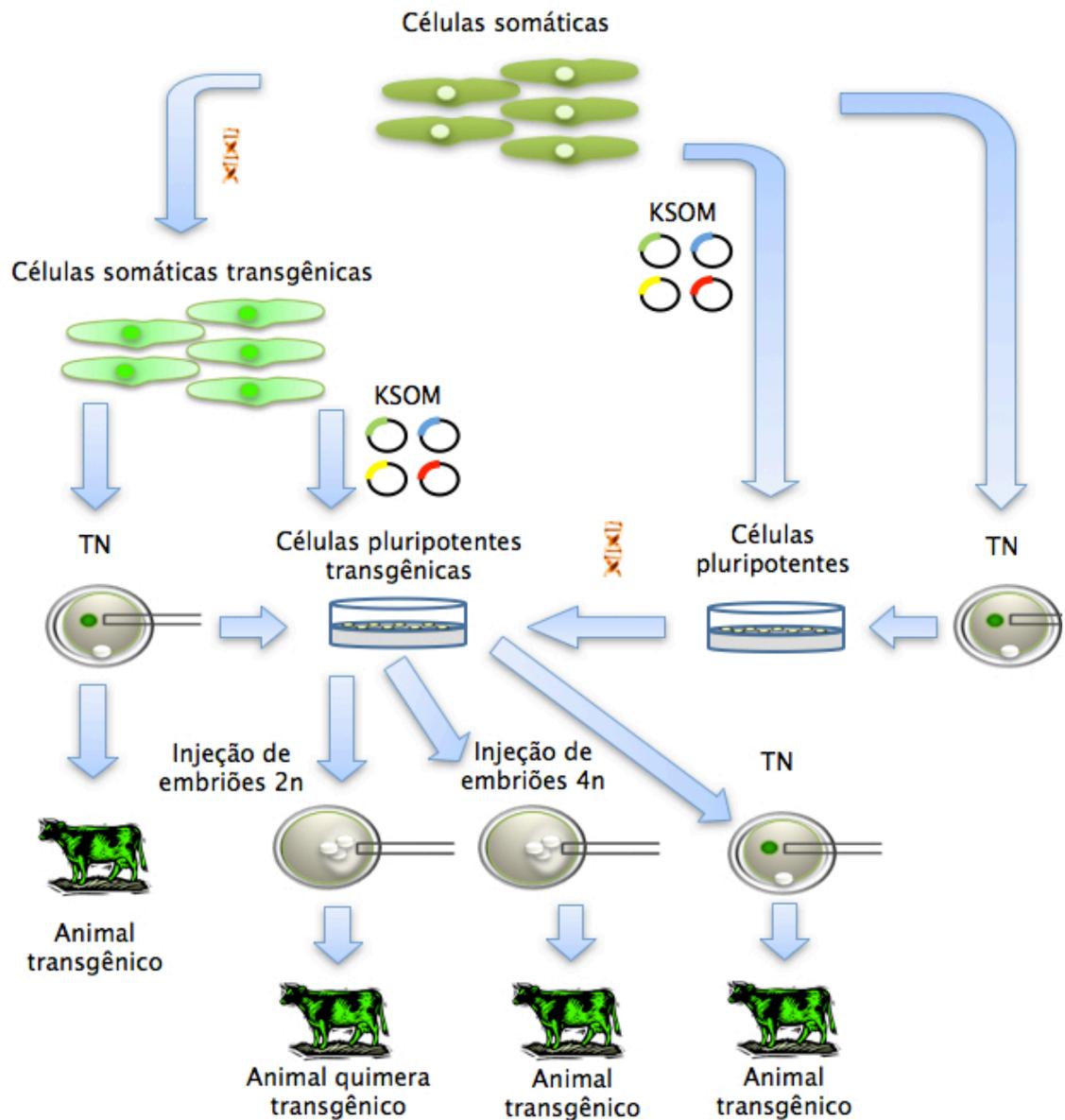


Figura 1.3 - Reprogramação epigenética para produção de animais transgênicos. Células somáticas podem ser transformadas e utilizadas diretamente para transferência nuclear (TN), pela injeção de embriões diplóides ou tetraplóides com células-tronco embrionárias (CTE) obtidas de embriões reconstruídos ou células iPS. Para realizar modificações mais complexas no genoma, as células somáticas são primeiro reprogramadas para obtenção de CTE (ou iPS). Após o isolamento das linhagens transgênicas, realiza-se a injeção de embriões (2n ou 4n), ou TN. KSOM: *Klf4*, *Sox2*, *Oct4*, e *cMyc*.

1.2. PROBLEMÁTICA E RELEVÂNCIA

A principal limitação das tecnologias de reprogramação epigenética é a baixa eficiência (Quadro 1.1), exemplificada pela exígua frequência de nascimentos na clonagem por TN e

limitada conversão de células somáticas em pluripotentes na reprogramação por fatores definidos e fusão (JAENISCH & YOUNG, 2008). Essa baixa eficiência se deve a incapacidade das metodologias de reprogramação de realizar, de forma eficiente e coordenada, o silenciamento dos genes expressos na célula somática e a ativação dos genes necessários para o restabelecimento da pluripotência ou totipotência, fato que representa o principal entrave biológico do processo (HOCHEDLINGER & JAENISCH, 2006).

Quadro1.1 - Comparação entre metodologias de reprogramação celular: capacidade de converter células somáticas em indiferenciadas.

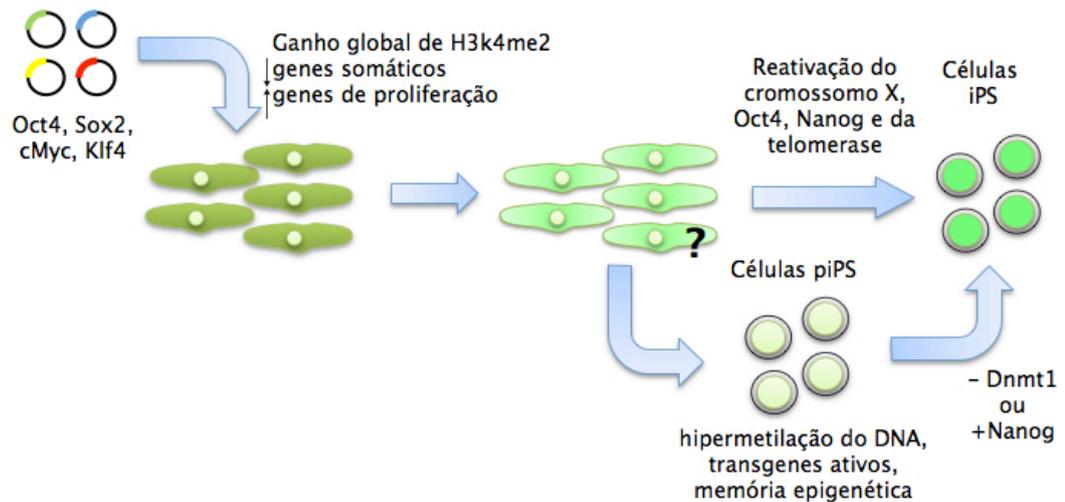
Técnica	Eficiência*	Cinética de Reprogramação*	Extensão da Reprogramação	Referências
TN	~50%# (~2%)^	2 dias	totipotência	1-2
Fusão	~5%	1 dia	pluripotência	3-4
iPS	0,1-1,0%	7-14 dias	pluripotência	5-6

TN: transferência nuclear. iPS: *induced pluripotent stem*. *Intervalo entre o início da reprogramação celular e obtenção de células indiferenciadas, determinado pela ativação do gene Oct4::GFP. # Produção de blastocistos GFP+. ^Nascimentos a partir de blastocistos transferidos. Ref.1: BOIANI et al., 2002; 2: YANG et al., 2007; 3: HAN et al., 2008; 4: BHUTANI et al., 2010; 5: MEISSNER et al., 2007; 6: JAENISCH & YOUNG, 2008. Dados em murinos.

Existem diversas evidências experimentais da incompleta reprogramação epigenética: manutenção do padrão epigenético da célula somática nos embriões (DEAN et al., 2001; SANTOS et al., 2003; NG & GURDON, 2008), erros espaço-temporais na expressão gênica (HUMPHERYS et al., 2001; NG & GURDON, 2005), e grande propensão de células iPS para se diferenciar no tipo celular que lhe deu origem (KIM et al., 2010; POLO et al., 2010). Assim, o melhor entendimento do mecanismo da reprogramação epigenética pode resultar em incrementos na eficiência de reprogramação (Figura 1.4).

A melhor compreensão do restabelecimento do estado indiferenciado poderá direcionar os futuros esforços para aumentar a eficiência das tecnologias de reprogramação (Figura 1.5). No entanto, dificuldades de ordem técnica limitam o progresso na investigação do mecanismo.

Reprogramação por fatores definidos



Reprogramação por Transferência Nuclear

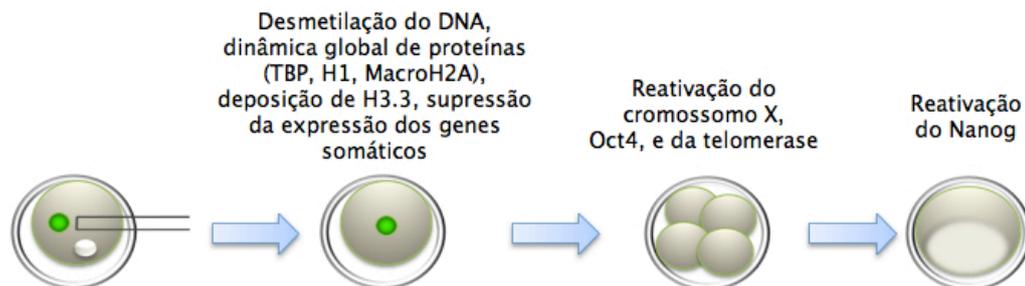


Figura 1.4 - Principais eventos conhecidos durante a reprogramação epigenética em mamíferos. iPS: *induced pluripotent stem*. piPS: células parcialmente reprogramadas, identificadas pela formação de colônias e ausência de reativação do gene repórter *Oct4::GFP*. Ainda não se sabe se o estágio piPS é uma etapa necessária durante a reprogramação ou um evento estocástico.

A metodologia atual da clonagem por TN apresenta uma capacidade reduzida de gerar material biológico para análises em nível molecular, principalmente para os eventos iniciais do remodelamento do genoma. Por isso, diversos relatos usaram metodologias com baixa resolução (DEAN et al., 2001; SANTOS et al., 2003). Análises por imunofluorescência em zigotos de coelho sugeriam não haver demetilação ativa do DNA no pró-núcleo masculino da espécie (CHEN et al., 2004; SHI et al., 2004), embora o resultado tenha sido questionado pela avaliação detalhada em alguns *loci* (ZHANG et al., 2005). Este fato confirma a necessidade de utilizar ferramentas com maior resolução como, por exemplo, *Chip-chip* ou *Chip-seq* (imuniprecipitação da proteína de interesse e DNA associado seguido pela hibridação com “*tilling arrays*” ou sequenciamento do DNA) respectivamente, que são mais precisas e

informativas, como observado na reprogramação por fatores definidos (MIKKELSEN et al., 2008; KOICHE et al., 2011).

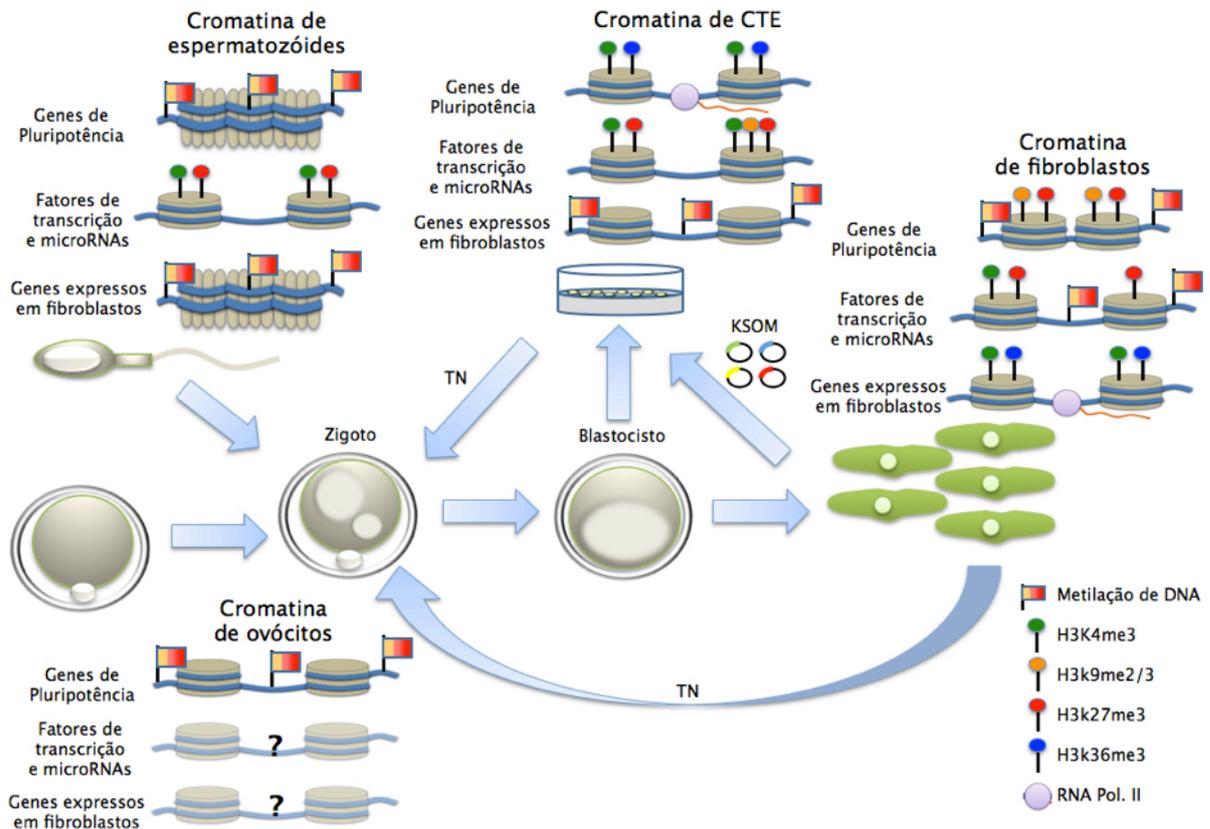


Figura 1.5 - Dinâmica da cromatina durante o desenvolvimento e reprogramação epigenética.

O genoma do espermatozóide é compactado por protaminas e metilação do DNA. Alguns *loci* apresentam nucleossomos com domínios bivalentes (H3K4me3 e H3K27me3). No ovócito, os genes de pluripotência estão metilados no DNA. Em células-tronco embrionárias (CTE), os genes de pluripotência estão ativos (H3K4me3, H3K36me3 e RNA Pol II). O número de genes bivalentes aumenta em relação ao espermatozóide, e parte adquire H3K9me2/3. Os genes tecido-específicos são apenas metilados no DNA. Em fibroblastos, os genes de pluripotência estão silenciados por metilação de DNA, H3K9me2/3 e H3K27me3. Apesar de vários domínios bivalentes terem sido resolvidos (genes ativos com H3K4me3, H3K36me3 ou silenciados com H3K27me3 e metilação de DNA), muitos domínios permanecem devido a capacidade de diferenciação dos fibroblastos em condrócitos, adipócitos, por exemplo. Os genes específicos de fibroblasto estão ativos. Os dados foram baseados preferencialmente em análises em nível genômico. Os fatores de transcrição e MicroRNA representados são em processos como diferenciação celular, gastrulação, e organogênese. A determinação do estado da cromatina em ovócitos, zigotos e blastocistos permanece pouco explorada. TN: transferência nuclear. KSOM: *Klf4*, *Sox2*, *Oct4*, e *cMyc*.

O grande entrave de técnicas em escala genômica é a necessidade de grandes quantidades de material experimental (>1.000.000 células). Protocolos mais recentes de *Chip-PCR*, *Chip-seq* e *reduced representation bisulfite sequencing* (RRBS) reduziram drasticamente a quantidade de material biológico requerido para 1.000-10.000 células (DAHL et al., 2009; ADLI et al., 2010; GU et al., 2010). Apesar dos avanços, estas quantidades são muito superiores ao produzido por TN atualmente (~50-100 zigotos por manipulação). O desenvolvimento de um protocolo automatizado de TN, ao utilizar, por exemplo, uma metodologia química de enucleação de ovócitos (MOURA et al., 2008) associada a uma estratégia de fusão celular em larga escala (SKELLEY et al., 2009) permitiria um aumento significativo na escala de produção de embriões por TN.

A introdução dos fatores de transcrição para indução da pluripotência em células somáticas resulta na integração de um número variável de cópias de cada vetor (WERNIG et al., 2007; AOI et al., 2008). A natureza aleatória do processo de integração no genoma permite que os transgenes sejam introduzidos em sequências codantes ou regulatórias (HACEIN-BEY-ABINA et al., 2003). Este fato pode causar a transformação oncogênica das células, ativar a morte celular programada por apoptose, ou interferir na atividade dos transgenes (HACEIN-BEY-ABINA et al., 2003; OKITA et al., 2007). Além disso, a integração aleatória estabelece em cada célula somática um padrão estequiométrico diferente entre os fatores de transcrição, introduzindo um grande componente de variabilidade no processo, dificultando as análises do mecanismo de reprogramação. A utilização do sistema secundário (células reprogramadas com vetores lentivirais induzíveis permite diferenciá-las e reprogramá-las novamente sem uma nova transdução) limita a variabilidade aos clones que produziram células iPS, selecionando padrões estequiométricos compatíveis com a reprogramação epigenética (MAHERALI et al., 2008; MIKKELSEN et al., 2008; WERNIG et al., 2008b). Estratégias que evitem essas limitações e apresentem um efeito mais homogêneo na população de células somáticas são desejáveis.

O uso de moléculas tem sido investigado para gerar células iPS sem o recurso de ácidos nucléicos (FENG et al., 2009). No entanto, ainda não são conhecidas moléculas que substituam o Oct4 exógeno durante a reprogramação por fatores definidos. Devido a sua atividade restrita a células totipotentes ou pluripotentes, um mecanismo indireto para a reativação do gene Oct4 durante a reprogramação talvez seja mais promissor que a investigação de métodos diretos de indução da sequência endógena do Oct4.

1.3. OBJETIVO GERAL

Desenvolver e caracterizar alternativas para limitações de diferentes tecnologias de reprogramação epigenética para facilitar a investigação desse processo.

1.3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Avaliar a influência das células do *cumulus* na toxidez do tratamento com actinomicina D na maturação de ovócitos bovinos;
2. Desenvolver uma abordagem da enucleação pela actinomicina D mais eficiente que impeça a formação de blastocistos após a ativação partenogenética;
3. Avaliar o efeito da enucleação de ovócitos bovinos pela actinomicina D no desenvolvimento embrionário *in vitro* após a transferência nuclear.
4. Analisar o efeito da enucleação pela actinomicina D na qualidade dos embriões produzidos por transferência nuclear *in vitro* e *in vivo*;
5. Investigar a generalidade dos efeitos da actinomicina D em ovócitos pela análise da mitomicina C como alternativa para a enucleação química de ovócitos bovinos;
6. Testar a capacidade do fator de transcrição Nr5a2 de substituir Oct4 na indução da pluripotência por fatores definidos em camundongos.

1.4. REVISÃO DE LITERATURA

1.4.1. Enucleação de ovócitos

1.4.1.1. Histórico da enucleação de ovócitos

A primeira tentativa de remover o núcleo de uma célula foi realizada por Marshall Barber, que havia desenvolvido um conjunto de equipamentos que permitiram manipular uma única bactéria (revisto por KORZH & STRAHLE, 2002). Sua metodologia foi aperfeiçoada até a utilização para a primeira série de transferências de núcleos (BRIGGS & KING, 1952). Neste experimento, por meio de uma micropipeta, parte do citoplasma do gameta era removido e o núcleo de uma blástula introduzido. Não havia uma forma de confirmar o sucesso do procedimento, por isso, esta abordagem é denominada de enucleação mecânica cega (LI et al., 2004b).

Durante as décadas seguintes houve uma expansão do número de grupos de investigação na área, trabalhando basicamente com anfíbios (BRIGGS & KING, 1952; GURDON et al., 1958). Espécies como o *Xenopus laevis* apresentam vantagens consideráveis que os tornaram modelos preferenciais de experimentos de embriologia da época. Características como grande resistência dos gametas e embriões a insultos físicos e químicos, obtenção de grande número de gametas por fêmea, embriões de tamanho considerável e desenvolvimento extra-corpóreo foram decisivas para sua popularização (revisto por GURDON & HOPWOOD, 2000). Esses esforços demonstraram que anfíbios podem ser clonados por TN com células somáticas (GURDON et al., 1958; GURDON, 2006)

Uma questão que permanecia era se haveria a possibilidade de clonar mamíferos por TN. Por isso de forma pioneira, Derek Bromhall realizou o primeiro experimento de TN em coelhos (BROMHALL, 1975). Não foi tentado enuclear os ovócitos possivelmente devido à alta taxa de degeneração das estruturas após a intervenção (MODLISNKI, 1975). No entanto, Bromhall apresenta evidências de que produziu estruturas diplóides, o que sugere uma enucleação acidental, estocástica ou até mesmo a incapacidade da célula doadora de

contribuir para a formação do embrião. Por isso, os resultados obtidos não foram muito conclusivos, embora o avanço do ponto de vista técnico, utilizando equipamentos mais compatíveis com o tamanho dos gametas da espécie tenha sido importante (BROMHALL, 1975).

Pouco tempo depois, Jacek Modlinski relatou o desenvolvimento de embriões reconstruídos em camundongos. A enucleação não foi realizada e, por isso, todos os embriões obtidos por TN eram tetraplóides (MODLINSKI, 1978). Posteriormente, Modlinski utilizou células doadoras com cromossomos com morfologia peculiar para demonstrar a contribuição do núcleo introduzido na formação do embrião (MODLINSKI, 1981).

Ao contrário de peixes e anfíbios, os mamíferos não toleram grandes alterações do cariótipo das células (EAKIN & BEHRINGER, 2003). Portanto, a enucleação do gameta é fundamental para avaliar a capacidade do embrião reconstruído de recapitular o desenvolvimento *in vivo* a termo (SOLTER, 2000; EAKIN & BEHRINGER, 2003).

Hoppe & Illmensee (1977) utilizaram a citocalasina B para bloquear o ciclo celular de zigotos que tiveram um pró-núcleo removido e conseqüentemente, produzir embriões diplóides androgenéticos e ginogenéticos. Curiosamente, os autores observaram que o tratamento teve o efeito inesperado de aumentar a sobrevivência dos embriões após a manipulação. Este fato foi logo confirmado por outro autor (MODLINSKI, 1980). A partir deste momento a TN em mamíferos recebeu nova atenção e fomentou a busca de formas mais eficientes para remover os cromossomos dos ovócitos e zigotos.

Ao incorporar a citocalasina B ao protocolo de TN e introduzir o núcleo doador no gameta enucleado pela fusão celular mediada por vírus Sendai inativado, Solter e McGrath desenvolveram um protocolo de TN em mamíferos considerado robusto e replicável (MCGRATH & SOLTER, 1983, 1984; SOLTER, 2000). Em experimentos com ovinos, Steen Willadsen utilizou ovócitos em MII além da eletrofusão como método de reconstrução e assim corrigiu as limitações do método anterior (WILLADSEN, 1986).

É importante ressaltar que durante este período ainda não havia um método eficiente de ativação partenogenética, devido a este fato, os zigotos eram utilizados quase que exclusivamente para preparação de citoplasmas receptores na TN (MODLINSKI, 1978, 1981; ILLMENSEE & HOPE, 1981). O primeiro relatado de nascimento de murinos clonados utilizou zigotos enucleados reconstruídos com células do botão embrionário (ILLMENSEE & HOPE, 1981). No entanto, este relato é foco de controvérsia até os dias atuais, pois os dados

nunca foram repetidos (WAKAYAMA et al., 2000; EGLI et al., 2007). A explicação mais plausível seria que a enucleação de zigotos (e ovócitos em intérfase) remove proteínas nucleares relacionadas à reprogramação nuclear (EGLI et al., 2008). Como a membrana nuclear envolve os cromossomos e proteínas nucleares no período de intérfase, todo este material é removido pela micropipeta durante a enucleação. A maior eficiência ao usar ovócitos em metáfase II (MII) e a necessidade de sincronizar zigotos em metáfase para obtenção de animais clonados corrobora esta hipótese (WILLADSEN, 1986; EGLI et al., 2007). Por isso, a questão limitante da TN na época se devia mais provavelmente a incorreta sincronia do ciclo celular entre o gameta e a células doadora do que devido a danos causados pela enucleação.

Uma particularidade dos ovócitos de algumas espécies é a opacidade do citoplasma. Em contraste com espécies como o camundongo, a visualização da placa metafásica e a consequente confirmação da enucleação torna-se impossível. Investigando neste sentido, Smith & Wilmut (1989) demonstraram que ao expor o ovócito opaco de bovinos a um corante DNA específico na presença da ultravioleta (UV) seria possível confirmar a retirada do DNA do gameta.

Estes avanços metodológicos repercutiram na expansão considerável da clonagem por TN que culminou no relato da clonagem de diversas espécies a partir de células embrionárias (STICE & ROBL, 1988; PRATHER et al., 1987, 1989) e posteriormente, somáticas (WILMUT et al., 2002; MEISSNER & JAENISCH, 2006).

O único relato de nascimento de um animal primata fruto de TN a partir de células embrionárias fomentou a busca por relatos utilizando células somáticas como doadoras de núcleo (MENG et al., 1997). Apesar do intenso esforço, a clonagem de primatas a partir de células diferenciadas ainda não foi relatada. Em contrapartida, foi possível obter linhagens de células-tronco embrionárias a partir de embriões de TN com células de um macaco *Rhesus* adulto (BYRNE et al., 2007). Um fato de destaque do relato foi a baixa eficiência. Centenas de gametas foram utilizados para obtenção de apenas uma linhagem celular diplóide. Uma possibilidade proposta foi que a atual forma de remoção dos cromossomos carrega proteínas que são fundamentais para a formação do fuso do embrião reconstruído, inviabilizando o desenvolvimento posterior (SIMERLY et al., 2003). Esta hipótese tem sido contestada e posteriormente foi demonstrado que há formação de embriões euplóides com a metodologia tradicional (NG et al., 2004). No entanto, a avaliação mais coerente seria que, apesar de não

evitar a formação de embriões com cariótipo normal, a atual metodologia reduz drasticamente o percentual de estruturas viáveis. Por isso, conclui-se que a remoção dos cromossomos de ovócitos primatas pode representar um novo paradigma no desenvolvimento de estratégias alternativas de enucleação.

1.4.1.2. Metodologias alternativas de enucleação

A primeira metodologia de enucleação de ovócitos alternativa à mecânica foi desenvolvida em 1960 (CHAN & GURDON, 1996; GURDON, 2006). A aplicação da UV nos gametas reduziu significativamente a capacidade de desenvolvimento dos mesmos (GURDON, 1960). Também foi observado que a UV dissolvia uma camada gelatinosa que recobre os ovócitos, fato que facilitou o procedimento de TN (GURDON, 2006). Esta estratégia também pode ser usada em peixes (GASARYAN et al., 1979). No entanto, as tentativas em mamíferos foram frustradas. A radiação se mostrou altamente tóxica aos gametas (SMITH, 1993; BRADSHAW et al., 1995; WAGONER et al., 1996; BORDIGNON & SMITH, 1999). Esta discrepância pode ser devida a uma possível maior tolerância dos gametas aos danos da UV em anfíbios e peixes. Curiosamente, embriões de TN poliplóides de destes organismos atingem a fase adulta e em anfíbios a triploidia foi associada a maior viabilidade dos clones fruto de células somáticas (DIBERARDINO et al., 1986; NIWA et al., 2000a).

O uso da radiação X também foi avaliado como forma de eliminar a capacidade de desenvolvimento partenogenético de ovócitos. O primeiro relato foi em peixes, onde os animais clonados adultos eram diplóides e não expressavam uma isoenzima presente apenas no gameta (WAKAMATSU et al., 2001). No entanto, poucos indivíduos foram analisados e por isso é difícil estimar com segurança a eficiência do procedimento. Mais recentemente foi publicado um relato em bovinos utilizando a radiação X nos gametas (KIM et al., 2004). Foi descrito que o tratamento não reduziu o desenvolvimento embrionário após a TN. Porém, a metodologia não permitiu enuclear todos os gametas e não há descrição sobre a capacidade de desenvolvimento *in vivo* destes embriões (KIM et al., 2004).

Devido à baixa caracterização da metodologia nestes relatos, os dados devem ser analisados com cuidado. A investigação de métodos alternativos de enucleação é baseada em algumas estratégias principais (Figura 1.6).

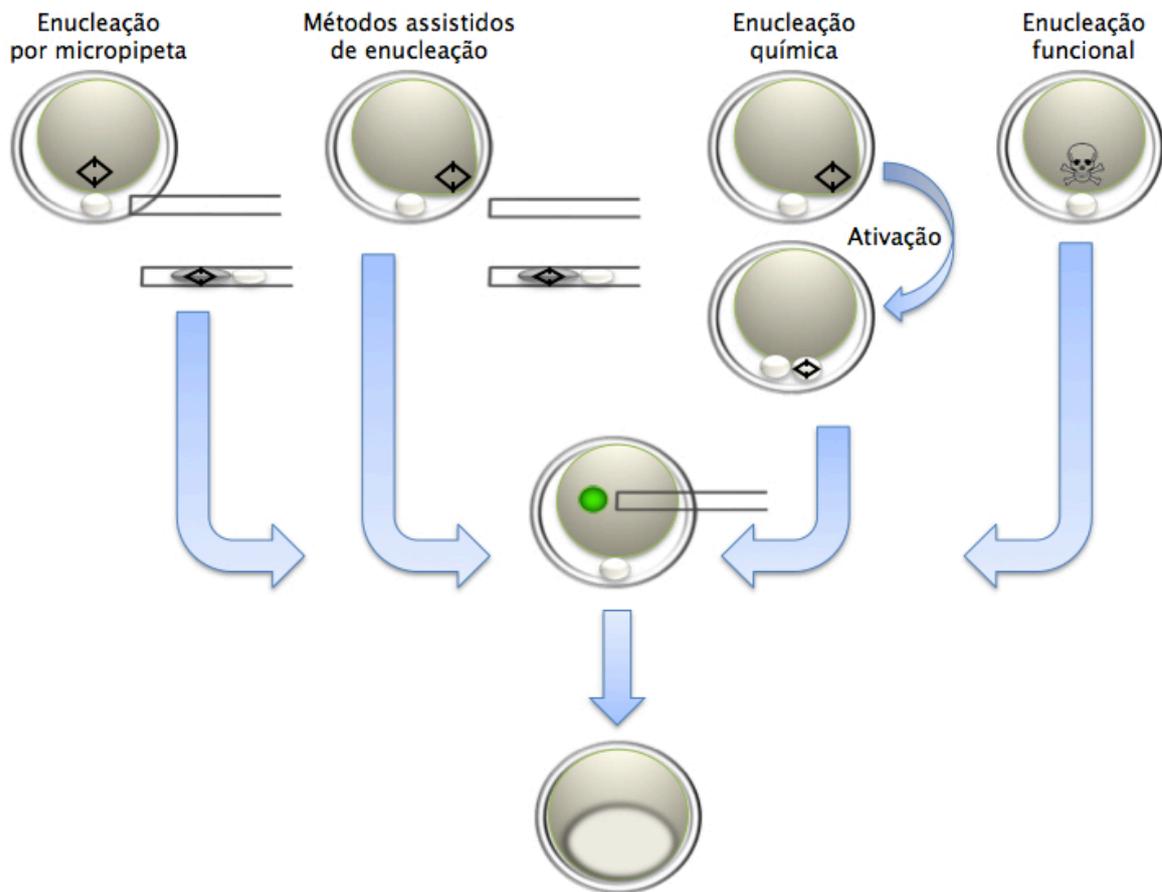


Figura 1.6 - Alternativas para a enucleação de ovócitos de mamíferos: enucleação por micropipeta e confirmação pela exposição da biópsia a ultravioleta, enucleação por micropipeta guiada por protusões formadas por compostos químicos, enucleação química que direciona todos os cromossomos do gameta para o corpúsculo polar, e enucleação química funcional através da inativação dos cromossomos do ovócito.

A primeira metodologia de enucleação química de ovócitos em mamíferos foi desenvolvida pela associação do inibidor de topoisomerases etoposídeo e a ciclohexamida (FULKA & MOOR, 1993). Neste procedimento, todos os cromossomos são direcionados para o primeiro corpúsculo polar (CP). Apesar da alta eficiência em ovócitos murinos em metáfase I (MI), o mesmo não foi observado em gametas em MII de camundongos e bovinos (FULKA & MOOR, 1993; SAVARD et al., 2004). Além disso, existe a possibilidade da reversão do processo pela fusão espontânea do CP com o citoplasma enucleado (ELSHEIKH et al., 1997). O nascimento de um animal a partir deste tipo de enucleação garante a viabilidade de pelo menos, parte dos gametas tratados (GASPARRINI et al., 2003).

A ultracentrifugação de ovócitos sem zona pelúcida causa a fragmentação do gameta. Ao expor os fragmentos do gameta à UV é possível recuperar porções de citoplasma sem cromossomos (TATHAM et al., 1995). Devido à redução drástica do volume do gameta não foi observada a formação de blastocisto após a TN. Além disso, a remoção da zona pelúcida é uma etapa necessária no processo e requer o cultivo individual das estruturas para evitar que os embriões agregem (VAJTA et al., 2001).

A exposição de ovócitos ao inibidor de microtúbulos demecolcina mostrou-se capaz de enuclear ovócitos, onde os cromossomos são direcionados ao segundo CP após a ativação partenogenética (BAGUISI & OVERSTRÖM, 2000). Apesar do nascimento de murinos oriundos de embriões reconstruídos a partir da metodologia, a eficiência permanece baixa e apresenta grande variabilidade entre linhagens de camundongos (IBAÑEZ et al., 2003; SAVARD et al., 2004; SARAIVA et al., 2009).

Uma característica comum às abordagens alternativas de enucleação é a tentativa de evitar o uso da UV e seus malefícios (SMITH, 1993; DOMINKO et al., 2000). Por exemplo, Dominko e colaboradores testaram diferentes fluorocromos como uma alternativa. A rodamina foi identificada como uma molécula que destaca os cromossomos no citoplasma, mas o fato de não ser capaz de traspasar a membrana do ovócito reduziu drasticamente seu apelo (DOMINKO et al., 2000).

Bordignon & Smith (1998) perceberam que a enucleação dos ovócitos pré-ativados em telófase II (TII) reduzia o volume removido do ovócito. No âmbito da TN com células embrionárias como doadoras, a ativação partenogenética dos ovócitos é desejável pela redução do fator promotor da metáfase (MPF) que se apresenta em altos níveis nos gametas em MII. Apesar de ser benéfico com células doadoras somáticas (tipicamente em G0/G1), o MPF é prejudicial para blastômeros (preferencialmente na fase “S” da intérfase) porque causa a destruição dos cromossomos introduzidos (COLLAS et al., 1992). Curiosamente, a enucleação em TII permitiu o desenvolvimento a termo após a TN com células somáticas (BORDIGNON et al., 2003).

Diferentes sistemas de microscopia permitem observar a placa metafásica de ovócitos sem a necessidade de corantes (LIU et al., 2000; BYRNE et al., 2007). Apesar do seu alto custo (FULKA et al., 2004), o sistema oosightTM tem sido usado na TN de ovócitos de primatas (BYRNE et al., 2007; LI et al., 2009a). Apesar dos resultados recentes sugerirem ser

vantajoso usar o sistema oosight™, não existe evidência experimental com uma comparação direta entre os métodos.

1.4.1.3 Métodos de enucleação assistida de ovócitos

Devido a baixa eficiência dos métodos alternativos de enucleação, as abordagens tem sido adaptadas para aumentar a precisão da enucleação por micropipeta. Estas metodologias são denominadas de métodos assistidos de enucleação.

A ativação partenogenética prematura dos ovócitos de ratos foi um fator determinante a ser vencido no processo de TN para obter nascimentos (ZHOU et al., 2003). Com o intuito de tentar impedir este fenômeno, Hayes et al., (2001) utilizaram o inibidor de microtúbulos nocodazole, que apresentam a capacidade de formar uma protusão contendo os cromossomos na periferia de gametas da espécie. No entanto, não foram relatados detalhes sobre este tipo de formação, mas apenas que o tratamento reduziu moderadamente a sobrevivência dos embriões após a manipulação (HAYES et al., 2001).

A possibilidade de aplicar reagentes para formar tais protuberâncias em ovócitos em MII repercutiu na decisão de diversos grupos de revisitar as técnicas descritas acima. O uso da demicolcina produziu estas formações e não afetou o desenvolvimento embrionário e resultou no nascimento de um bezerro fruto da TN com células somáticas (YIN et al., 2002; TANI et al., 2006; SARAIVA et al., 2009).

A sacarose, quando em solução hipertônica, causa um efeito semelhante nos ovócitos (WANG et al., 2001; ZHANG et al., 2008). Mais importante, o tratamento não afeta o desenvolvimento dos embriões após a ativação partenogenética ou TN (WANG et al., 2001; LIU et al., 2002; KAWAKAMI et al., 2003).

A centrifugação foi novamente investigada, mas com o objetivo de aumentar a proximidade entre a placa metafásica e o CP para a enucleação mecânica (HUA et al., 2007). Foi determinado que a intervenção melhora os índices de enucleação e não interferiu na viabilidade de ovócitos e embriões.

Os métodos assistidos de enucleação atuais não substituem a enucleação mecânica e apresentam pouca vantagem sobre a metodologia convencional. Outro fato agravante é a variação de respostas entre espécies e variabilidade entre laboratórios aos métodos assistidos (LI et al., 2004b; COSTA-BORGES et al., 2009). Com o objetivo de buscar uma nova

alternativa, foi testada a actinomicina D como método de enucleação de ovócitos (MOURA et al., 2008).

A actinomicina D é um antibiótico que intercala a molécula de DNA interferindo no metabolismo de ácidos nucléicos de forma irreversível (GOLDBERG et al., 1962; COOPER & BRAVERMAN, 1977; SOBELL, 1985; TRASK & MULLER, 1988; MOURA et al., 2007a,b). A molécula intercala pontes de hidrogênio, apresenta alta afinidade por resíduos de guanina e impede a interação das RNA e DNA polimerases com o DNA. Neste caso, a enucleação não seria através da remoção física dos cromossomos, mas pela inativação definitiva dos mesmos. Pode-se assim considerar a metodologia com actinomicina D como uma forma de enucleação funcional de ovócitos.

Estas propriedades farmacológicas da actinomicina D têm sido extensamente utilizadas na investigação de diversas características do desenvolvimento embrionário. Baseando-se nestes e outros resultados (HIKAWA & TAKENAKA, 1996, 1997; BAYONA-BAFALUY et al., 2003, 2005), foi iniciada a investigação com diferentes tratamentos de actinomicina D para enucleação de ovócitos bovinos. A estratégia inicial foi fundamentada na hipótese de que o antibiótico bloqueia os cromossomos inviabilizando o desenvolvimento partenogênético, fato que demonstraria a enucleação funcional dos ovócitos (MOURA et al., 2007a, 2008).

Por este modelo identificou-se a concentração de $1\mu\text{g mL}^{-1}$ por 14h como condição para análises seguintes com TN (MOURA et al., 2007a, 2008). Apesar do efeito tóxico do tratamento na maturação *in vitro* (MIV) observado pela redução na taxa de extrusão do primeiro CP, os ovócitos bloqueados foram capazes de formar blastocistos após a introdução de um núcleo de célula somática. Mais importante foi o fato de que estes embriões reconstruídos apresentaram índices de apoptose semelhantes aos controles (MOURA et al., 2007a, 2008). Estes resultados motivaram novas avaliações e a busca de alternativas para aperfeiçoar a metodologia, com o intuito de tornar a actinomicina D o método de escolha para enucleação de ovócitos para TN.

1.4.2. Reprogramação celular por fatores definidos

1.4.2.1. Células-tronco embrionárias

As células-tronco embrionárias (CTE) são linhagens celulares pluripotentes obtidas a partir de embriões e que possuem a capacidade de proliferar indefinidamente (EVANS & KAUFMAN, 1981; MARTIN, 1981; THOMSON et al., 1995, 1998; SOLTER, 2006). As CTE de murinos apresentam crescimento sob a forma de colônias características (Figura 1.7). Além disso, as células quando introduzidas em blastocistos contribuem extensivamente para o desenvolvimento fetal de camundongos (BRADLEY et al., 1984; SMITH, 2001). Estes animais, denominados de quimeras (compostos por células de duas origens), quando acasalados podem transmitir alelos provenientes das CTE a progênie, demonstrando a colonização das gônadas e formação de gametas viáveis pelas CTE (BRADLEY et al., 1984). Por isso, o teste tornou-se uma avaliação fundamental das CTE para confirmar sua pluripotência *in vivo* (SMITH, 2001).

Devido a sua origem a partir do botão embrionário, foi observado que as CTE não contribuem para formação da placenta e anexos placentários quando agregadas a embriões (SMITH, 2001). Quando introduzidas em embriões tetraplóides (que não desenvolvem a termo), as CTE são capazes de formar todo o feto enquanto a placenta é composta apenas por células $4n$ (NAGY et al., 1993; SMITH, 2001; EAKIN & BEHRINGER, 2003; EGGAN et al., 2004; STADTFELD et al., 2010). Estas características das CTE demonstraram que esta tecnologia poderia ser utilizada para a produção de animais transgênicos (CAPECCHI, 1989, 2005; ADAMS & VAN DER WEYDEN, 2008).

A produção de animais transgênicos era inicialmente realizada pela técnica de injeção pró-nuclear (BRINSTER et al., 1981; PALMITER et al., 1982; HAMMER et al., 1985). Nesta técnica o DNA de interesse é introduzido por micropipeta no pró-núcleo masculino de zigotos, e o transgene integra o genoma de forma aleatória. A eficiência de transformação é baixa, o número de cópias integradas e seus níveis de expressão bastante variáveis, além da possibilidade de quimerismo quanto a presença do transgene (EYESTONE, 1999; BALDASSARRE et al., 2003).

Devido a capacidade ilimitada de proliferação *in vitro*, as CTE podem ser transformadas, selecionadas e usadas para caracterização da quantidade, atividade e

localização dos transgenes no genoma. Uma importante vantagem desta abordagem é permitir selecionar eventos muito raros como a recombinação homóloga (CAPECCHI, 1989, 2005). Por isso, a abordagem possibilita realizar modificações mais complexas no genoma, como a remoção ou substituição de sequências (*Knockout* ou *Knockin*, respectivamente). Esses fatos representaram uma nova ferramenta para a investigação da função gênica em mamíferos (CAPECCHI, 1989, 2005; ADAMS & VAN DER WEYDEN, 2008; TONG et al., 2010). Nas espécies em que ainda não foi possível isolar CTE, as modificações mais complexas no genoma são realizadas em células somáticas e posteriormente usadas para clonagem por TN (MCCREATH et al., 2000; LAI et al., 2002; RITCH et al., 2007; KUROIWA et al., 2009). Devido a capacidade limitada de proliferação das células somáticas (susceptibilidade a senescência), em alguns casos torna-se necessário “rejuvenescer” as linhagens geneticamente modificadas para realizar novas alterações no genoma (KUROIWA et al., 2009). Esta limitação estende o tempo necessário para obtenção do animal transgênico, aumentando seu custo de produção.

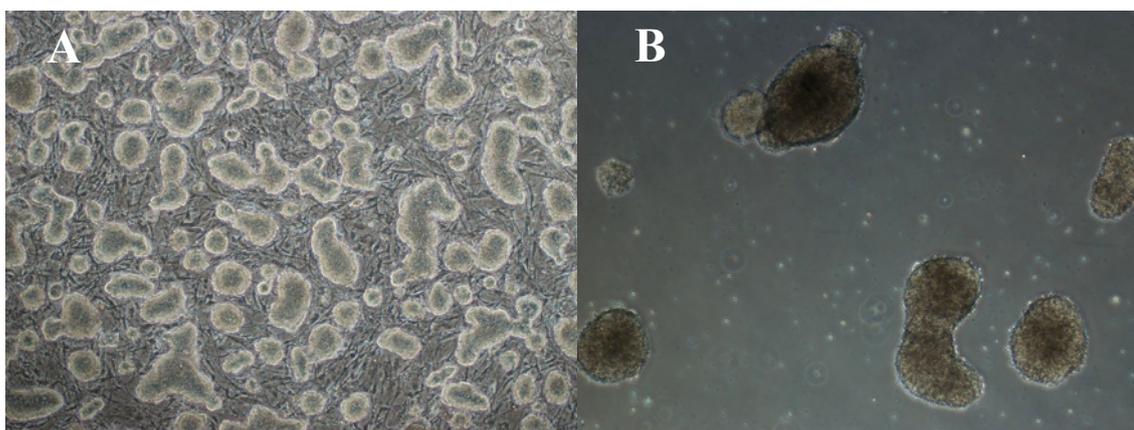


Figura 1.7 - Células-tronco embrionárias (CTE) de camundongos: apresentam morfologia característica e proliferam formando colônias em forma de cúpula (a). Quando estimuladas a diferenciar espontaneamente *in vitro*, as CTE formam estruturas tridimensionais chamadas de “*embryoid bodies*”, que apresentam os tipos celulares presentes no embrião no estágio peri-implantacional (b).

As condições inicialmente utilizadas para o isolamento de CTE foram semelhantes entre as diversas espécies, onde o cultivo do botão embrionário era feito sobre fibroblastos fetais de camundongo em meio contendo soro fetal bovino (SFB) (EVANS & KAUFMAN, 1981; MARTIN, 1981; THOMSON et al., 1995, 1998). No entanto, este formato apresentava limitações como a baixa proliferação das células indiferenciadas, alto percentual de

diferenciação espontânea e baixa sobrevivência de cultivos clonais. A descoberta de que o *leukaemia inhibitory factor* (LIF) era um componente central da manutenção da pluripotência *in vitro* de células de camundongos foi fundamental para contornar essas limitações na espécie (SMITH et al., 1988; WILLIAMS et al., 1988). O efeito do LIF é mediado pela ativação da via de sinalização *Janus kinase (JAK)/ signal transducer and activation of transcription 3* (STAT3) (NIWA et al., 1998; ENRST et al., 1999; RAZ et al., 1999; STUHLMANN-LAEISZ et al., 2006). Esta via induz a expressão de genes que inibem a diferenciação celular e estimulam a proliferação (BURDON et al., 2002). Outro mecanismo atrelado a via JAK/STAT e mediado pelo LIF é a estimulação da via de transdução *extracelular signal-regulated kinases* (ERK), que faz parte da via *mitogen activated protein kinase kinase* (MAPK). No entanto, a via ERK induz a diferenciação de CTE em células neurais, e o bloqueio do processo aumenta a proliferação das células indiferenciadas (BURDON et al., 1999, 2002; KUNATH et al., 2007).

Uma descoberta fundamental para melhor entender a origem das CTE foi a demonstração que o LIF, sob determinadas condições de cultivo *in vitro*, não é necessário para propagação de CTE de murinos (YING et al., 2008). A supressão das vias MEK/ERK e *glycogen synthase kinase 3* (GSK3) é suficiente para estabelecer e manter CTE sem o emprego do LIF (condição com 2 inibidores ou 2i). Estes resultados demonstram que o estabelecimento de linhagens celulares indiferenciadas não é dependente do ganho de uma característica devido as condições *in vitro*, mas devido a capacidade intrínseca das CTE de proliferar num estado indiferenciado na ausência de estímulos para diferenciação (YING et al., 2008; NICHOLS et al., 2009). Este modelo mostrou-se correto também para ratos, pois essas condições permitiram isolar CTE na espécie (LI et al., 2008; BUEHR *et al.*, 2008). A descoberta possibilitou que ratos *Knockout* para o gene *p53* tenham sido obtidos recentemente (TONG et al., 2010). Porém, ainda permanece desconhecido se as CTE humanas respondem ao cultivo 2i.

O primeiro relato de isolamento de CTE em humanos sugeriu que o LIF não tinha efeito na proliferação das células indiferenciadas da espécie (THOMSON et al., 1998). Apesar da via JAK/STAT3 ser funcional e estimulada pelo LIF, este mecanismo não apresenta qualquer efeito fenotípico em células humanas pluriotentes (DAHÉRON et al., 2004; HUMPHREY et al., 2004; SUMI et al., 2004). A descoberta de que o *basic fibroblast growth factor* (bFGF) através da via de sinalização MEK/ERK (AMIT et al., 2000; XU et al., 2005) e a activina A/

nodal, componentes da via TGF- β (BEATTIE et al., 2005; JAMES et al., 2005) mediam a proliferação de CTE humanas, levantou a hipótese de que existem diversos níveis ou tipos de pluripotência (NICHOLS & SMITH, 2009).

Uma possibilidade seria que enquanto as CTE de camundongos apresentam características semelhantes ao botão embrionário, as CTE humanas seriam oriundas de células do epiblasto, portanto com menor potencial de diferenciação (NICHOLS & SMITH, 2009). Uma importante evidência deste modelo foi a demonstração de que cultivos de epiblastos de camundongo não respondem ao LIF, embora sejam mantidos indiferenciados na presença do bFGF e da Activina A (BRONS et al., 2007; TESAR et al., 2007). Estas células, denominadas de células-tronco epiblasticas (CTEP), apresentavam morfologia característica de CTE humanas (TESAR et al., 2007; BRONS et al., 2007; HANNA et al., 2010). As análises do perfil transcricional, capacidade de diferenciação e atividade dos enhancers do gene *Oct4* demonstram maior semelhança entre CTE humanas e CTEP do que entre os dois tipos celulares de camundongo (TESAR et al., 2007; BRONS et al., 2007). Outro fato relevante foi a demonstração da heterogeneidade dos cultivos de CTE e CTEP de camundongos, aumentando a complexidade dos estados pluripotentes (CHAMBERS et al., 2007; HAYASHI et al., 2008; TOYOOKA et al., 2008; HAN et al., 2010).

Uma questão importante no momento é entender como são estabelecidas e mantidas as diferenças entre CTE e CTEP. Diferentes formas já foram encontradas para converter CTEP em CTE, como pelo uso do cultivo 2i, transformação com *Nanog*, *Klf4*, e *Nr5a2*, dentre outros (HANNA et al., 2010). Apesar disso, os mecanismos que controlam estas conversões permanecem desconhecidos. No entanto, estes resultados citados acima poderão auxiliar na elucidação dos mecanismos de manutenção e conversão dos diferentes estádios de pluripotência (Figura 1.8).

A importância científica e potencialmente terapêutica das CTE levaram a investigações em nível molecular do mecanismo de regulação da pluripotência (BOYER et al., 2005; LOH et al., 2006; WELSTEAD et al., 2008). Por meio da produção de CTE deficientes em genes como *Oct4*, *Sox2*, e *Nanog*, foi possível determinar que estes fatores são necessários para manutenção da pluripotência (NICHOLS et al., 1998; NIWA et al., 2000b; CHAMBERS et al., 2003; MITSUI et al., 2003). No entanto, pouco se conhecia como estes genes contribuíam para a manutenção do estado indiferenciado. Fatores de transcrição regulam a expressão de dezenas ou centenas de genes alvo pela ligação as suas sequências reguladoras, que recruta

modificadores de cromatina e/ou a maquinaria basal de transcrição para estimular ou reprimir a atividade dos genes alvo (LEE & YOUNG, 2000; HOBERT, 2008). A determinação em nível genômico das seqüências de DNA alvo dos genes *Oct4*, *Sox2*, e *Nanog* foi capaz de determinar aspectos importantes da atividade destes fatores, inclusive sobre a cooperação entre os mesmos na modulação de diferentes vias de sinalização (BOYER et al., 2005; LOH et al., 2006; KIM et al., 2008a).

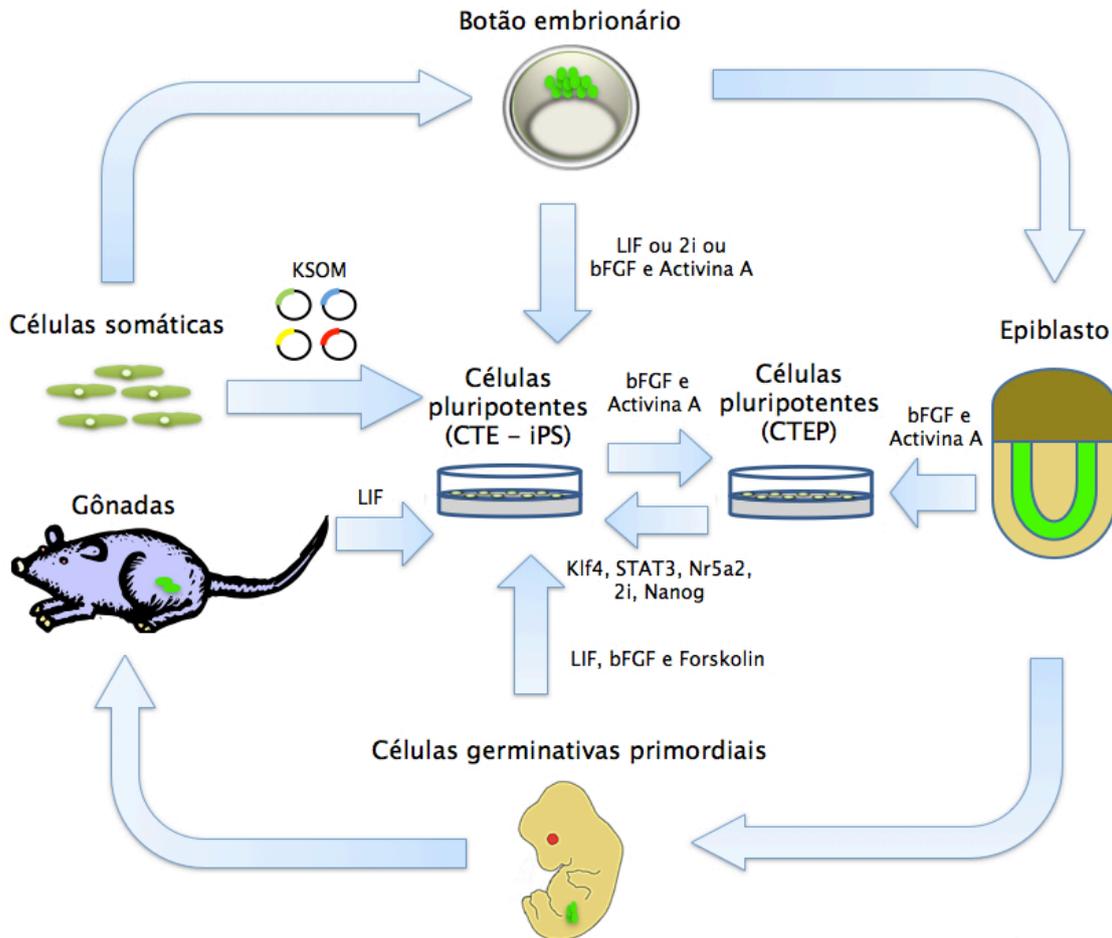


Figura 1.8 - Estabelecimento e conversão dos estados pluripotentes em mamíferos. Células-tronco embrionárias (ou iPS) podem ser obtidas a partir do botão embrionário ou da conversão de células somáticas ou de células-tronco epiblasticas (CTEP). O cultivo do epiblasto de camundongos (E5,5-6,5) permite o isolamento de CTEP, que também pode ser obtido pela conversão de células somáticas ou pelo cultivo de CTE ou iPS em condições definidas. Células-tronco germinativas (CTG) e Células-tronco espermatogênicas (CTESP) são obtidas a partir de células germinativas primordiais e gônadas de camundongos recém-nascidos, respectivamente. iPS: *induced pluripotent stem*. KSOM: *Klf4*, *Sox2*, *Oct4*, e *cMyc*.

A determinação da interação física de proteínas nucleares com *Nanog* e outros fatores de transcrição em CTE também contribuiu para melhor descrever o controle da pluripotência ao revelar a formação de complexos multiméricos associados a genes como *Oct4* e *Nanog* (WANG et al., 2006). A aplicação destas abordagens em nível de sistema biológico (*systems biology*) deverá permitir entender, de forma dinâmica, como estas redes de interação são construídas ou desfeitas durante a reprogramação ou diferenciação celular, respectivamente (LU et al., 2009; MACARTHUR et al., 2009).

A avaliação de modificações epigenéticas nas histonas de células CTE em nível genômico revelou que algumas regiões da cromatina destas células apresentam tanto aspectos de eucromatina quanto heterocromatina (BERNSTEIN et al., 2006; BOYER et al., 2006). Curiosamente, as sequências que apresentavam trimetilação no resíduo de aminoácido K4 da Histona H3 (H3K4me3 - presente na eucromatina) e trimetilação no resíduo de aminoácido K27 da Histona H3 (H3K27me3 - encontrada na heterocromatina), representavam regiões que codificam fatores de transcrição e microRNAs envolvidos em processos relacionados a diferenciação celular e organogênese (AZUARA et al., 2006; BERNSTEIN et al., 2006; BOYER et al., 2006). Este resultado foi interpretado como uma conformação da cromatina que permitiria uma rápida resposta a estímulos intrínsecos ou extrínsecos, facilitando a ativação dos genes alvo ou o estabelecimento da heterocromatina (BERNSTEIN et al., 2006). Este tipo de cromatina, denominada de bivalente, foi encontrada em embriões e outros tipos celulares, demonstrando o potencial das CTE para a identificação e elucidação de diferentes aspectos do mecanismo de controle gênico (MIKKELSEN et al., 2007; VASTENHOEW et al., 2010).

1.4.2.2. Reprogramação epigenética por fatores definidos

Um importante avanço na área de reprogramação epigenética foi obtido pela demonstração que a expressão exógena de determinados fatores de transcrição era suficiente para converter células somáticas para a pluripotência (TAKAHASHI & YAMANAKA, 2006; SAHA & JAENISCH, 2009; HANNA et al., 2010; YAMANAKA & BLAU, 2010).

Fibroblastos contendo *knockins* do gene de resistência a neomicina nos dois alelos do gene *Fbx15* foram inicialmente transformados com 24 fatores de transcrição expressos em CTE (TAKAHASHI & YAMANAKA, 2006). O gene *Fbx15* também é expresso em CTE,

embora não seja necessário para o desenvolvimento a termo ou para manutenção da pluripotência (TOKUZAWA et al., 2003). Prevendo que os eventos de reprogramação seriam raros, os autores realizaram a seleção por neomicina após três dias da transdução. Depois de duas semanas de seleção, colônias semelhantes à CTE foram obtidas (TAKAHASHI & YAMANAKA, 2006). Em seguida, determinou-se que apenas quatro fatores eram necessários para a reprogramação: *Oct4*, *Sox2*, *cMyc*, e *Klf4* (TAKAHASHI & YAMANAKA, 2006). Estas células, denominadas *induced pluripotent stem (iPS) cells*, possuíam morfologia e perfil transcricional semelhante às células-tronco embrionárias (TAKAHASHI & YAMANAKA, 2006). Apesar de apresentarem algumas características que indicavam que a reprogramação havia sido incompleta (desmetilação incompleta do DNA dos promotores dos genes *Oct4* e *Nanog* e a incapacidade de gerar camundongos quimeras), o relato sugeriu que, ao contrário do esperado, seria possível reprogramar células somáticas para pluripotência a partir da introdução de poucos fatores conhecidos (TAKAHASHI & YAMANAKA, 2006).

A seleção das células reprogramadas por transgenes de resistência a antibióticos sob o controle de promotores de genes envolvidos na pluripotência (*Oct4* ou *Nanog*) foi possível obter linhagens iPS que cumprem todos os critérios de avaliação de pluripotência, inclusive a formação de quimeras e transmissão a progênie (Figura 1.9) (MAHERALI et al., 2007; OKITA et al., 2007; WERNIG et al., 2007).

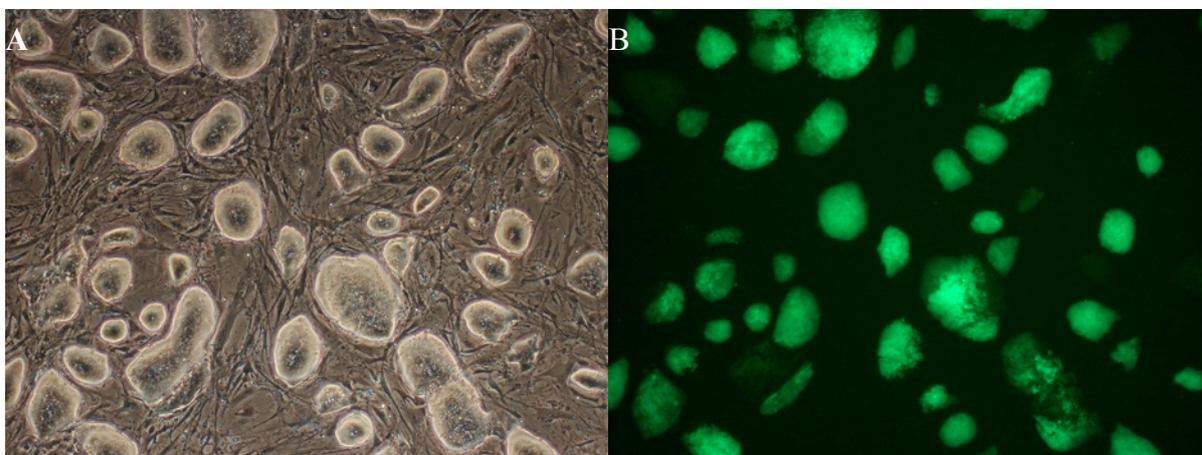


Figura 1.9 - Células iPS de camundongos: apresentam morfologia característica das células-tronco da espécie (a). O transgene *Oct4::GFP* permite identificar as colônias reprogramadas e auxilia na manutenção do cultivo pluripotente (b).

Em seguida, foi demonstrado que a seleção por transgenes de resistência a antibióticos e a transdução com *cMyc* eram dispensáveis para obtenção de células iPS (MEISSNER et al., 2007; WERNIG et al., 2008c; BLELLOCH et al., 2007; NAKAGAWA et al., 2008). Outro fato de interesse foi a demonstração de que outras combinações de fatores de transcrição são capazes de iniciar o processo (YU et al., 2007; KISKINIS & EGGAN, 2010; STADFELD & HOCHEDLINGER, 2010).

Um avanço significativo foi o isolamento de células iPS a partir de fibroblastos humanos (Figura 1.10) (TAKAHASHI et al., 2007; YU et al., 2007; LOWRY et al., 2008; PARK et al., 2008a; HANNA et al., 2010; STADFELD & HOCHEDLINGER, 2010). A obtenção de células iPS humanas permitiu estabelecer linhagens pluripotentes a partir de pacientes afligidos por diversas doenças (PARK et al., 2008b; DIMOS et al., 2008; KISKINIS & EGGAN, 2010). Um dos principais objetivos em estabelecer tais linhagens pluripotentes tem o intuito de estabelecer modelos *in vitro* de doenças humanas (SAHA & JAENISCH, 2009; KISKINIS & EGGAN, 2010). Doenças como, por exemplo, a diabetes do tipo 1 e a esclerose lateral amiotrófica (ELA), quando diagnosticadas, refletem a perda quase que total do tipo celular acometido na patologia (células β do pâncreas e neurônios motores, respectivamente; Figura 1.11). Por isso, a oferta restrita de material biológico de pacientes e a incapacidade de manter estas células em cultivo limitam a busca por novos tratamentos.

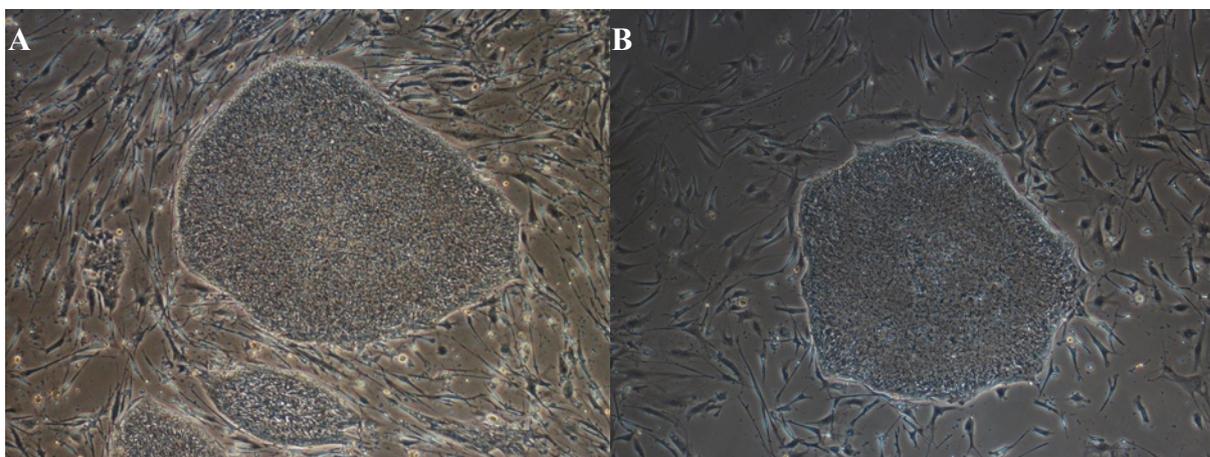


Figura 1.10 - Células pluripotentes humanas: células-tronco embrionárias (a) e células iPS (b): cultivo formado por colônias achatadas, possibilitando a visualização individual das células.

O estudo da ELA pode exemplificar este cenário. O uso de CTE obtidas de modelos animais de ELA foi capaz de recapitular o efeito parácrino tóxico das células da glia sobre os neurônios motores (DI GIORGIO et al., 2007; NAGAI et al., 2007). Apesar de ser um indício promissor do potencial deste modelo *in vitro*, as células não expressam níveis fisiológicos da versão mutante do gene *SOD1* (causa um tipo familiar da ELA) e são ineficazes para investigar a forma esporádica da doença (nenhum componente genético é conhecido nesta forma da ELA). Portanto, a investigação *ex vivo* utilizando células de pacientes tem maior potencial para a identificação dos mecanismos que causam a doença e possíveis ações terapêuticas (KISKINIS & EGGAN, 2010).

Uma limitação para as potenciais aplicações médicas das células iPS é a modificação genética durante a reprogramação. As sequências codantes dos fatores de transcrição usados na produção de células iPS são integradas no genoma, fato que pode resultar na transformação oncogênica (TAKAHASHI & YAMANAKA, 2006; OKITA et al., 2007). Por isso, diversos métodos tem sido investigados com o intuito de manter a integridade do genoma e evitar possíveis efeitos na qualidade das células iPS (FENG et al., 2009; O'MALLEY et al., 2009).

Os fatores de transcrição *Sox2*, *cMyc*, e *Klf4* são expressos em níveis variáveis em células somáticas, de modo tecido-específico. Devido a este fato, a escolha do tipo celular tem permitido eliminar transgenes devido aos níveis de expressão endógena dos genes: células-tronco neurais (CTN) e melanócitos permitem eliminar *Sox2* da transdução, enquanto que dependendo das condições experimentais, CTN permitem obter células iPS a partir da expressão exógena de combinações de dois fatores de transcrição (*Oct4* com o *cMyc* ou *Klf4*) ou *Oct4* apenas (KIM et al., 2008b, 2009a,b; UTIKAL et al., 2009). Apesar do potencial das CTN para reprogramação, a oferta restrita devido a dificuldade de recuperação de pacientes torna este tipo celular pouco atrativo para aplicações médicas. Por isso, as pesquisas tem utilizado preferencialmente células de fácil obtenção, principalmente fibroblastos e queratinócitos.

Os primeiros relatos que demonstraram o estabelecimento de linhagens iPS de camundongos sem integração no genoma foram baseados na transdução dos genes em células do fígado por adenovírus (tipo de vírus que não integra no genoma e muito eficiente na transdução de hepatócitos) e na introdução recorrente dos plasmídeos em fibroblastos fetais (STADFELD et al., 2008; OKITA et al., 2008). Em seguida, foi demonstrado que vetores episomais não integram o genoma e permanecem nas células tempo suficiente para

estabelecer colônias iPS humanas (YU et al., 2009). Estes resultados em conjunto com outros relatos posteriores comprovaram que não há um padrão de integração dos cDNAs no genoma das diversas linhagens iPS. Este fato significa que não existe um gene (ou via de sinalização) que precisa ser modulado e que seja, sistematicamente controlado pela integração aleatória dos fatores de transcrição (OKITA et al., 2008; STADFELD et al., 2008; AOI et al., 2008; KAJI et al., 2009; VARAS et al., 2009). Todavia, a principal limitação dos relatos acima é a baixa eficiência de reprogramação destes procedimentos (KISKINIS & EGGAN, 2010).

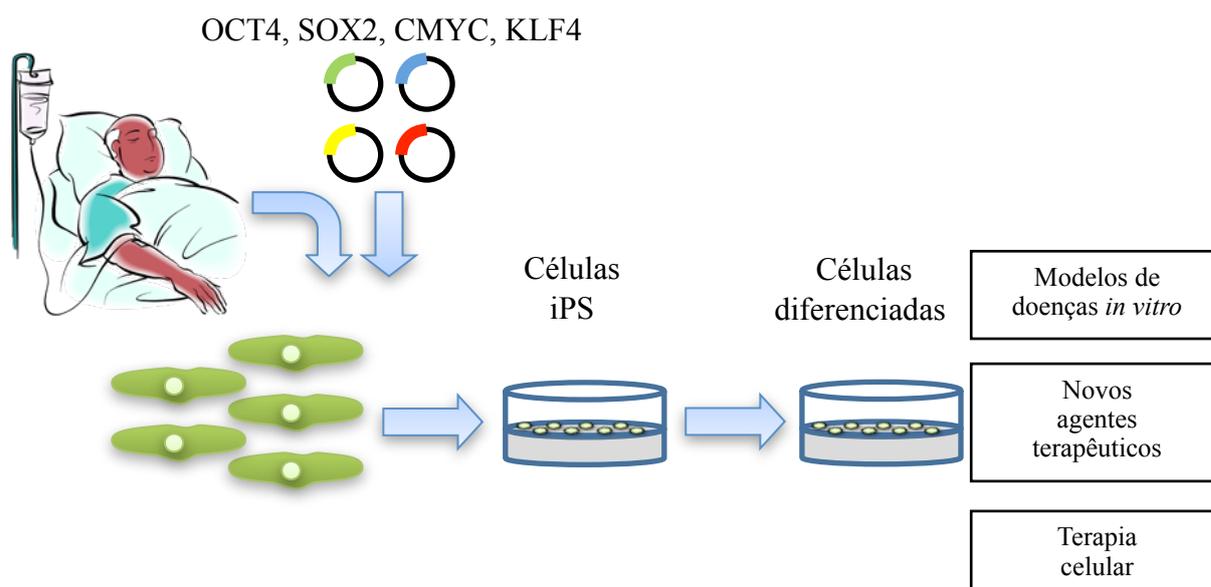


Figura 1.11 - Potencial terapêutico das células iPS.

O sistema *piggybac* (baseado em elementos transposão), apresenta alta eficiência de transformação celular e pode ser removido de forma eficiente (WOLTJEN et al., 2009). Utilizando um vetor policistrônico com sítios para remoção enzimática (sistema *Cre-LoxP*), células iPS com o transgene removido apresentaram perfil transcricional mais próximo as CTE do que as linhagens iPS obtidas com vetores virais ativos (SOLDNER et al., 2009). Estes resultados sugerem que a expressão residual dos transgenes após a reprogramação interfere no fenótipo das células reprogramadas. No entanto, a remoção enzimática mantém partes do vetor, fato que não elimina a possibilidade de causar transformação oncogênica (SOLDNER et al., 2009).

Outros métodos independentes da integração dos vetores para reprogramação foram recentemente desenvolvidos: vírus Sendai (FUSAKI et al., 2009), transdução de proteínas (KIM et al., 2009c; ZHOU et al., 2009), vetores circulares (JIA et al., 2010) e RNA mensageiros modificados (WARREN et al., 2010). A utilização de ácidos nucléicos modificados permitiu unir a manutenção integridade do genoma com alta eficiência de reprogramação, reduzindo de quatro para duas semanas o surgimento das primeiras colônias iPS humanas (WARREN et al., 2010). Outra aplicação desta abordagem é facilitar a diferenciação das células pluripotentes, como foi evidenciado pela formação de miotúbulos a partir da transfecção de células iPS com o fator de transcrição *MyoD*. A indução de CTE para diferenciação em tipos celulares específicos permanece pouco eficiente (OSAFUNE et al., 2008), fato que valoriza a nova abordagem.

Uma alternativa para manter a integridade do genoma é a prospecção de moléculas que permitam substituir a atividade dos fatores de transcrição durante a reprogramação para células iPS. Esta abordagem definitivamente elimina a possibilidade de modificação do genoma por ácidos nucléicos exógenos. Este objetivo tem sido alcançado pela estimulação da transcrição das versões endógenas dos genes de interesse ou pela compensação de sua atividade (FENG et al., 2009; KISKINIS & EGGAN, 2010).

Inicialmente foi demonstrado que o *cMyc* era necessário para obtenção de células iPS (TAKAHASHI & YAMANAKA, 2006), embora diversos relatos tenham obtido linhagens pluripotentes pela transdução apenas de *Oct4*, *Sox2*, e *Klf4* (NAKAGAWA et al., 2008; WERNIG et al., 2008c). Nestas condições a eficiência de geração de células iPS é cerca de cem vezes inferior, além de produzir linhagens pluripotentes com menor capacidade de diferenciação *in vivo* (NAKAGAWA et al., 2008, 2010; WERNIG et al., 2008c). A principal intenção de remover o *cMyc* foi evitar uma possível atividade oncogênica do gene (HANNA et al., 2007; OKITA et al., 2007). Com o intuito de contornar tais limitações, foi demonstrado que a proteína WNT3A e o inibidor de desacetilases, *valproic acid* (VPA) são capazes de compensar a omissão do *cMyc* na indução da pluripotência (HUANGFU et al., 2008a,b; MARSON et al., 2008).

Moléculas que substituam *Sox2* (LI et al., 2009b), *Sox2* e *cMyc* simultaneamente (SHI et al., 2008a,b; ICHIDA et al., 2009; LI et al., 2009c; MAHERALI & HOCHEDLINGER, 2009), *Klf4* (LYSSIOTIS et al., 2009), foram identificadas (Quadro 1.2). Mais recentemente foram relatadas combinações de compostos que permitem omitir dois ou mais fatores por vez

na reprogramação (LI et al., 2009c), utilizando apenas *Oct4* exógeno (LI et al., 2010; ZHU et al., 2010; YUAN et al., 2011).

Quadro 1.2 - Uso de moléculas para produção de células iPS.

Espécie	Tipo celular	Transdução	Molécula (atividade)	referência
C	Fibroblasto	KSOM; KSO	VPA, TSA, SAHA (Inibidor de desacetilases), dexametasona (corticoesteróide); aumento da eficiência	HUANGFU et al., 2008a
C	Fibroblasto	KSO	WNT3A; Substitui cMyc ativando a via Wnt	MARSON et al., 2008
H	Fibroblasto	KSO; SO	VPA (Inibidor de desacetilases)	HUANGFU et al., 2008b
C	CTN	KO; KSM	BIX-01294 (inibidor da enzima G9a)	SHI et al., 2008a
C	Fibroblasto	KO	BIX-01294 (inibidor da enzima G9a), BayK8644 (agonista de canais de cálcio)	SHI et al., 2008b
C	Fibroblasto; Células B	KSOM	5-azacytidine (inibidor de metilação de DNA)	MIKKELSEN et al., 2008
R	células progenitoras do fígado	KSO	PD0325901 (Inibidor da via MEK/ERK), CHIR99021 (Inibidor da GSK3), A-83-01 (Inibidores da via TGF- β);	LI et al., 2009b
H	Fibroblasto	SONL	PD0325901 (Inibidor da via MEK/ERK), CHIR99021 (Inibidor da GSK3), A-83-01 (Inibidores da via TGF- β);	LI et al., 2009b
C	Fibroblasto	KSO; KO	CHIR99021 (Inibidor da GSK3)	LI et al., 2009c

Espécie	Tipo celular	Transdução	Molécula (atividade)	referência
H	Queratinócito	KO	CHIR99021, Parnato (Inibidor da LSD1)	LI et al., 2009c
C	Fibroblasto	KOM; KO	Repsox (Inibidores da via TGF- β);	ICHIDA et al., 2009; MAHERALI & HOCHEDLINGER, 2009
C	Fibroblasto; CTN	SOM; OM	Kenpaullone (atividade desconhecida)	LYSSIOTIS et al., 2009
H	Fibroblasto	KSOM	SB431542 (Inibidor da via TGF- β), PD0325901 (Inibidor da via MEK/ERK); aumento da eficiência de reprogramação em 100x	LIN et al., 2009
C e H	Fibroblasto	KSO; KSOM	Vitamina C; redução das espécies reativas de oxigênio e da atividade da p53.	ESTEBAN et al., 2010
C	Fibroblasto	O	VPA, CHIR99021, 616452 (Inibidor da via TGF- β).	LI et al., 2010
H	Queratinócito, endotélio umbilical, ou células do fluido amniótico	O	NaB (Inibidor de deacetilases), PS48, A-83-01, PD0325901 (Inibidor da MEK/ERK) (+ Parnato + CHIR99021)	ZHU et al., 2010
C	Fibroblasto	O	A-83-01, AMI-5 (Inibidor de metiltransferases em argeninas)	YUAN et al., 2011

K: *Klf4*; S: *Sox2*; O: *Oct4*; M: *cMyc*; N: *Nanog*; L: *Lin28*; ND: não determinado; VPA: Valproic acid; CTN: Células-tronco neurais; C: camundongos; H: humanos; R: ratos; *LSD1*: *Lysine-specific demethylase 1*.

Apesar dos avanços, a principal limitação da abordagem é a ausência de moléculas que substituam o produto do gene *Oct4*. A clonagem por TN, a reprogramação por fusão entre células somáticas e CTE, e a indução da pluripotência são mecanismos de reprogramação

baseados na presença desta proteína. Portanto, não há evidências de reprogramação sem Oct4 exógeno.

O *OCT4* é fundamental para manutenção da pluripotência em embriões, CTE e células germinativas (NICHOLS et al., 1998; NIWA et al., 2000b; KEHLER et al., 2004; BOIANI & SCHÖLER, 2005; KELLNER & KIKYO, 2010). Em CTE, o *Oct4* atua na regulação de centenas de genes alvo de forma coordenada com outros fatores de transcrição, como o *Sox2* e *Nanog* (BOIANI & SCHÖLER, 2005; BOYER et al., 2005; WANG et al., 2006; KIM et al., 2008a). Além destas evidências, a análise da expressão do *Oct4* durante o desenvolvimento comprova que o fator de transcrição encontra-se restrito a tipos celulares pluripotentes (NICHOLS et al., 1998; NIWA et al., 2000b; KEHLER et al., 2004; BOIANI & SCHÖLER, 2005; KELLNER & KIKYO, 2010).

Após a formação do blastocisto, em camundongos, *OCT4* torna-se restrito ao botão embrionário e posteriormente ao epiblasto, no momento da formação do endoderma primitivo (hipoblasto). No decorrer do processo de diferenciação do epiblasto, *OCT4* fica localizado apenas nas células germinativas primordiais (CGP). Apesar de diversos relatos sugerirem que o Oct4 seria importante na manutenção de células tronco adultas (CTA) e que o mesmo seria expresso em alguns tipos de tumores humanos, a homeostase de diversos tecidos somáticos é mantida na ausência da expressão do gene (LENGNER et al., 2007).

A ausência de condições fisiológicas ou patológicas que ativem o gene *Oct4*, o forte controle transcricional do gene por metilação do DNA e resíduos de histona, H3K9me2 (FELDMAN et al., 2006; EPSZTEJN-LITMAN et al., 2008; ATHANASIADOU et al., 2010), e a provável dificuldade de compensar sua atividade por outros mecanismos tornam a eliminação do Oct4 exógeno na reprogramação um grande desafio. Apesar das evidências de que o Oct4 é necessário para reprogramação por fusão e para obtenção de células iPS (TAKAHASHI & YAMANAKA, 2006; PEREIRA et al., 2008), não é possível excluir a possibilidade que sob determinadas condições, este fator de transcrição seja dispensável (SHI et al., 2008a).

A intensa análise dos mecanismos de controle do *Oct4* tem revelado principalmente detalhes de como o gene torna-se inativo (FELDMAN et al., 2006; EPSZTEJN-LITMAN et al., 2008; ATHANASIADOU et al., 2010; KELLNER & KIKYO, 2010). No entanto, foi identificado um fator de transcrição, *Nr5a2* (*LRH-1*), como um gene cuja atividade mantém a atividade do *Oct4* no epiblasto (GU et al., 2005; GAO et al., 2006). Por codificar um receptor

nuclear, o gene *Nr5a2* é naturalmente regulado por uma molécula ligante, ou seja, uma molécula (FAYARD et al., 2004). Apesar do ligante natural deste receptor nuclear não ser conhecido, diversos compostos foram identificados como indutores da atividade do gene *Nr5a2* (WHITBY et al., 2006; HADIZADEH et al., 2008). É possível que este receptor nuclear permita reprogramar células somáticas em linhagens iPS independente de *Oct4* exógeno, inclusive pela ação de moléculas.

1.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, D.J.; VAN DER WEYDEN, L. Contemporary approaches for modifying the mouse genome. **Physiological Genomics** v.34, n.3, p.225-238, 2008.

ADLI, M.; ZHU, J.; BERNSTEIN, B.E. Genome-wide chromatin maps derived from limited numbers of hematopoietic progenitors. **Nature Methods**, v.7, n.8, p.615-618, 2010.

AMIT, M.; CARPENTER, M.K.; INOKUMA, M.S.; CHIU, C.P.; HARRIS, C.P.; WAKNITZ, M.A.; ITSKOVITZ-ELDOR, J.; THOMSON, J.A. Clonally derived human embryonic stem cell lines maintain pluripotency and proliferative potential for prolonged periods of culture. **Developmental Biology** v.227, n.2, p.271-278, 2000.

AOI, T.; YAE, K.; NAKAGAWA, M.; ICHISAKA, T.; OKITA, K.; TAKAHASHI, K.; CHIBA, T.; YAMANAKA, S. Generation of pluripotent stem cells from adult mouse liver and stomach cells. **Science**, v.321, n.5889, p.699-702, 2008.

ATHANASIADOU, R.; DE SOUSA, D.; MYANT, K.; MERUSI, C.; STANCHEVA, I.; BIRD, A. Targeting of de novo DNA methylation throughout the Oct-4 gene regulatory region in differentiating embryonic stem cells. **PLoS One**, v.5, n.4, e9937, 2010.

AZUARA, V.; PERRY, P.; SAUER, S.; SPIVAKOV, M.; JØRGENSEN, H.F.; JOHN, R.M.; GOUTI, M.; CASANOVA, M.; WARNES, G.; MERKENSCHLAGER, M.; FISHER, A.G. Chromatin signatures of pluripotent cell lines. **Nature Cell Biology**, v.8, n.5, p.532-538, 2006.

BAGUISI, A.; OVERSTRÖM, E.W. Induced enucleation in nuclear transfer procedures to produce cloned animals. **Theriogenology**, v.54, p.209, 2000.

BALDASSARRE, H.; WANG, B.; KAFIDI, N.; GAUTHIER, M.; NEVEU, N.; LAPOINTE, J.; SNEEK, L.; LEDUC, M.; DUGUAY, F.; ZHOU, J.F.; LAZARIS, A.; KARATZAS, C.N. Production of transgenic goats by pronuclear microinjection of in vitro produced zygotes derived from oocytes recovered by laparoscopy. **Theriogenology**, v.59, n.3-4, p.831-839, 2003.

BARBERI, T.; KLIVENYI, P.; CALINGASAN, N.Y.; LEE, H.; KAWAMATA, H.; LOONAM, K.; PERRIER, A.L.; BRUSES, J.; RUBIO, M.E.; TOPF, N.; TABAR, V.; HARRISON, N.L.; BEAL, M.F.; MOORE, M.A.; STUDER, L. Neural subtype specification of fertilization and nuclear transfer embryonic stem cells and application in parkinsonian mice. **Nature Biotechnology**, v.21, n.10, p.1200-1207, 2003.

BAYONA-BAFALUY, M.P.; MANFREDI, G.; MORAES, C.T. A chemical enucleation method for the transfer of mitochondrial DNA to rho(o) cells. **Nucleic Acids Research**, v.31, n.16, p.e98, 2003.

BAYONA-BAFALUY, M.P.; MULLER, S.; MORAES, C.T. Fast adaptive coevolution of nuclear and mitochondrial subunits of ATP synthetase in orangutan. **Molecular Biology and Evolution**, v.22, n.3, p.716-724, 2005.

BEATTIE, G.M.; LOPEZ, A.D.; BUCAY, N.; HINTON, A.; FIRPO, M.T.; KING, C.C.; HAYEK, A. Activin A maintains pluripotency of human embryonic stem cells in the absence of feeder layers. **Stem Cells**, v.23, n.4, p.489-495, 2005.

BERNSTEIN, B.E.; MIKKELSEN, T.S.; XIE, X.; KAMAL, M.; HUEBERT, D.J.; CUFF, J.; FRY, B.; MEISSNER, A.; WERNIG, M.; PLATH, K.; JAENISCH, R.; WAGSCHAL, A.; FEIL, R.; SCHREIBER, S.L.; LANDER, E.S. A bivalent chromatin structure marks key developmental genes in embryonic stem cells. **Cell**, v.125, n.2, p.315-326, 2006.

BHUTANI, N.; BRADY, J.J.; DAMIAN, M.; SACCO, A.; CORBEL, S.Y.; BLAU, H.M. Reprogramming towards pluripotency requires AID-dependent DNA demethylation. **Nature**, v.463, n.7284, p.1042-1047, 2010.

BLELLOCH, R.; VENERE, M.; YEN, J.; RAMALHO-SANTOS, M. Generation of induced pluripotent stem cells in the absence of drug selection. **Cell Stem Cell**, v.1, n.3, p.245-247, 2007.

BOIANI, M.; ECKARDT, S.; SCHÖLER, H.R.; MCLAUGHLIN, K.J. Oct4 distribution and level in mouse clones: consequences for pluripotency. **Genes and Development**, v.16, n.10, p.1209-1219, 2002.

BOIANI, M.; SCHÖLER, H.R. Regulatory networks in embryo-derived pluripotent stem cells. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v.6, n.11, p.872-884, 2005.

BORDIGNON, V.; SMITH, L.C. Telophase enucleation: an improved method to prepare recipient cytoplasts for use in bovine nuclear transfer. **Molecular Reproduction and Development**, v.49, n.1, p.29-36, 1998.

BORDIGNON, V.; SMITH, L.C. Ultraviolet-irradiated spermatozoa activate oocytes but arrest preimplantation development after fertilization and nuclear transplantation in cattle. **Biology of Reproduction**, v.61, n.6, p.1513-1520, 1999.

BORDIGNON, V.; KEYSTON, R.; LAZARIS, A.; BILODEAU, A.S.; PONTES, J.H.; ARNOLD, D.; FECTEAU, G.; KEEFER, C.; SMITH, L.C. Transgene expression of green fluorescent protein and germ line transmission in cloned calves derived from in vitro-transfected somatic cells. **Biology of Reproduction**, v.68, n.6, p.2013-2023, 2003.

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.

BOYER, L.A.; PLATH, K.; ZEITLINGER, J.; BRAMBRINK, T.; MEDEIROS, L.A.; LEE, T.I.; LEVINE, S.S.; WERNIG, M.; TAJONAR, A.; RAY, M.K.; BELL, G.W.; OTTE, A.P.; VIDAL, M.; GIFFORD, D.K.; YOUNG, R.A.; JAENISCH, R. Polycomb complexes repress developmental regulators in murine embryonic stem cells. **Nature**, v.441, n.7091, p.349-353, 2006.

BRADLEY, A.; EVANS, M.; KAUFMAN, M.H.; ROBERTSON, E. Formation of germ-line chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines. **Nature**, v.309, n.5965, p.255-256, 1984.

BRADSHAW, J.; JUNG, T.; FULKA, J. JR.; MOOR, R.M. UV irradiation of chromosomal DNA and its effect upon MPF and meiosis in mammalian oocytes. **Molecular Reproduction and Development**, v.41, n.4, p.503-512, 1995.

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.

BRINSTER, R.L.; CHEN, H.Y.; TRUMBAUER, M.; SENEAR, A.W.; WARREN, R.; PALMITER, R.D. Somatic expression of herpes thymidine kinase in mice following injection of a fusion gene into eggs. **Cell**, v.27, n.1-2, p.223-231, 1981.

BROCKES, J.P.; KUMAR, A. Plasticity and reprogramming of differentiated cells in amphibian regeneration. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v.3, n.8, p.566-574, 2003.

BROMHALL, J.D. Nuclear transplantation in the rabbit egg. **Nature**, v.258, n.5537, p.719-722, 1975.

BRONS, I.G.; SMITHERS, L.E.; TROTTER, M.W.; RUGG-GUNN, P.; SUN, B.; CHUVA DE SOUSA LOPES, S.M.; HOWLETT, S.K.; CLARKSON, A.; AHRLUND-RICHTER, L.; PEDERSEN, R.A.; VALLIER, L. Derivation of pluripotent epiblast stem cells from mammalian embryos. **Nature**, v.448, n.7150, p.191-195, 2007.

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.

BURDON, T.; TRACEY, C.; CHAMBERS, I.; NICHOLS, J.; SMITH, A. Suppression of SHP-2 and ERK signalling promotes self-renewal of mouse embryonic stem cells. **Developmental Biology**, v.210, n.1, p.30-43, 1999.

BURDON, T.; SMITH, A.; SAVATIER, P. Signalling, cell cycle and pluripotency in embryonic stem cells. **Trends in Cell Biology**, v.12, n.9, p.432-438, 2002.

BYRNE, J.A.; PEDERSEN, D.A.; CLEPPER, L.L.; NELSON, M.; SANGER, W.G.; GOKHALE, S.; WOLF, D.P.; MITALPOV, S.M. Producing primate embryonic stem cells by somatic cell nuclear transfer. **Nature**, v.450, p.497-502, 2007.

CAPECCHI, M.R. Altering the genome by homologous recombination. **Science**, v.244, n.4910, p.1288-1292, 1989.

CAPECCHI, M.R. Gene targeting in mice: functional analysis of the mammalian genome for the twenty-first century. **Nature Reviews Genetics**, v.6, n.6, 507-512, 2005.

CHAMBERS, I.; COLBY, D.; ROBERTSON, M.; NICHOLS, J.; LEE, S.; TWEEDIE, S.; SMITH, A. Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. **Cell**, v.113, n.5, p.643-655, 2003.

CHAMBERS, I.; SMITH, A. Self-renewal of teratocarcinoma and embryonic stem cells. **Oncogene**, v.23, n.43, p.7150-7160, 2004.

CHAMBERS, I.; SILVA, J.; COLBY, D.; NICHOLS, J.; NIJMEIJER, B.; ROBERTSON, M.; VRANA, J.; JONES, K.; GROTEWOLD, L.; SMITH, A. Nanog safeguards pluripotency and mediates germline development. **Nature**, v.450, n.7173, p.1230-1234, 2007.

CHAN, A.P.; GURDON, J.B. Nuclear transplantation from stably transfected cultured cells of *Xenopus*. **International Journal of Developmental Biology**, v.40, n.2, p.441-451, 1996.

CHAN, A.W.; DOMINKO, T.; LUETJENS, C.M.; NEUBER, E.; MARTINOVICH, C.; HEWITSON, L.; SIMERLY, C.R.; SCHATTEEN, G.P. Clonal propagation of primate offspring by embryo splitting. **Science**, v.287, n.5451, p.317-319, 2000.

CHEN, T.; ZHANG, Y.L.; JIANG, Y.; LIU, S.Z.; SCHATTEEN, H.; CHEN, D.Y.; SUN, Q.Y. The DNA methylation events in normal and cloned rabbit embryos. **FEBS Letters**, v.578, n.1-2, p.69-72, 2004.

COLLAS, P.; BALISE, J.J.; ROBL, J.M. Influence of cell cycle stage of the donor nucleus on development of nuclear transplant rabbit embryos. **Biology of Reproduction**, v.46, p.492-500, 1992.

COOPER, H.L.; BRAVERMAN, R. The mechanism by which actinomycin D inhibits protein synthesis in animal cells. **Nature**, v.269, p.527-529, 1977.

COSTA-BORGES, N.; PARAMIO, M.T.; CALDERÓN, G.; SANTALÓ, J.; IBÁÑEZ, E. Antimitotic treatments for chemically assisted oocyte enucleation in nuclear transfer procedures. **Cloning and Stem Cells**, v.11, n.1, p.153-166, 2009.

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.

DAHÉRON, L.; OPITZ, S.L.; ZAEHRES, H.; LENSCH, M.W.; ANDREWS, P.W.; ITSKOVITZ-ELDOR, J.; DALEY, G.Q. LIF/STAT3 signaling fails to maintain self-renewal of human embryonic stem cells. **Stem Cells**, v.22, n.5, p.770-778, 2004.

DAHL, J.A.; REINER, A.H.; COLLAS, P. Fast genomic muChIP-chip from 1,000 cells. **Genome Biology**, v.10, n.2, R13.

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.

DIBERARDINO, M.A.; ORR, N.H.; MCKINNELL, R.G. Feeding tadpoles cloned from *Rana erythrocyte* nuclei. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.83, n.21, p.8231-8234, 1986.

DI GIORGIO, F.P.; CARRASCO, M.A.; SIAO, M.C.; MANIATIS, T.; EGGAN, K. Non-cell autonomous effect of glia on motor neurons in an embryonic stem cell-based ALS model. **Nature Neuroscience**, v.10, n.5, p.608-614, 2007.

DIMOS, J.T.; RODOLFA, K.T.; NIAKAN, K.K.; WEISENTHAL, L.M.; MITSUMOTO, H.; CHUNG, W.; CROFT, G.F.; SAPHIER, G.; LEIBEL, R.; GOLAND, R.; WICHTERLE, H.; HENDERSON, C.E.; EGGAN, K. Induced pluripotent stem cells generated from patients with ALS can be differentiated into motor neurons. **Science**, v.321, n.5893, p.1218-1221, 2008.

DOMINKO, T.; CHAN, A.; SIMERLY, C.; LUETJENS, C.M.; HEWITSON, L.; MARTINOVICH, C.; SCHATTEN, G. Dynamic imaging of the metaphase II spindle and maternal chromosomes in bovine oocytes: implications for enucleation efficiency verification, avoidance of parthenogenesis, and successful embryogenesis. **Biology of Reproduction**, v.62, n.1, p.150-154, 2000.

DOR, Y.; BROWN, J.; MARTINEZ, O.I.; MELTON, D.A. Adult pancreatic beta-cells are formed by self-duplication rather than stem-cell differentiation. **Nature**, v.429, n.6987, p.41-46, 2004.

EAKIN, G.S.; BEHRINGER, R.R. Tetraploid development in the mouse. **Developmental Dynamics**, v.228, n.4, p.751-766, 2003.

EGGAN, K.; BALDWIN, K.; TACKETT, M.; OSBORNE, J.; GOGOS, J.; CHESS, A.; AXEL, R.; JAENISCH R. Mice cloned from olfactory sensory neurons. **Nature**, v.428, n.6978, p.44-49, 2004.

EGLI, D.; ROSAINS, J.; BIRKHOFF, G.; EGGAN, K. Developmental reprogramming after chromosome into mitotic mouse zygotes. **Nature**, v.447, p.479-485, 2007.

EGLI, D.; BIRKHOFF, G.; EGGAN, K. Mediators of reprogramming: transcription factors and transitions through mitosis. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v.9, p.505-516, 2008.

ELSHEIKH, A.S.; TAKAHASHI, Y.; HISHINUMA, M.; KANAGAWA, H. Developmental ability of mouse late 2-cell stage blastomeres fused to chemically enucleated oocytes in vitro. **Journal of Veterinary Medical Science**, v.59, n.2, p.107-113, 1997.

EPSZTEJN-LITMAN, S.; FELDMAN, N.; ABU-REMAILEH, M.; SHUFARO, Y.; GERSON, A.; UEDA, J.; DEPLUS, R.; FUKS, F.; SHINKAI, Y.; CEDAR, H.; BERGMAN, Y. De novo DNA methylation promoted by G9a prevents reprogramming of embryonically silenced genes. **Nature Structural & Molecular Biology**, v.15, n.11, p.1176-1183, 2008.

ERNST, M.; NOVAK, U.; NICHOLSON, S.E.; LAYTON, J.E.; DUNN, A.R. The carboxyl-terminal domains of gp130-related cytokine receptors are necessary for suppressing embryonic stem cell differentiation. Involvement of STAT3. **Journal of Biological Chemistry** v.274, n.14, p.9729-9737, 1999.

EVANS, MJ.; KAUFMAN, M.H. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. **Nature**, v.292, n.5819, p.154-156, 1981.

EYESTONE, W.H. Production and breeding of transgenic cattle using in vitro embryo production technology. **Theriogenology**, v.51, n.2, p.509-517, 1999.

FAYARD, E.; AUWERX, J.; SCHOONJANS, K. LRH-1: an orphan nuclear receptor involved in development, metabolism and steroidogenesis. **Trends in Cell Biology**, v.14, n.5, p.250-260, 2004.

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

FENG, B.; NG, J.H.; HENG, J.C.; NG, H.H. Molecules that promote or enhance reprogramming of somatic cells to induced pluripotent stem cells. **Cell Stem Cell**, v.4, n.4, p.301-312, 2009.

FENG, S.; JACOBSEN, S.E.; REIK, W. Epigenetic reprogramming in plant and animal development. **Science**, v.330, n.6004, p.622-627, 2010.

FULKA, J. JR.; MOOR, R.M. Noninvasive chemical enucleation of mouse oocytes. **Molecular Reproduction and Development**, v.34, n.4, p.427-430, 1993.

FULKA, J. JR.; LOI, P.; FULKA, H.; PTAK, G.; NAGAI, T. Nucleus transfer in mammals: noninvasive approaches for the preparation of cytoplasts. **Trends in Biotechnology**, v.22, n.6, p.279-283, 2004.

FUSAKI, N.; BAN, H.; NISHIYAMA, A.; SAEKI, K.; HASEGAWA, M. Efficient induction of transgene-free human pluripotent stem cells using a vector based on Sendai virus, an RNA virus that does not integrate into the host genome. **Proc. Jpn. Acad., Ser. B, Phys. Biol. Sci.** v.85, p.348-362, 2009.

GAO, D.M.; WANG, L.F.; LIU, J.; KONG, Y.Y.; WANG, Y.; XIE, Y.H. Expression of mouse liver receptor homologue 1 in embryonic stem cells is directed by a novel promoter. **FEBS Letters**, v.580, n.7, p.1702-1708, 2006.

GASARYAN, K.G.; HUNG, N.M.; NEYFAKH, A.A.; IVANENKOV, V.V. Nuclear transplantation in teleost *Misgurnus fossilis* L. **Nature**, v.280, n.5723, p.585-587, 1979.

GASPARRINI, B.; GAO, S.; AINSLIE, A.; FLETCHER, J.; MCGARRY, M.; RITCHIE, W.A.; SPRINGBETT, A.J.; OVERSTRÖM, E.W.; WILMUT, I.; DE SOUSA, P.A. Cloned mice derived from embryonic stem cell karyoplasts and activated cytoplasts prepared by induced enucleation. **Biology of Reproduction**, v.68, n.4, p.1259-1266, 2003.

GOLDBERG, I.H.; RABINOWITZ, M.; REICH, E. Basis of actinomycin action. I. DNA binding and inhibition of RNA-polymerase synthetic reactions by actinomycin. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.48, p.2094-2101, 1962.

GRAF, T.; ENVER, T. Forcing cells to change lineages. **Nature**, v.462, n.7273, p.587-594, 2009.

GU, P.; GOODWIN, B.; CHUNG, A.C.; XU, X.; WHEELER, D.A.; PRICE, R.R.; GALARDI, C.; PENG, L.; LATOUR, A.M.; KOLLER, B.H.; GOSSEN, J.; KLIEWER, S.A.; COONEY, A.J. Orphan nuclear receptor LRH-1 is required to maintain Oct4 expression at the epiblast stage of embryonic development. **Molecular and Cellular Biology**, v.25, n.9, p.3492-3505, 2005.

GU, H.; BOCK, C.; MIKKELSEN, T.S.; JÄGER, N.; SMITH, Z.D.; TOMAZOU, E.; GNIRKE, A.; LANDER, E.S.; MEISSNER, A. Genome-scale DNA methylation mapping of clinical samples at single-nucleotide resolution. **Nature Methods**, v.7, n.2, p.133-136, 2010.

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.

GURDON, J.B. The Effects of Ultraviolet Radiation on Uncleaved Eggs of *Xenopus laevis*. **Quarterly Journal of Microscopical Science**, v.101, p299-311, 1960.

GURDON, J.B.; HOPWOOD, N. The introduction of *Xenopus laevis* into developmental biology: of empire, pregnancy testing and ribosomal genes. **International Journal of Developmental Biology**, v.44, n.1, p.43-50, 2000.

GURDON, J.B.; BYRNE, J.A. The first half-century of nuclear transplantation. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.100, n.14, p.8048-8052, 2003.

GURDON, J.B. From nuclear transfer to nuclear reprogramming: the reversal of cell differentiation. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v.22, p.1-22, 2006.

GURDON, J.B.; MELTON, D.A. Nuclear reprogramming in cells. **Science**, v.322, n.5909, p.1811-1815, 2008.

HACEIN-BEY-ABINA, S.; VON KALLE, C.; SCHMIDT, M.; MCCORMACK, M.P.; WULFFRAAT, N.; LEBOULCH, P.; LIM, A.; OSBORNE, C.S.; PAWLIUK, R.; MORILLON, E.; SORENSEN, R.; FORSTER, A.; FRASER, P.; COHEN, J.I.; DE SAINT BASILE, G.; ALEXANDER, I.; WINTERGERST, U.; FREBOURG, T.; AURIAS, A.; STOPPA-LYONNET, D.; ROMANA, S.; RADFORD-WEISS, I.; GROSS, F.; VALENSI, F.; DELABESSE, E.; MACINTYRE, E.; SIGAUX, F.; SOULIER, J.; LEIVA, L.E.; WISSLER, M.; PRINZ, C.; RABBITTS, T.H.; LE DEIST, F.; FISCHER, A.; CAVAZZANA-CALVO, M. LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. **Science**, v.302, n.5644, p.415-419, 2003.

HADIZADEH, S.; KING, D.N.; SHAH, S.; SEWER, M.B. Sphingosine-1-phosphate regulates the expression of the liver receptor homologue-1. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.283, n.1-2, p.104-113, 2008.

HAMMER, R.E.; PURSEL, V.G.; REXROAD, C.E. JR; WALL, R.J.; BOLT, D.J.; EBERT, K.M.; PALMITER, R.D.; BRINSTER, R.L. Production of transgenic rabbits, sheep and pigs by microinjection. **Nature**, v.315, n.6021, p.680-683, 1985.

HAN, D.W.; DO, J.T.; GENTILE, L.; STEHLING, M.; LEE, H.T.; SCHÖLER, H.R. Pluripotential reprogramming of the somatic genome in hybrid cells occurs with the first cell cycle. **Stem Cells**, v.26, n.2, p.445-454, 2008.

HAN, D.W.; TAPIA, N.; JOO, J.Y.; GREBER, B.; ARAÚZO-BRAVO, M.J.; BERNEMANN, C.; KO, K.; WU, G.; STEHLING, M.; DO, J.T.; SCHÖLER, H.R. Epiblast stem cell subpopulations represent mouse embryos of distinct pregastrulation stages. **Cell**, v.143, n.4, p.617-627, 2010.

HANNA, J.; WERNIG, M.; MARKOULAKI, S.; SUN, C.W.; MEISSNER, A.; CASSADY, J.P.; BEARD, C.; BRAMBRINK, T.; WU, L.C.; TOWNES, T.M.; JAENISCH, R. Treatment of sickle cell anemia mouse model with iPS cells generated from autologous skin. **Science**, v.318, n.5858, p.1920-1923, 2007.

HANNA, J.H.; SAHA, K.; JAENISCH, R. Pluripotency and cellular reprogramming: facts, hypotheses, unresolved issues. **Cell**, v.143, n.4, p.508-525, 2010.

HAYASHI, K.; LOPES, S.M.; TANG, F.; SURANI, M.A. Dynamic equilibrium and heterogeneity of mouse pluripotent stem cells with distinct functional and epigenetic states. **Cell Stem Cell**, v.3, n.4, p.391-401, 2008.

HAYES, E.; GALEA, S.; VERKUYLEN, A.; PERA, M.; MORRISON, J.; LACHAM KAPLAN, O.; TROUNSON, A. Nuclear transfer of adult and genetically modified fetal cells of the rat. **Physiological Genomics**, v.5, n.4, p.193-204, 2001.

HIKAWA, N.; TAKENAKA, T. Improved method for producing neuronal hybrids using emetine and actinomycin D. **Brain Research**, v.734, n.1-2, p.345-348, 1996.

HIKAWA, N.; TAKENAKA, T. Method for production of neuronal hybridoma using emetine and actinomycin D. **Brain Research Protocols**, v.1, n.3, p.224-226, 1997.

HOBERT, O. Gene regulation by transcription factors and microRNAs. **Science**, v.319, n.5871, p.1785-1786, 2008.

HOCHEDLINGER, K.; BLELLOCH, R.; BRENNAN, C., YAMADA, Y.; KIM, M.; CHIN, L.; JAENISCH, R. Reprogramming of a melanoma genome by nuclear transplantation. **Genes and Development**, v.18, n.15, p.1875-1885, 2004.

HOCHEDLINGER, K.; JAENISCH, R. Nuclear reprogramming and pluripotency. **Nature**, v.441, n.7097, p.1061-1067, 2006.

HOPPE, P.C.; ILLMENSEE, K. Microsurgically produced homozygous-diploid uniparental mice. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.74, n.12, p.5657-5661, 1977.

HUA, S.; ZHANG, Z.; ZHANG, C.; ZHANG, Y. An improved enucleation method of bovine somatic cell nuclear transfer. **Journal of Genetics and Genomics**, v.34, n.6, p.491-496, 2007.

HUANGFU, D.; MAEHR, R.; GUO, W.; EIJKELENBOOM, A.; SNITOW, M.; CHEN, A.E.; MELTON, D.A. Induction of pluripotent stem cells by defined factors is greatly improved by small-molecule compounds. **Nature Biotechnology**, v.26, p.795-797, 2008a.

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. **Nature Biotechnology**, v.26, n.11, p. 1269-1275, 2008b.

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.

HUMPHREY, R.K.; BEATTIE, G.M.; LOPEZ, A.D.; BUCAY, N.; KING, C.C.; FIRPO, M.T.; ROSE-JOHN, S.; HAYEK, A. Maintenance of pluripotency in human embryonic stem cells is STAT3 independent. **Stem Cells**, v.22, n.4, p.522-530, 2004.

IBAÑEZ, E.; ALBERTINI, D.F.; OVERSTRÖM, E.W. Demecolcine-induced oocyte enucleation for somatic cell cloning: coordination between cell-cycle egress, kinetics of cortical cytoskeletal interactions, and second polar body extrusion. **Biology of Reproduction**, v.68, n.4, p.1249-1258, 2003.

ICHIDA, J.K.; BLANCHARD, J.; LAM, K.; SON, E.Y.; CHUNG, J.E.; EGLI, D.; LOH, K.M.; CARTER, A.C.; DI GIORGIO, F.P.; KOSZKA, K.; HUANGFU, D.; AKUTSU, H.; LIU, D.R.; RUBIN, L.L.; EGGAN, K. A small-molecule inhibitor of tgf-Beta signaling replaces sox2 in reprogramming by inducing nanog. **Cell Stem Cell**, v.5, n.5, p.491-503, 2009.

ILLMENSEE, K.; HOPPE, P.C. Nuclear transplantation in *Mus musculus*: developmental potential of nuclei from preimplantation embryos. **Cell**, v.23, n.1, p.9-18, 1981.

JAENISCH, R.; YOUNG, R. Stem cells, the molecular circuitry of pluripotency and nuclear reprogramming. **Cell**, v.132, n.4, p.567-582, 2008.

JAMES, D.; LEVINE, A.J.; BESSER, D.; HEMMATI-BRIVANLOU, A. TGFbeta/activin/nodal signaling is necessary for the maintenance of pluripotency in human embryonic stem cells. **Development**, v.132, n.6, p.1273-1282, 2005.

JIA, F.; WILSON, K.D.; SUN, N.; GUPTA, D.M.; HUANG, M.; LI, Z.; PANETTA, N.J.; CHEN, Z.Y.; ROBBINS, R.C.; KAY, M.A.; LONGAKER, M.T.; WU, J.C. A nonviral minicircle vector for deriving human iPS cells. **Nature Methods**, v.7, p.197-199, 2010.

KAJI, K.; NORRBY, K.; PACA, A.; MILEIKOVSKY, M.; MOHSENI, P.; WOLTJEN, K. Virus-free induction of pluripotency and subsequent excision of reprogramming factors. **Nature**, v.458, p.771-775, 2009.

KAWAKAMI, M.; TANI, T.; YABUUCHI, A.; KOBAYASHI, T.; MURAKAMI, H.; FUJIMURA, T.; KATO, Y.; TSUNODA, Y. Effect of demecolcine and nocodazole on the efficiency of chemically assisted removal of chromosomes and the developmental potential of nuclear transferred porcine oocytes. **Cloning and Stem Cells**, v.5, n.4, p.379-387, 2003.

KEHLER, J.; TOLKUNOVA, E.; KOSCHORZ, B.; PESCE, M.; GENTILE, L.; BOIANI, M.; LOMELÍ, H.; NAGY, A.; MCLAUGHLIN, K.J.; SCHÖLER, H.R.; TOMILIN, A. Oct4 is required for primordial germ cell survival. **EMBO Reports**, v.5, n.11, p.1078-1083, 2004.

KELLNER, S.; KIKYO, N. Transcriptional regulation of the Oct4 gene, a master gene for pluripotency. **Histology and Histopathology**, v.25, n.3, p.405-412, 2010.

KIM, T.M.; HWANG, W.S.; SHIN, J.H.; PARK, H.J.; HAN, J.Y.; LIM, J.M. Development of a nonmechanical enucleation method using x-ray irradiation in somatic cell nuclear transfer. **Fertility and Sterility**, v.82, n.4, p.963-965, 2004.

KIM, J.; CHU, J.; SHEN, X.; WANG, J.; ORKIN, S.H. An extended transcriptional network for pluripotency of embryonic stem cells. **Cell**, v.132, n.6, p.1049-1061, 2008a.

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

KIM, J.B.; SEBASTIANO, V.; WU, G.; ARAÚZO-BRAVO, M.J.; SASSE, P.; GENTILE, L.; KO, K.; RUAU, D.; EHRICH, M.; VAN DEN BOOM, D.; MEYER, J.; HÜBNER, K.; BERNEMANN, C.; ORTMEIER, C.; ZENKE, M.; FLEISCHMANN, B.K.; ZAEHRES, H.; SCHÖLER, H.R. Oct4-induced pluripotency in adult neural stem cells. **Cell**, v.136, n.3, p.411-419, 2009a.

KIM, J.B.; GREBER, B.; ARAÚZO-BRAVO, M.J.; MEYER, J.; PARK, K.I.; ZAEHRES, H.; SCHÖLER, H.R. Direct reprogramming of human neural stem cells by OCT4. **Nature**, v.461, n.7264, p.649-643, 2009b.

KIM, D.; KIM, C.H.; MOON, J.I.; CHUNG, Y.G.; CHANG, M.Y.; HAN, B.S.; KO, S.; YANG, E.; CHA, K.Y.; LANZA, R.; KIM, K.S. Generation of human induced pluripotent stem cells by direct delivery of reprogramming proteins. **Cell Stem Cell**, v.4, p.472-476, 2009c.

KIM, K.; DOI, A.; WEN, B.; NG, K.; ZHAO, R.; CAHAN, P.; KIM, J.; ARYEE, M.J.; JI, H.; EHRLICH, L.I.; YABUUCHI, A.; TAKEUCHI, A.; CUNNIFF, K.C.; HONGGUANG, H.; MCKINNEY-FREEMAN, S.; NAVEIRAS, O.; YOON, T.J.; IRIZARRY, R.A.; JUNG, N.; SEITA, J.; HANNA, J.; MURAKAMI, P.; JAENISCH, R.; WEISSLEDER, R.; ORKIN, S.H.; WEISSMAN, I.L.; FEINBERG, A.P.; DALEY, G.Q. Epigenetic memory in induced pluripotent stem cells. **Nature**, v.467, n.7313, p.285-290, 2010.

KIMMINS, S.; SASSONE-CORSI, P. Chromatin remodelling and epigenetic features of germ cells. **Nature**, v.434, n.7033, p.583-589, 2005.

KIRAK, O.; FRICKEL, E.M.; GROTENBREG, G.M.; SUH, H.; JAENISCH, R.; PLOEGH, H.L. Transnuclear mice with predefined T cell receptor specificities against *Toxoplasma gondii* obtained via SCNT. **Science**, v.328, n.5975, p.243-248, 2010.

KISKINIS, E.; EGGAN, K. Progress toward the clinical application of patient-specific pluripotent stem cells. **Journal of Clinical Investigation**, v.120, n.1, p.51-59, 2010.

KOCHE, R.P.; SMITH, Z.D.; ADLI, M.; GU, H.; KU, M.; GNIRKE, A.; BERNSTEIN, B.E.; MEISSNER, A. Reprogramming factor expression initiates widespread targeted chromatin remodeling. **Cell Stem Cell**, v.8, n.1, p.96-105, 2011.

KORZH, V.; STRAHLE, U. Marshall Barber and the century of microinjection: from cloning of bacteria to cloning of everything. **Differentiation**, v.70, n.6, p.221-226, 2002.

KUNATH, T.; SABA-EL-LEIL, M.K.; ALMOUSAILLEAKH, M.; WRAY, J.; MELOCHE, S.; SMITH, A. FGF stimulation of the Erk1/2 signalling cascade triggers transition of pluripotent embryonic stem cells from self-renewal to lineage commitment. **Development**, v.134, n.16, p.2895-2902, 2007.

KUROIWA, Y.; KASINATHAN, P.; SATHIYASEELAN, T.; JIAO, J.A.; MATSUSHITA, H.; SATHIYASEELAN, J.; WU, H.; MELLQUIST, J.; HAMMITT, M.; KOSTER, J.; KAMODA, S.; TACHIBANA, K.; ISHIDA, I.; ROBL, J.M. Antigen-specific human polyclonal antibodies from hyperimmunized cattle. **Nature Biotechnology**, v.27, n.2, p.173-181, 2009.

LAI, L.; KOLBER-SIMONDS, D.; PARK, K.W.; CHEONG, H.T.; GREENSTEIN, J.L.; IM, G.S.; SAMUEL, M.; BONK, A.; RIEKE, A.; DAY, B.N.; MURPHY, C.N.; CARTER, D.B.; HAWLEY, R.J.; PRATHER, R.S. Production of alpha-1,3-galactosyltransferase knockout pigs by nuclear transfer cloning. **Science**, v.295, n.5557, p.1089-1092, 2002.

LANZA, R.P.; CHUNG, H.Y.; YOO, J.J.; WETTSTEIN, P.J.; BLACKWELL, C.; BORSON, N.; HOFMEISTER, E.; SCHUCH, G.; SOKER, S.; MORAES, C.T.; WEST, M.D.; ATALA, A. Generation of histocompatible tissues using nuclear transplantation. **Nature Biotechnology**, v.20, n.7, p.689-696, 2002.

LANZA, R.; MOORE, M.A.; WAKAYAMA, T.; PERRY, A.C.; SHIEH, J.H.; HENDRIKX, J.; LERI, A.; CHIMENTI, S.; MONSEN, A.; NURZYNSKA, D.; WEST, M.D.; KAJSTURA, J.; ANVERSA, P. Regeneration of the infarcted heart with stem cells derived by nuclear transplantation. **Circulation Research**, v.94, n.6, p.820-827, 2004.

LEE, T.I.; YOUNG, R.A. Transcription of eukaryotic protein-coding genes. **Annual Review of Genetics**, v.34, p.77-137, 2000.

LENGNER, C.J.; CAMARGO, F.D.; HOCHEDLINGER, K.; WELSTEAD, G.G.; ZAIDI, S.; GOKHALE, S.; SCHOLER, H.R.; TOMILIN, A.; JAENISCH, R. Oct4 expression is not required for mouse somatic stem cell self-renewal. **Cell Stem Cell**, v.1, n.4, p.403-415, 2007.

LI, J.; ISHII, T.; FEINSTEIN, P.; MOMBAERTS, P. Odorant receptor gene choice is reset by nuclear transfer from mouse olfactory sensory neurons. **Nature**, v.428, n.6981, p.393-399, 2004a.

LI, G.P.; WHITE, K.L.; BUNCH, T.D. Review of enucleation methods and procedures used in animal cloning: state of the art. **Cloning and Stem Cells**, v.6, n.1, p.5-13, 2004b.

LI, P.; TONG, C.; MEHRAN-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, J.; LIU, X.; WANG, H.; ZHANG, S.; LIU, F.; WANG, X.; WANG, Y. Human embryos derived by somatic cell nuclear transfer using an alternative enucleation approach. **Cloning and Stem Cells**, v.11, n.1, p.39-50, 2009a.

LI, W.; WEI, W.; ZHU, S.; ZHU, J.; SHI, Y.; LIN, T.; HAO, E.; HAYEK, A.; DENG, H.; DING, S. Generation of rat and human induced pluripotent stem cells by combining genetic reprogramming and chemical inhibitors. **Cell Stem Cell**, v.4, n.1, p.16-19, 2009b.

LI, W.; ZHOU, H.; ABUJAROUR, R.; ZHU, S.; YOUNG JOO, J.; LIN, T.; HAO, E.; SCHÖLER, H.R.; HAYEK, A.; DING, S. Generation of human-induced pluripotent stem cells in the absence of exogenous Sox2. **Stem Cells**, v.27, n.12, p.2992-3000, 2009c.

LI, Y.; ZHANG, Q.; YIN, X.; YANG, W.; DU, Y.; HOU, P.; GE, J.; LIU, C.; ZHANG, W.; ZHANG, X.; WU, Y.; LI, H.; LIU, K.; WU, C.; SONG, Z.; ZHAO, Y.; SHI, Y.; DENG, H. Generation of iPSCs from mouse fibroblasts with a single gene, Oct4, and small molecules. **Cell Research**, *No prelo*, 2010.

LIN, T.; AMBASUDHAN, R.; YUAN, X.; LI, W.; HILCOVE, S.; ABUJAROUR, R.; LIN, X.; HAHM, H.S.; HAO, E.; HAYEK, A.; DING, S. A chemical platform for improved induction of human iPSCs. **Nature Methods**, v.6, n.11, p.805-808, 2009.

LIU, L.; OLDENBOURG, R.; TRIMARCHI, J.R.; KEEFE, D.L. A reliable, noninvasive technique for spindle imaging and enucleation of mammalian oocytes. **Nature Biotechnology**, v.18, n.2, p.223-225, 2000.

LIU, J.L.; SUNG, L.Y.; BARBER, M.; YANG, X. Hypertonic medium treatment for localization of nuclear material in bovine metaphase II oocytes. **Biology of Reproduction**, v.66, n.5, p.1342-1349, 2002.

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. **Nature Genetics**, v.38, n.4, p.431-440, 2006.

LOWRY, W.E.; RICHTER, L.; YACHECHKO, R.; PYLE, A.D.; TCHIEU, J.; SRIDHARAN, R.; CLARK, A.T.; PLATH, K. Generation of human induced pluripotent stem cells from dermal fibroblasts. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** v.105, p.2883-2888, 2008.

LU, R.; MARKOWETZ, F.; UNWIN, R.D.; LEEK, J.T.; AIROLDI, E.M.; MACARTHUR, B.D.; LACHMANN, A.; ROZOV, R.; MA'AYAN, A.; BOYER, L.A.; TROYANSKAYA, O.G.; WHETTON, A.D.; LEMISCHKA, I.R. Systems-level dynamic analyses of fate change in murine embryonic stem cells. **Nature**, v.462, n.7271, p.358-362, 2009.

LYSSIOTIS, C.A.; FOREMAN, R.K.; STAERK, J.; GARCIA, M.; MATHUR, D.; MARKOULAKI, S.; HANNA, J.; LAIRSON, L.L.; CHARETTE, B.D.; BOUCHEZ, L.C.; BOLLONG, M.; KUNICK, C.; BRINKER, A.; CHO, C.Y.; SCHULTZ, P.G.; JAENISCH, R. Reprogramming of murine fibroblasts to induced pluripotent stem cells with chemical complementation of Klf4. **Proc Natl Acad Sci USA**. v.106, n.22, p.8912-8917, 2009.

MACARTHUR, B.D.; MA'AYAN, A.; LEMISCHKA, I.R. Systems biology of stem cell fate and cellular reprogramming. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v.10, n.10, p.672-681, 2009.

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.

MAHERALI, N.; AHFELDT, T.; RIGAMONTI, A.; UTIKAL, J.; COWAN, C.; HOCHEDLINGER, K. A high-efficiency system for the generation and study of human induced pluripotent stem cells. **Cell Stem Cell**, v.3, n.3, p.340-345, 2008.

MAHERALI, N.; HOCHEDLINGER, K. Tgfbeta signal inhibition cooperates in the induction of iPSCs and replaces Sox2 and cMyc. **Current Biology**, v.19, p.1718-1723, 2009.

MARSON, A.; FOREMAN, R.; CHEVALIER, B.; BILODEAU, S.; KAHN, M.; YOUNG, R.A.; JAENISCH, R. Wnt signaling promotes reprogramming of somatic cells to pluripotency. **Cell Stem Cell**, v.3, n.2, p.132-135, 2008.

MARTIN, GR. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.78, n.12, p.7634-7638, 1981.

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

MCCREATH, K.J.; HOWCROFT, J.; CAMPBELL, K.H.; COLMAN, A.; SCHNIEKE, A.E.; KIND, A.J. Production of gene-targeted sheep by nuclear transfer from cultured somatic cells. **Nature**, v.405, n.6790, p.1066-1069, 2000.

MCGRATH, J.; SOLTER, D. Nuclear transplantation in the mouse embryo by microsurgery and cell fusion. **Science**, v.220, n.4603, p.1300-1302, 1983.

MCGRATH, J.; SOLTER, D. Inability of mouse blastomere nuclei transferred to enucleated zygotes to support development in vitro. **Science**, v.226, n.4680, p.1317-1319, 1984.

MCLAY, D.W.; CLARKE, H.J. Remodelling the paternal chromatin at fertilization in mammals. **Reproduction**, v.125, n.5, p.625-633, 2003.

MEISSNER, A.; JAENISCH, R. Mammalian nuclear transfer. **Developmental Dynamics**, v.235, n.9, p.2460-2469, 2006.

MEISSNER, A.; WERNIG, M.; JAENISCH, R. Direct reprogramming of genetically unmodified fibroblasts into pluripotent stem cells. **Nature Biotechnology**, v.25, n.10, p.1177-1181, 2007.

MENG, L.; ELY, J.J.; STOUFFER, R.L.; WOLF, D.P. Rhesus monkeys produced by nuclear transfer. **Biology of Reproduction**, v.57, p.454-459, 1997.

MIKKELSEN, T.S.; KU, M.; JAFFE, D.B.; ISSAC, B.; LIEBERMAN, E.; GIANNOUKOS, G.; ALVAREZ, P.; BROCKMAN, W.; KIM, T.K.; KOCHER, R.P.; LEE, W.; MENDENHALL, E.; O'DONOVAN, A.; PRESSER, A.; RUSS, C.; XIE, X.; MEISSNER, A.; WERNIG, M.; JAENISCH, R.; NUSBAUM, C.; LANDER, E.S.; BERNSTEIN, B.E. Genome-wide maps of chromatin state in pluripotent and lineage-committed cells. **Nature**, v.448, n.7153, p.553-560, 2007.

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

MILLER, R.A.; RUDDLE, F.H. Pluripotent teratocarcinoma-thymus somatic cell hybrids. **Cell**, v.9, n.1, p.45-55, 1976.

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.

MODLINSKI, J.A. Haploid mouse embryos obtained by microsurgical removal of one pronucleus. **Journal of Embryology & Experimental Morphology**, v.33, n.4, p.897-905, 1975.

MODLINSKI, J.A. Transfer of embryonic nuclei to fertilised mouse eggs and development of tetraploid blastocysts. **Nature**, v.273, n.5662, p.466-467, 1978.

MODLINSKI, J.A. Preimplantation development of microsurgically obtained haploid and homozygous diploid mouse embryos and effects of pretreatment with Cytochalasin B on

enucleated eggs. **Journal of Embryology & Experimental Morphology**, v.60, p.153-161, 1980.

MODLINSKI, J.A. The fate of inner cell mass and trophectoderm nuclei transplanted to fertilized mouse eggs. **Nature**, v.292, n.5821, p.342-343, 1981.

MOORE, N.W.; ADAMS, C.E.; ROWSON, L.E. Developmental potential of single blastomeres of the rabbit egg. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.17, n.3, p.527-531, 1968.

MOURA, Marcelo Tigre. **Utilização da actinomicina D como método de enucleação química de ovócitos bovinos destinados à Transferência nuclear**. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília, 2007. 60p. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília, 2007a.

MOURA, M.T. Enucleação de ovócitos mamíferos destinados à transferência nuclear. **Anais da Academia Pernambucana de Ciências Agrônomicas** v. 4, p.126-146, 2007b.

MOURA, M.T.; DE SOUSA, R.V.; DE OLIVEIRA LEME, L; RUMPF, R. Analysis of actinomycin D treated cattle oocytes and their use for somatic cell nuclear transfer. **Animal Reproduction Science**, v.109, n.1-4, p.40-49, 2008.

NAGAI, M.; RE, D.B.; NAGATA, T.; CHALAZONITIS, A.; JESSELL, T.M.; WICHTERLE, H.; PRZEDBORSKI, S. Astrocytes expressing ALS-linked mutated SOD1 release factors selectively toxic to motor neurons. **Nature Neuroscience**, v.10, n.5, p.615-622, 2007.

NAGY, A.; ROSSANT, J.; NAGY, R.; ABRAMOW-NEWERLY, W.; RODER, J.C. Derivation of completely cell culture-derived mice from early-passage embryonic stem cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.90, n.18, p.8424-8428, 1993.

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. **Nature Biotechnology**, v.26, n.1, p.101-106, 2008.

NG, S.C.; CHEN, N.; YIP, W.Y.; LIOW, S.L.; TONG, G.Q.; MARTELLI, B.; TAN, L.G.; MARTELLI, P. The first cell cycle after transfer of somatic cell nuclei in a non-human primate. **Development**, v.131, n.10, p.2475-2484, 2004.

NG, R.K.; GURDON, J.B. Epigenetic memory of active gene transcription is inherited through somatic cell nuclear transfer. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.102, n.6, p.1957-1962, 2005.

NG, R.K.; GURDON, J.B. Epigenetic memory of an active gene state depends on histone H3.3 incorporation into chromatin in the absence of transcription. **Nature Cell Biology**, v.10, n.1, p.102-109, 2008.

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

NICHOLS, J.; SILVA, J.; ROODE, M.; SMITH, A. Suppression of Erk signalling promotes ground state pluripotency in the mouse embryo. **Development**, v.136, n.19, p.3215-3222, 2009.

NICHOLS, J.; SMITH, A. Naive and primed pluripotent states. **Cell Stem Cell**, v.4, n.6, p.487-492, 2009.

NIWA, H.; BURDON, T.; CHAMBERS, I.; SMITH, A. Self-renewal of pluripotent embryonic stem cells is mediated via activation of STAT3. **Genes and Development**, v.12, n.13, p.2048-2060, 1998.

NIWA, K.; KANI, S.; KINOSHITA, M.; OZATO, K.; WAKAMATSU, Y. Expression of GFP in nuclear transplants generated by transplantation of embryonic cell nuclei from GFP-transgenic fish into nonenucleated eggs of medaka, *Oryzias latipes*. **Cloning**, v.2, n.1, p.23-34, 2000a.

NIWA, H.; MIYAZAKI, J.; SMITH, A.G. Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. **Nature Genetics**, v.24, n.4, p. 372-376, 2000b.

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, p.949-953, 2008.

O'MALLEY, J.; WOLTJEN, K.; KAJI, K. New strategies to generate induced pluripotent stem cells. **Current Opinion in Biotechnology**, v.20, n.5, p.516-521, 2009.

OOI, S.L.; HENIKOFF, S. Germline histone dynamics and epigenetics. **Current Opinion in Cell Biology**, v.19, n.3, p.257-265, 2007.

ORKIN, S.H.; ZON, L.I. Hematopoiesis: an evolving paradigm for stem cell biology. **Cell**, v.132, n.4, p.631-644, 2008.

OSAFUNE, K.; CARON, L.; BOROWIAK, M.; MARTINEZ, R.J.; FITZ-GERALD, C.S.; SATO, Y.; COWAN, C.A.; CHIEN, K.R.; MELTON, D.A. Marked differences in differentiation propensity among human embryonic stem cell lines. **Nature Biotechnology**, v.26, n.3, p.313-315, 2008.

OSWALD, J.; ENGEMANN, S.; LANE, N.; MAYER, W.; OLEK, A.; FUNDELE, R.; DEAN, W.; REIK, W.; WALTER, J. Active demethylation of the paternal genome in the mouse zygote. **Current Biology**, v.10, n.8, p.475-478, 2000.

PALMITER, R.D.; BRINSTER, R.L.; HAMMER, R.E.; TRUMBAUER, M.E.; ROSENFELD, M.G.; BIRNBERG, N.C.; EVANS, R.M. Dramatic growth of mice that develop from eggs microinjected with metallothionein-growth hormone fusion genes. **Nature**, v.300, n.5893, p.611-615, 1982.

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, p.141-146, 2008a.

PARK, I.H.; ARORA, N.; HUO, H.; MAHERALI, N.; AHFELDT, T.; SHIMAMURA, A.; LENSCH, M.W.; COWAN, C.; HOCHEDLINGER, K.; DALEY, G.Q. Disease-specific induced pluripotent stem cells. **Cell**, v.134, n.5, p.877-886, 2008b.

PEREIRA, C.F.; TERRANOVA, R.; RYAN, N.K.; SANTOS, J.; MORRIS, K.J.; CUI, W.; MERKENSCHLAGER, M.; FISHER, A.G. Heterokaryon-based reprogramming of human B lymphocytes for pluripotency requires Oct4 but not Sox2. **PLoS Genetics**, v.4, n.9, e1000170.

POLO, J.M.; LIU, S.; FIGUEROA, M.E.; KULALERT, W.; EMINLI, S.; TAN, K.Y.; APOSTOLOU, E.; STADTFELD, M.; LI, Y.; SHIODA, T.; NATESAN, S.; WAGERS, A.J.; MELNICK, A.; EVANS, T.; HOCHEDLINGER, K. Cell type of origin influences the molecular and functional properties of mouse induced pluripotent stem cells. **Nature Biotechnology**, v.28, n.8, p.848-855, 2010.

PRATHER, R.S.; BARNES, F.L.; SIMS, M.M.; ROBL, J.M.; EYESTONE, W.H. FIRST, N.L. Nuclear transplantation in the bovine embryo: assessment of donor nuclei and recipient oocyte. **Biology of Reproduction**, v.37, n.4, p.859-866, 1987.

PRATHER, R.S.; SIMS, M.M.; FIRST, N.L. Nuclear transplantation in early pig embryos. **Biology of Reproduction**, v.41, n.3, p.414-418, 1989.

RAZ, R.; LEE, C.K.; CANNIZZARO, L.A.; D'EUSTACHIO, P.; LEVY, D.E. Essential role of STAT3 for embryonic stem cell pluripotency. **Proc Natl Acad Sci U S A** v.96, n.6, p.2846-2851, 1999.

REIK, W.; DEAN, W.; WALTER, J. Epigenetic reprogramming in mammalian development. **Science**, v.293, n.5532, p.1089-1093, 2001.

RICHT, J.A.; KASINATHAN, P.; HAMIR, A.N.; CASTILLA, J.; SATHIYASEELAN, T.; VARGAS, F.; SATHIYASEELAN, J.; WU, H.; MATSUSHITA, H.; KOSTER, J.; KATO, S.; ISHIDA, I.; SOTO, C.; ROBL, J.M.; KUROIWA, Y. Production of cattle lacking prion protein. **Nature Biotechnology**, v.25, n.1, p.132-138, 2007.

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.

RIDEOUT, W.M. 3RD; HOCHEDLINGER, K.; KYBA, M.; DALEY, G.Q.; JAENISCH, R. Correction of a genetic defect by nuclear transplantation and combined cell and gene therapy. **Cell**, v.109, n.1, p.17-27, 2002.

ROSSANT, J.; TAM, P.P. Blastocyst lineage formation, early embryonic asymmetries and axis patterning in the mouse. **Development**, v.136, n.5, p.701-713, 2009.

RUBIN, H. The disparity between human cell senescence in vitro and lifelong replication in vivo. **Nature Biotechnology**, v.20, n.7, p.675-681, 2002.

SAHA, K.; JAENISCH, R. Technical challenges in using human induced pluripotent stem cells to model disease. **Cell Stem Cell**, v.5, n.6, p.584-595, 2009.

SANTOS, F.; ZAKHARTCHENKO, V.; STOJKOVIC, M.; PETERS, A.; JENUWEIN, T.; WOLF, E.; REIK, W.; DEAN, W. Epigenetic marking correlates with developmental potential in cloned bovine preimplantation embryos. **Current Biology**, v.13, n.13, p.1116-1121, 2003.

SARAIVA, N.Z.; PERECIN, F.; MÉO, S.C.; FERREIRA, C.R.; TETZNER, T.A.; GARCIA, J.M. Demecolcine effects on microtubule kinetics and on chemically assisted enucleation of bovine oocytes. **Cloning and Stem Cells** v.11, n.1, p.141-151, 2009.

SASSONE-CORSI, P. Unique chromatin remodeling and transcriptional regulation in spermatogenesis. **Science**, v.296, n.5576, p.2176-2178, 2002.

SAVARD, C.; NOVAK, S.; SAINT-CYR, A.; MOREAU, M.; POTHIER, F.; SIRARD, M.A. Comparison of bulk enucleation methods for porcine oocytes. **Molecular Reproduction and Development**, v.67, n.1, p.70-76, 2004.

SCHNIEKE, A.E.; KIND, A.J.; RITCHIE, W.A.; MYCOCK, K.; SCOTT, A.R.; RITCHIE, M.; WILMUT, I.; COLMAN, A.; CAMPBELL, K.H. Human factor IX transgenic sheep produced by transfer of nuclei from transfected fetal fibroblasts. **Science**, v.278, n.5346, p.2130-2133, 1997.

SHI, W.; DIRIM, F.; WOLF, E.; ZAKHARTCHENKO, V.; HAAF, T. Methylation reprogramming and chromosomal aneuploidy in in vivo fertilized and cloned rabbit preimplantation embryos. **Biology of Reproduction**, v.71, n.1, p.340-347, 2004.

SHI, Y.; DO, J.T.; DESPONTS, C.; HAHM, H.S.; SCHÖLER, H.R.; DING, S. A combined chemical and genetic approach for the generation of induced pluripotent stem cells. **Cell Stem Cell**, v.2, n.6, p.525-528, 2008a.

SHI, Y.; DESPONTS, C.; DO, J.T.; HAHM, H.S.; SCHÖLER, H.R.; DING, S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic fibroblasts by Oct4 and Klf4 with small-molecule compounds. **Cell Stem Cell**, v.3, n.5, p.568-574, 2008b.

SIMERLY, C.; DOMINKO, T.; NAVARA, C.; PAYNE, C.; CAPUANO, S.; GOSMAN, G.; CHONG, K.Y.; TAKAHASHI, D.; CHACE, C.; COMPTON, D.; HEWITSON, L.; SCHATTEN, G. Molecular correlates of primate nuclear transfer failures. **Science**, v.300, n.5617, p.297, 2003.

SKELLEY, A.M.; KIRAK, O.; SUH, H.; JAENISCH, R.; VOLDMAN, J. Microfluidic control of cell pairing and fusion. **Nature Methods**, v.6, n.2, p.147-152, 2009.

SMITH, A.G.; HEATH, J.K.; DONALDSON, D.D.; WONG, G.G.; MOREAU, J.; STAHL, M.; ROGERS, D. Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides. **Nature**, v.336, n.6200, p.688-690, 1988.

SMITH, L.C.; WILMUT, I. Influence of nuclear and cytoplasmic activity on the development in vivo of sheep embryos after nuclear transplantation. **Biology of Reproduction**, v.40, p.1027-1035, 1989.

SMITH, L.C. Membrane and intracellular effects of ultraviolet irradiation with Hoechst 33342 on bovine secondary oocytes matured in vitro. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.99, n.1, p.39-44, 1993.

SMITH, A.G. Embryo-derived stem cells: of mice and men. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v.17, p.435-462, 2001.

SOBELL, H.M. Actinomycin and DNA transcription. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.82, n.16, p.5328-5331, 1985.

SOLDNER, F.; HOCKEMEYER, D.; BEARD, C.; GAO, Q.; BELL, G.W.; COOK, E.G.; HARGUS, G.; BLAK, A.; COOPER, O.; MITALIPOVA, M.; ISACSON, O.; JAENISCH, R. Parkinson's disease patient-derived induced pluripotent stem cells free of viral reprogramming factors. **Cell**, v.136, n.5, p.964-977, 2009.

SOLTER, D. Mammalian cloning: advances and limitations. **Nature Reviews Genetics**, v.1, n.3, p.199-207, 2000.

SOLTER, D. From teratocarcinomas to embryonic stem cells and beyond: a history of embryonic stem cell research. **Nature Reviews Genetics**, v.7, n.4, p.319-327, 2006.

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

STADTFELD, M.; APOSTOLOU, E.; AKUTSU, H.; FUKUDA, A.; FOLLETT, P.; NATESAN, S.; KONO, T.; SHIODA, T.; HOCHEDLINGER, K. Aberrant silencing of imprinted genes on chromosome 12qF1 in mouse induced pluripotent stem cells. **Nature**, v.465, n.7295, p.175-181, 2010.

STADTFELD, M.; HOCHEDLINGER, K. Induced pluripotency: history, mechanisms, and applications. **Genes and Development**, v.24, n.20, p.2239-2263, 2010.

STICE, S.L.; ROBL, J.M. Nuclear reprogramming in nuclear transplant rabbit embryos. **Biology of Reproduction**, v.39, p.657-664, 1988.

STUHLMANN-LAEISZ, C.; LANG, S.; CHALARIS, A.; KRZYSZTOF, P.; ENGE, S.; EICHLER, J.; KLINGMÜLLER, U.; SAMUEL, M.; ERNST, M.; ROSE-JOHN, S.; SCHELLER, J. Forced dimerization of gp130 leads to constitutive STAT3 activation, cytokine-independent growth, and blockade of differentiation of embryonic stem cells. **Molecular Biology of the Cell**, v.17, n.7, p.2986-2995, 2006.

SUMI, T.; FUJIMOTO, Y.; NAKATSUJI, N.; SUEMORI, H. STAT3 is dispensable for maintenance of self-renewal in nonhuman primate embryonic stem cells. **Stem Cells**, v.22, n.5, p.861-872, 2004.

TADA, M.; TAKAHAMA, Y.; ABE, K.; NAKATSUJI, N.; TADA, T. Nuclear reprogramming of somatic cells by in vitro hybridization with ES cells. **Current Biology**, v.11, n.19, p.1553-1558, 2001.

TAGARELLI, A.; PIRO, A.; LAGONIA, P.; TAGARELLI, G. Hans Spemann. One hundred years before the birth of experimental embryology. **Anatomia, Histologia, Embryologia**, v.33, n.1, p.28-32, 2004.

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, p.861-872, 2007.

TAM, P.P.; LOEBEL, D.A. Gene function in mouse embryogenesis: get set for gastrulation. **Nature Reviews Genetics**, v.8, n.5, p.368-381, 2007.

TANAKA, E.M. Cell differentiation and cell fate during urodele tail and limb regeneration. **Current Opinion in Genetics & Development**, v.13, n.5, p.497-501, 2003.

TANI, T.; SHIMADA, H.; KATO, Y., TSUNODA, Y. Demecolcine-assisted enucleation for bovine cloning. **Cloning and Stem Cells**, v.8, n.1, p.61-66, 2006.

TATHAM, B.G.; DOWSING, A.T.; TROUNSON, A.O. Enucleation by centrifugation of in vitro-matured bovine oocytes for use in nuclear transfer. **Biology of Reproduction**, v.53, n.5, p.1088-1094, 1995.

TERADA, N.; HAMAZAKI, T.; OKA, M.; HOKI, M.; MASTALERZ, D.M.; NAKANO, Y.; MEYER, E.M.; MOREL, L.; PETERSEN, B.E.; SCOTT, E.W. Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. **Nature**, v.416, n.6880, p.542-545, 2002.

TESAR, P.J.; CHENOWETH, J.G.; BROOK, F.A.; DAVIES, T.J.; EVANS, E.P.; MACK, D.L.; GARDNER, R.L.; MCKAY, R.D. New cell lines from mouse epiblast share defining features with human embryonic stem cells. **Nature**, v.448, n.7150, p.196-199, 2007.

THOMSON, J.A.; KALISHMAN, J.; GOLOS, T.G.; DURNING, M.; HARRIS, C.P.; BECKER, R.A.; HEARN, J.P. Isolation of a primate embryonic stem cell line. **Proc Natl Acad Sci U S A**. v.92, n.17, p.7844-7848, 1995.

THOMSON, J.A.; ITSKOVITZ-ELDOR, J.; SHAPIRO, S.S.; WAKNITZ, M.A.; SWIERGIEL, J.J.; MARSHALL, V.S.; JONES, J.M. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. **Science**, v.282, n.5391, p.1145-1147, 1998.

TOKUZAWA, Y.; KAIHO, E.; MARUYAMA, M.; TAKAHASHI, K.; MITSUI, K.; MAEDA, M.; NIWA, H.; YAMANAKA, S. Fbx15 is a novel target of Oct3/4 but is dispensable for embryonic stem cell self-renewal and mouse development. **Molecular and Cellular Biology** v.23, n.8, p.2699-2708, 2003.

TONG, C.; LI, P.; WU, N.L.; YAN, Y.; YING, Q.L. Production of p53 gene knockout rats by homologous recombination in embryonic stem cells. **Nature**, v.467, n.7312, p.211-213, 2010.

TOYOOKA, Y.; SHIMOSATO, D.; MURAKAMI, K.; TAKAHASHI, K.; NIWA, H. Identification and characterization of subpopulations in undifferentiated ES cell culture. **Development**, v.135, n.5, p.909-918, 2008.

TRASK, D.K.; MULLER, M.T. Stabilization of type I topoisomerase-DNA covalent complexes by actinomycin D. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.85, n.5, p.1417-1421, 1988.

UTIKAL, J.; MAHERALI, N.; KULALERT, W.; HOCHEDLINGER, K. Sox2 is dispensable for the reprogramming of melanocytes and melanoma cells into induced pluripotent stem cells. **Journal of Cell Science**, v.122, n.19, p.3502-3510, 2009.

VAJTA, G.; LEWIS, I.M.; HYTTEL, P., THOUAS, G.A.; TROUNSON, A.O. Somatic cell cloning without micromanipulators. **Cloning**, v.3, n.2, p.89-95, 2001.

VARAS, F.; STADTFELD, M.; DE ANDRES-AGUAYO, L.; MAHERALI, N.; DI TULLIO, A.; PANTANO, L.; NOTREDAME, C.; HOCHEDLINGER, K.; GRAF, T. Fibroblast-derived induced pluripotent stem cells show no common retroviral vector insertions. **Stem Cells**, v.27, n.2, p.300-306, 2009.

VASTENHOEW, N.L.; ZHANG, Y.; WOODS, I.G.; IMAM, F.; REGEV, A.; LIU, X.S.; RINN, J.; SCHIER, A.F. Chromatin signature of embryonic pluripotency is established during genome activation. **Nature**, v.464, n.7290, p.922-926, 2010.

WAGONER, E.J.; ROSENKRANS, C.F., JR.; GLIEDT, D.W.; PIERSON, J.N.; MUNYON, A.L. Functional enucleation of bovine oocytes: Effects of centrifugation and ultraviolet light. **Theriogenology**, v.46, n.2, p.279-284, 1996.

WAKAMATSU, Y.; JU, B.; PRISTYAZNHYUK, I.; NIWA, K.; LADYGINA, T.; KINOSHITA, M.; ARAKI, K.; OZATO, K. Fertile and diploid nuclear transplants derived from embryonic cells of a small laboratory fish, medaka (*Oryzias latipes*). **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.98, n.3, p.1071-1076, 2001.

WAKAYAMA, T.; TATENO, H.; MOMBAERTS P.; YANAGIMACHI, R. Nuclear transfer into mouse zygotes. **Nature Genetics**, v.24, n.2, p.108-109, 2000.

WAKAYAMA, S.; KISHIGAMI, S.; VAN THUAN, N.; OHTA, H.; HIKICHI, T.; MIZUTANI, E.; YANAGIMACHI, R.; WAKAYAMA, T. Propagation of an infertile hermaphrodite mouse lacking germ cells by using nuclear transfer and embryonic stem cell technology. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.102, n.1, p.29-33, 2005.

WANG, M.K.; LIU, J.L.; LI, G.P.; LIAN, L.; CHEN, D.Y. Sucrose pretreatment for enucleation: an efficient and non-damage method for removing the spindle of the mouse MII oocyte. **Molecular Reproduction and Development**, v.58, n.4, p.432-436, 2001.

WANG, J.; RAO, S.; CHU, J.; SHEN, X.; LEVASSEUR, D.N.; THEUNISSEN, T.W.; ORKIN, S.H. A protein interaction network for pluripotency of embryonic stem cells. **Nature**, v.444, n.7117, p.364-368, 2006.

WARREN, L.; MANOS, P.D.; AHFELDT, T.; LOH, Y.H.; LI, H.; LAU, F.; EBINA, W.; MANDAL, P.K.; SMITH, Z.D.; MEISSNER, A.; DALEY, G.Q.; BRACK, A.S.; COLLINS, J.J.; COWAN, C.; SCHLAEGER, T.M.; ROSSI, D.J. Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells with synthetic modified mRNA. **Cell Stem Cell**, v.7, n.5, p.618-613, 2010.

WELLS, D.N.; MISICA, P.M.; TERVIT, H.R.; VIVANCO, W.H. Adult somatic cell nuclear transfer is used to preserve the last surviving cow of the Enderby Island cattle breed. **Reproduction, Fertility and Development**, v.10, n.4, p.369-378, 1998.

WELSTEAD, G.G.; SCHORDERET, P.; BOYER, L.A. The reprogramming language of pluripotency. **Current Opinion in Genetics & Development**, v.18, n.2, p.123-129, 2008.

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.

WERNIG, M.; ZHAO, J.P.; PRUSZAK, J.; HEDLUND, E.; FU, D.; SOLDNER, F.; BROCCOLI, V.; CONSTANTINE-PATON, M.; ISACSON, O.; JAENISCH, R. Neurons derived from reprogrammed fibroblasts functionally integrate into the fetal brain and improve symptoms of rats with Parkinson's disease. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.105, n.15, p.5856-5861, 2008a.

WERNIG, M.; LENGNER, C.J.; HANNA, J.; LODATO, M.A.; STEINE, E.; FOREMAN, R. STAERK, J.; MARKOULAKI, S.; JAENISCH, R. A drug-inducible transgenic system for direct reprogramming of multiple somatic cell types. **Nature Biotechnology**, v.26, n.8, p.916-924, 2008b.

WERNIG, M.; MEISSNER, A.; CASSADY, J.P.; JAENISCH, R. c-Myc is dispensable for direct reprogramming of mouse fibroblasts. **Cell Stem Cell**, v.2, n.1, p.10-12, 2008c.

WESTHUSIN, M.E.; LONG, C.R.; SHIN, T.; HILL, J.R.; LOONEY, C.R.; PRYOR, J.H.; PIEDRAHITA, J.A. Cloning to reproduce desired genotypes. **Theriogenology**, v.55, n.1, p.35-49, 2001.

WHITBY, R.J.; DIXON, S.; MALONEY, P.R.; DELERIVE, P.; GOODWIN, B.J.; PARKS, D.J.; WILLSON, T.M. Identification of small molecule agonists of the orphan nuclear receptors liver receptor homolog-1 and steroidogenic factor-1. **Journal of Medical Chemistry**, v.49, n.23, p.6652-6655, 2006.

WILLADSEN, S.M. The development capacity of blastomeres from 4- and 8-cell sheep embryos. **Journal of Embryology & Experimental Morphology**, v.65, p.165-172, 1981.

WILLADSEN, S.M. Nuclear transplantation in sheep embryos. **Nature**, v.320, n.6057, p.63-65, 1986.

WILLIAMS, R.L.; HILTON, D.J.; PEASE, S.; WILLSON, T.A.; STEWART, C.L.; GEARING, D.P.; WAGNER, E.F.; METCALF, D.; NICOLA, N.A.; GOUGH, N.M. Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells. **Nature**, v.336, n.6200, p.684-687, 1988.

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.; BEAUJEAN, N.; DE SOUSA, P.A.; DINNYES, A.; KING, T.J.; PATERSON, L.A.; WELLS, D.N.; YOUNG, L.E. Somatic cell nuclear transfer. **Nature**, v.419, n.6907, p.583-586, 2002.

WOLTJEN, K.; MICHAEL, I.P.; MOHSENI, P.; DESAI, R.; MILEIKOVSKY, M.; HANAMAILA INEN, R.; COWLING, R.; WANG, W.; LIU, P.; GERTSENSTEIN, M.; KAJI, K.; SUNG, H.K.; NAGY, A. PiggyBac transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells. **Nature**, v.458, p.766-770, 2009.

XU, C.; ROSLER, E.; JIANG, J.; LEBKOWSKI, J.S.; GOLD, J.D.; O'SULLIVAN, C.; DELAVAN-BOORSMA, K.; MOK, M.; BRONSTEIN, A.; CARPENTER, M.K. Basic fibroblast growth factor supports undifferentiated human embryonic stem cell growth without conditioned medium. **Stem Cells**, v.23, n.3, p.315-323, 2005.

YAMANAKA, S. Ekiden to iPS Cells. **Nature Medicine**, v.15, n.10, p.1145-1148, 2009.

YAMANAKA, S.; BLAU, H.M. Nuclear reprogramming to a pluripotent state by three approaches. **Nature**, v.465, p.704-712, 2010.

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

YIN, X.J.; KATO, Y.; TSUNODA, Y. Effect of enucleation procedures and maturation conditions on the development of nuclear-transferred rabbit oocytes receiving male fibroblast cells. **Reproduction**, v.124, n.1, p.41-47, 2002.

YING, Q.L.; NICHOLS, J.; EVANS, E.P.; SMITH, A.G. Changing potency by spontaneous fusion. **Nature**, v.416, n.6880, p.545-548, 2002.

YING, Q.L.; WRAY, J.; NICHOLS, J.; BATTLE-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.; HE, P.; SLUKVIN, I.I.; THOMSON, J.A. Human embryonic stem cells reprogram myeloid precursors following cell-cell fusion. **Stem Cells**, v.24, n.1, p.168-176, 2006.

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, I.I.; THOMSON, J.A. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. **Science**, v.318, p.1917-1920, 2007.

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

YUAN, X.; WAN, H.; ZHAO, X.; ZHU, S.; ZHOU, Q.; DING, S. Combined Chemical Treatment Enables Oct4-Induced Reprogramming from Mouse Embryonic Fibroblasts. **Stem Cells**, *no prelo*, 2011.

ZHANG, Y.L.; CHEN, T.; JIANG, Y.; ZHONG, Z.S.; LIU, S.Z.; HOU, Y.; SCHATTEN, H.; CHEN, D.Y.; SUN, Q.Y. Active demethylation of individual genes in intracytoplasmic sperm injection rabbit embryos. **Molecular Reproduction and Development**, v.72, n.4, p.530-533, 2005.

ZHANG, G.; SUN, Q.Y.; CHEN, D.Y. Effects of sucrose treatment on the development of mouse nuclear transfer embryos with morula blastomeres as donors. **Zygote**, v.16, n.1, p.15-19, 2008.

ZHOU, Q.; RENARD, J.P.; FRIEC, G.L.; BROCHARD, V.; BEAUJEAN, N.; CHERIFI, Y.; FRAICHARD, A.; COZZI, J. Generation of fertile cloned rats by regulating oocyte activation. **Science**, v.302, p.1179, 2003.

ZHOU, H.; WU, S.; JOO, J.Y.; ZHU, S.; HAN, D.W.; LIN, T.; TRAUGER, S.; BIEN, G.; YAO, S.; ZHU, Y.; SIUZDAK, G.; SCHÖLER, H.R.; DUAN, L.; DING, S. Generation of induced pluripotent stem cells using recombinant proteins. **Cell Stem Cell**, v.4, p.381-384, 2009.

ZHU, S.; LI, W.; ZHOU, H. WEI, W.; AMBASUDHAN, R.; LIN, T.; KIM, J.; ZHANG, K.; DING, S. Reprogramming of Human Primary Somatic Cells by OCT4 and Chemical Compounds. **Cell Stem Cell**, v.7, n.6, p.651-655, 2010.

CAPÍTULO 2 - ANÁLISE DA TOXIDADE E APRIMORAMENTO DA ENUCLEAÇÃO QUÍMICA DE OVÓCITOS BOVINOS PELA ACTINOMICINA D

Marcelo Tigre Moura^(1,2), Carolina Madeira Lucci⁽¹⁾, e Rodolfo Rumpf^(1,2,3)

⁽¹⁾ Universidade de Brasília (UnB), Brasília, DF.

⁽²⁾ Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF.

⁽³⁾ Geneal Biotecnologia Animal, Uberaba, MG.

RESUMO

A clonagem por transferência nuclear (TN) permitiu testar a hipótese da equivalência genômica entre as células dos animais. A técnica hoje possui diversas aplicações que extrapolam o âmbito científico: replicação de genomas, conservação de recursos genéticos, produção de animais transgênicos e isolamento de células-tronco imuno-compatíveis. No entanto, a técnica permanece pouco eficiente devido a fatores técnicos e biológicos. A remoção dos cromossomos do ovócito ou enucleação representa um dos principais fatores técnicos que tornam o processo laborioso. Por isso diversas alternativas foram descritas e têm sido continuamente aprimoradas. No entanto, nenhuma metodologia alternativa é amplamente utilizada. Recentemente foi descrita uma nova alternativa de enucleação química de ovócitos baseada no antibiótico actinomicina D, um inibidor irreversível de transcrição e replicação de DNA. Foi demonstrado que ovócitos tratados possuem baixa capacidade de desenvolvimento após a ativação partenogenética e que esta pode ser revertida pela introdução de uma célula somática por meio da TN. Apesar disso, o tratamento apresenta toxicidade, havia a necessidade de exposição dos gametas por longos períodos a actinomicina D, mas observava-se a formação de alguns blastocistos após o tratamento. O objetivo do presente trabalho foi desenvolver uma nova versão do protocolo de enucleação de ovócitos pela actinomicina D que contorne estas limitações. Utilizando duas estratégias diferentes foi possível comprovar que a toxicidade do tratamento era mediada pelas células do *cumulus*. Aumentando a concentração de actinomicina D, tratamento de gametas desnudos, e redução do período de exposição foi possível obter uma estratégia que não afeta a maturação *in vitro* e impede completamente o desenvolvimento embrionário partenogenético. Os resultados demonstram o potencial da actinomicina D para enucleação de ovócitos e a necessidade de considerar possíveis efeitos indiretos do tratamento com o inibidor ao realizar experimentos baseados em cultivos *in vitro* contendo múltiplos tipos celulares.

Palavras chave: Transferência nuclear, enucleação funcional, clonagem animal, células do *cumulus*.

ANALYSIS OF TOXICITY AND IMPROVEMENT OF CHEMICAL ENUCLEATION OF BOVINE OOCYTES BY ACTINOMYCIN D

Marcelo Tigre Moura^(1,2), Carolina Madeira Lucci⁽¹⁾, e Rodolfo Rumpf^(1,2,3)

⁽¹⁾ Universidade de Brasília (UnB), Brasília, DF.

⁽²⁾ Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF.

⁽³⁾ Geneal Biotecnologia Animal, Uberaba, MG.

ABSTRACT

Cloning by nuclear transfer (NT) allowed testing the hypothesis that most animal cells maintain the same genetic content during development. The technique is now applied in a wide array of applications: replication of genomes, conservation of genetic resources, production of transgenic animals and genetically matched embryonic stem cells. However, the technology holds a low efficiency due to technical and biological factors. The removal of oocyte's chromosomes, also known as enucleation represents one of the major limiting technical issues of NT. Due to this fact, different alternative enucleation methods have been described and constantly improved. However, none of these approaches is widely used. An alternative chemical oocyte enucleation strategy was recently described that is based on the antibiotic actinomycin D, known as an irreversible transcription and DNA replication inhibitor. It was demonstrated that treated oocytes possess a low developmental capacity after parthenogenetic activation, but embryogenesis can be recovered by the introduction of a somatic cell by NT. However, a toxic effect by actinomycin D on oocyte function was observed, there was a need to expose oocytes to actinomycin D for long periods of time and residual embryo formation following parthenogenetic activation was observed. The objective of the present work was to develop a new version of the oocyte enucleation protocol by actinomycin D that overcomes these outlined limitations. By applying two different strategies, it was possible to demonstrate that the toxic effect by actinomycin D treatment on oocytes was mediated by the *cumulus* cells. Higher actinomycin D concentration, treatment of denuded gametes, and reduction in time of exposure was sufficient to establish a strategy that does not affect oocyte *in vitro* maturation and completely blocks embryonic development. These results highlight the potential of actinomycin D enucleation and the need to consider possible indirect effects by actinomycin D treatment when performing experiments based on *in vitro* co-culture of multiple different cell types.

Keywords: Nuclear transfer, functional enucleation, animal cloning, *cumulus* cells.

2.1. INTRODUÇÃO

A clonagem por transferência nuclear (TN) com células somáticas foi inicialmente descrita para investigar se havia equivalência genômica entre as células dos animais (BRIGGS & KING, 1952; GURDON et al., 1958; WILMUT et al., 1997; GURDON & BYRNE, 2003; HOCHEDLINGER & JAENISCH, 2006; GURDON & MELTON, 2008). Posteriormente a TN se tornou uma importante ferramenta para produção de animais transgênicos, replicação de genomas, produção de células imuno-compatíveis e para investigação de diversos fenômenos biológicos (SCHNIEKE et al., 1997; WELLS et al., 1998; WESTHUSIN et al., 2001; RIDEOUT et al., 2002; BARBERI et al., 2003; HOCHEDLINGER et al., 2004; LI et al., 2004a; KUROIWA et al., 2009; KIRAK et al., 2010).

Apesar do potencial científico e comercial da tecnologia, ela apresenta limitações nos âmbitos biológico e técnico (MEISSNER & JAENISCH, 2006; EGLI et al., 2008). Durante o processo de reprogramação nuclear que ocorre após a introdução do núcleo doador no ovócito enucleado, o gameta é remodelado para estabelecer um padrão epigenético semelhante ao zigoto. Esse processo permite, de forma coordenada, o correto silenciamento dos genes tecido-específicos da célula somática e ativação coordenada dos genes expressos durante o desenvolvimento embrionário e fetal. No entanto, diversas evidências sugerem que o evento é pouco eficiente e conseqüentemente, resulta em baixas taxas de nascimento e reduzida viabilidade neonatal (WILMUT et al., 2002; YANG et al., 2007; STADTFELD & HOCHEDLINGER, 2010). O melhor entendimento do processo de reprogramação epigenética poderá contribuir para o aperfeiçoamento da tecnologia de clonagem animal. No entanto, a oferta exígua de material biológico que pode ser obtida pela TN limita as investigações em nível molecular (HOCHEDLINGER & JAENISCH, 2006; STADTFELD & HOCHEDLINGER, 2010). A simplificação da técnica de TN pode aumentar a oferta deste tipo de material.

A TN é um procedimento reconhecidamente laborioso e a necessidade de equipamentos sofisticados para sua execução são fatores que limitam a difusão da tecnologia (MCGRATH & SOLTER, 1983, 1984; WILLADSEN, 1986; SOLTER, 2000). A enucleação ou remoção dos cromossomos do ovócito é uma etapa importante no procedimento e seu desenvolvimento foi fundamental para investigar a capacidade de desenvolvimento de embriões oriundos de TN em mamíferos (MCGRATH & SOLTER, 1983, 1984; SOLTER, 2000). Além disso, a enucleação de ovócitos de primatas tem sido considerada um fator limitante para o desenvolvimento da clonagem nestas espécies, por remover proteínas importantes para formação do fuso mitótico do embrião reconstruído (SIMERLY et al., 2003; NG et al., 2004).

Com o intuito de facilitar a realização da clonagem e evitar estas limitações, diferentes metodologias alternativas de enucleação foram desenvolvidas (FULKA et al., 2004; LI et al., 2004b; FULKA & FULKA, 2007; MOURA, 2007a,b). As abordagens alternativas para enucleação de ovócitos são: etoposídeo com ciclohexamida (FULKA & MOOR, 1993; ELSHEIKH et al., 1997; SAVARD et al., 2004), centrifugação de gradiente (TATHAM et al., 1995; SAVARD et al., 2004), enucleação de ovócitos em telófase II (BORDIGNON & SMITH, 1998; BORDIGNON et al., 2003), radiação X (WAKAMATSU et al., 2001; KIM et al., 2004), radiação UV (GASARYAN et al., 1979; BRADSHAW et al., 1995; CHAN & GURDON, 1996; WAGONER et al., 1996; BORDIGNON & SMITH, 1999; GURDON, 2006), demecolcina (BAGUISI & OVERSTRÖM, 2000; GASPARRINI et al., 2003; IBAÑEZ et al., 2003), e exposição a laser (KARMENYAN et al., 2009; KUETEMEYER et al., 2010). Apesar do extenso número de investigações, estas estratégias falharam em enuclear com alta eficiência ou em manter a viabilidade citoplasmática do gameta. Variações da enucleação mecânica também foram descritas, como o método “squeeze” e a identificação da placa metafásica do gameta por sistemas sofisticados de microscopia, como o Oosight™ (LIU et al., 2000; SIMERLY et al., 2004; BYRNE et al., 2007; LI et al., 2009). No entanto, o benefício da utilização dessas modificações é questionável.

Devido a baixa eficiência das metodologias alternativas de enucleação, essas tem sido associadas ao método tradicional de enucleação para aumentar a precisão da remoção dos cromossomos do ovócito por micropipeta (HAYES et al., 2001; WANG et al., 2001; KAWAKAMI et al., 2003; TANI et al., 2006; HUA et al., 2007; ZHANG et al., 2008; COSTA-BORGES et al., 2009; SARAIVA *et al.*, 2009). A utilização da demecolcina, nocodazole, sacarose, ou combinações das mesmas induz a formação de protusões

citoplasmáticas que permitem, com grande confiabilidade, remover o DNA do gameta dispensando o uso da radiação UV e seus malefícios (SMITH, 1993; DOMINKO et al., 2000; LIU et al., 2002; KAWAKAMI et al., 2003; TANI et al., 2006). No entanto, os métodos assistidos de enucleação não dispensam o uso de micromanipuladores para a remoção dos cromossomos dos gametas.

Recentemente foi demonstrado que ovócitos maturados *in vitro* na presença da actinomicina D, um antibiótico que inibe a transcrição e replicação de DNA (GOLDBERG et al., 1962; COOPER & BRAVEMAN, 1977; SOBELL, 1985; TRASK & MULLER, 1988; MOURA, 2007a,b), impede o desenvolvimento embrionário bovino após a ativação partenogenética (MOURA et al., 2008). Mais importante, os ovócitos tratados com actinomicina D foram capazes de formar blastocistos após a TN com porcentagem similar de células apoptóticas aos controles de TN não tratados (MOURA et al., 2008).

Apesar do potencial da actinomicina D para enucleação química de ovócitos, algumas limitações foram observadas. Como a metodologia foi baseada em resultados experimentais com cultivos celulares (HIKAWA & TAKENAKA, 1996, 1997; BAYONA-BAFALUY et al., 2003, 2005), a melhor condição de tratamento para ovócitos foi obtida com uma concentração baixa ($1\mu\text{g mL}^{-1}$) por um período relativamente logo (14 horas). No entanto, a necessidade de incubar os gametas por um longo período com o inibidor impossibilita que o procedimento seja empregado em ovócitos maturados *in vivo*. Além disso, foi observada a toxidez do tratamento aferida pela maturação nuclear dos gametas, que foi cerca de 10% inferior aos controles (MOURA et al., 2008). Outra indicação da necessidade de aperfeiçoar o tratamento foi a formação de blastocistos partenogenéticos após o tratamento com actinomicina D (MOURA et al., 2008).

O objetivo do presente trabalho foi aprimorar o procedimento pela eliminação do efeito tóxico da actinomicina D na maturação dos ovócitos e desenvolver uma combinação de concentração e tempo de exposição que permita inibir completamente o desenvolvimento embrionário partenogenético.

2.2. MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1. Coleta dos ovários e seleção dos ovócitos

Ovários foram coletados em abatedouros na região do entorno de Brasília/DF. Após a coleta foram transportados em solução fisiológica (NaCl 0,9%) ou em *phosphate buffered saline* (PBS) a uma temperatura de 35°C para o laboratório. Os ovócitos foram recuperados dos folículos ovarianos através de um sistema de bomba a vácuo utilizando escalpes de 19G acoplados a tubos cônicos de 15mL. Esses eram mantidos parcialmente imersos em banho maria com temperatura de 35°C por pelo menos dez minutos, para haver a sedimentação do material aspirado. Apenas folículos com diâmetro entre dois e oito milímetros foram aspirados. O *pellet* de cada tubo era diluído em meio de lavagem (LAV), composto por TCM-199 Hank's ou PBS suplementados com 10% de soro fetal bovino (SFB - Gibco®), 10UI mL⁻¹ de penicilina (Sigma®) e 50µg mL⁻¹ de estreptomicina (Sigma®). A procura dos ovócitos foi feita em placa de *petri* de 100mm, sob estereomicroscópio (ZEISS® - Stemi SV6). Após a recuperação, os ovócitos foram selecionados e apenas os complexos *cumulus*-ovócito (CCO) que apresentavam três ou mais camadas de células do *cumulus* e citoplasma homogêneo foram submetidos à maturação *in vitro* (MIV).

2.2.2. Maturação *in vitro* dos ovócitos

Os CCOs selecionados eram imediatamente lavados em meio para MIV. A maturação era feita em placa de 35mm contendo 2,0-3,0 mL de meio MIV (>7µL por ovócito) coberto com óleo mineral (Sigma®). O meio de maturação era composto de TCM-199 com sais de Earle's suplementado com 10% de SFB, 2mM L-glutamina, 0,01UI mL⁻¹ Hormônio Folículo Estimulante (FSH), 24UI mL⁻¹ Hormônio Luteinizante (LH), 100UI mL⁻¹ de penicilina e 50µg mL⁻¹ de estreptomicina, era estabilizado por duas horas em incubadora a 39°C e 5% de dióxido de carbono (CO₂) em ar, onde era realizada a maturação dos ovócitos.

2.2.3. Tratamento com actinomicina D

O agente utilizado como inibidor irreversível da transcrição e replicação foi a actinomicina D (Fluka®). Baseando-se no relato anterior utilizando o reagente para ovócitos (MOURA et al., 2008), nos dois primeiros experimentos foram utilizados os seguintes tratamentos: controle (sem exposição ao reagente) e tratado com $1\mu\text{g ml}^{-1}$ por 14h. Os grupos tratados por 14h tiveram o período de exposição da 6-20h de MIV. Após 20h de MIV, todos os grupos foram lavados em meio para MIV e permaneceram na incubadora até serem desnudados. Nos experimentos seguintes, diversos tratamentos com concentrações de actinomicina D e tempo de exposição diferentes foram testados. Os experimentos estão descritos em detalhe na seção delineamento experimental.

2.2.4. Tratamento com α -amanitina

O inibidor de transcrição utilizado foi a α -amanitina, que interfere na atividade da RNA polimerase II (TATEMOTO & TERADA, 1995). Os ovócitos eram retirados do meio MIV após três horas de maturação, lavados em meio contendo $50\mu\text{g ml}^{-1}$ de α -amanitina e incubados por 17h ou lavados ou incubados com meio contendo $1\mu\text{g ml}^{-1}$ de actinomicina D e $50\mu\text{g ml}^{-1}$ de α -amanitina até 20h de MIV. Ao completar 24h de MIV, todos os grupos eram desnudados. Como controle, um grupo foi tratado apenas com actinomicina D (6-20h de MIV).

2.2.5. Desnudação de ovócitos e quantificação da maturação

Após a maturação, os ovócitos eram desnudados utilizando uma solução a 0,2% de hialuronidase (Sigma®) por cinco minutos. Os CCOs eram imediatamente transferidos para outra gota do mesmo reagente e submetidos à pipetagem pelo mesmo período. Posteriormente, mais cinco minutos de pipetagem em LAV. Após a remoção das células do *cumulus*, os gametas retornavam para o meio MIV até completar 24h de maturação ou eram distribuídos entre os diversos tratamentos. Os ovócitos que se apresentavam degenerados após a desnudação eram descartados. Com 24h de maturação, os ovócitos eram avaliados quanto à

presença do primeiro corpúsculo polar (CP) sob estereomicroscópio (ZEISS® - Stemi SV11) e classificados como em metáfase II (MII) ou imaturos (sem CP).

2.2.6. Ativação partenogenética dos ovócitos

Todos os ovócitos eram submetidos à ativação partenogenética utilizando 5µM de *ionomycin* (Sigma®) por cinco minutos em meio para cultivo de embriões (MOURA et al., 2008). Este era composto por meio *synthetic oviductual fluid* (SOF) suplementado com aminoácidos essenciais, citrato de sódio, mio-inositol e 5% de SFB (SOFaaci), como descrito anteriormente (HOLM et al., 1999). Para completar a ativação, os ovócitos eram posteriormente lavados em SOFaaci e imediatamente cultivados em 2mM de 6-*dimethylaminopurine* (6DMAP - Sigma®) em SOFaaci por 4-5 horas. Após o 6DMAP, os ovócitos eram lavados em SOFaaci e cultivados por até oito dias em incubadora a 39°C e 5% de CO₂ em ar.

2.2.7. Cultivo *in vitro* dos embriões

No dia do início da maturação dos ovócitos, antes da chegada dos ovários, placas de 60 mm eram preparadas para o cultivo dos embriões com quatro gotas de 200µl cada de SOFaaci e cobertas com óleo mineral (Sigma®), e estabilizadas na incubadora de CO₂ por pelo menos duas horas (MOURA, 2007a).

Após a seleção dos ovócitos destinados à MIV, um grupo de aproximadamente vinte ovócitos descartado era desnudado por pipetagem em LAV por cerca de um minuto. Em seguida, os ovócitos eram retirados da gota e o meio contendo as células era depositado em um microtubo. Esse era centrifugado por cinco minutos a 200xg, o sobrenadante removido, e o *pellet* era resuspendido com 200µl de SOFaaci. Posteriormente, 7µl da solução era depositada em cada gota da placa de cultivo.

No dia seguinte, logo após o início do cultivo dos gametas ou ovócitos reconstruídos com 6DMAP, era feita a troca de todo o meio das gotas das placas de cultivo, permitindo a remoção de células que não se fixaram ao fundo da placa. Após a incubação dos prováveis zigotos na solução com 6DMAP, os mesmos eram lavados cinco vezes em meio SOFaaci, colocados nas gotas da placa de cultivo e retornavam a incubadora. Os embriões eram

avaliados quanto ao seu desenvolvimento após 48 horas (clivagem), e blastocistos: 168 horas (D7) e 192 horas (D8).

2.2.8. Análise estatística

Os dados referentes às taxas de maturação, clivagem e blastocisto foram analisados pelo teste do Qui-quadrado (χ^2). O nível de significância considerado foi $P < 0,05$.

2.2.9. Delineamento experimental

Experimento 1: Efeito das células do *cumulus* na toxicidade da actinomicina D durante a maturação *in vitro* de ovócitos bovinos.

O objetivo do experimento foi avaliar a participação das células do *cumulus* na MIV de ovócitos bovinos. Foi definido em experimentos anteriores, que o melhor tratamento para enucleação era a incubação com $1\mu\text{g mL}^{-1}$ de actinomicina D por 14h, sendo iniciado o tratamento na sexta hora de maturação até a vigésima hora de MIV. Com o intuito de avaliar o efeito das células, metade dos ovócitos foi desnudada após cinco horas do início da maturação.

Os gametas retornaram ao meio de maturação e, quando completaram seis horas do início da MIV, os ovócitos foram distribuídos nos quatro grupos, configurando um experimento fatorial 2x2: grupo G0 (controle não tratado e desnudados com 20h de MIV), grupo G0D (controle não tratado e desnudado com 5h de MIV), grupo G1-14 (tratado com $1\mu\text{g mL}^{-1}$ de actinomicina D por 14 h e desnudados com 20h de MIV) e grupo G1-14D (tratado com $1\mu\text{g mL}^{-1}$ de actinomicina D por 14 h e desnudo com 5h de MIV). O delineamento do experimento está ilustrado abaixo (Figura 2.1). Todos os ovócitos foram avaliados quanto à presença do primeiro CP ao completar 24h de MIV, e eram submetidos à ativação partenogênética para aferir o desenvolvimento embrionário após os tratamentos.

Experimento 2: Avaliação do efeito da transcrição das células do *cumulus* na toxicidade da actinomicina D durante a maturação *in vitro* de ovócitos bovinos.

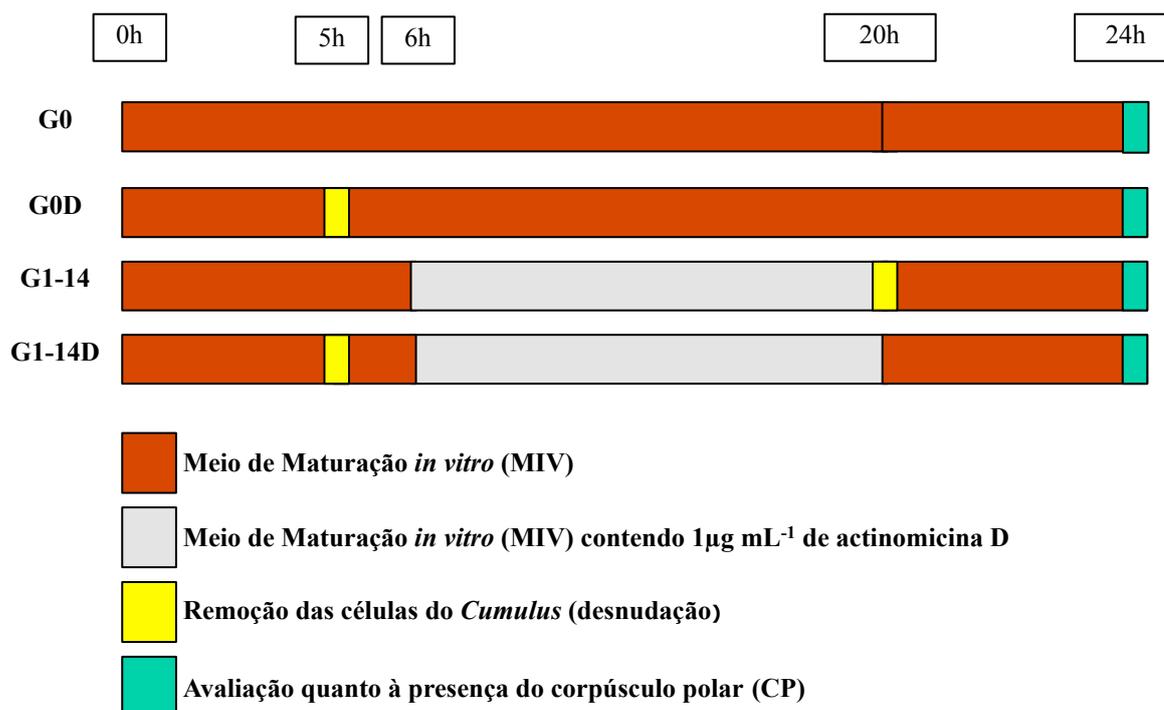


Figura 2.1 - Esquema dos grupos experimentais para avaliar o efeito das células do *cumulus* na toxicidade da actinomicina D durante a maturação *in vitro* de ovócitos bovinos.

O segundo experimento teve como objetivo confirmar os resultados do primeiro, bem como investigar se as células do *cumulus* respondem à presença da actinomicina D por um mecanismo dependente de transcrição. Seguindo o modelo experimental fatorial 2x2, metade dos ovócitos foi maturado na presença do inibidor de transcrição α -amanitina a partir da terceira hora de MIV até 20h. Após 6h de maturação (ou 3h com o inibidor de transcrição), metade dos ovócitos tratados e não tratados foram maturados na presença de 1µg mL⁻¹ de actinomicina D por 14 horas (Figura 2.2). O tratamento com α -amanitina foi realizado utilizando a concentração de 50µg mL⁻¹, como descrito anteriormente (TATEMOTO & TERADA, 1995). Todos os ovócitos foram submetidos à ativação partenogênica para aferir o desenvolvimento embrionário após os tratamentos. Os grupos foram: G0: ovócitos sem tratamento (controle); G0+ α : ovócitos tratados com 50µg mL⁻¹ de α -amanitina da 3-20h de MIV; G1-14: ovócitos tratados com 1µg mL⁻¹ de actinomicina D da 6-20h de MIV; G1-14+ α : ovócitos tratados com 50µg mL⁻¹ de α -amanitina da 3-6h e com 1µg mL⁻¹ de actinomicina D e 50µg mL⁻¹ de α -amanitina da 6-20h de MIV.

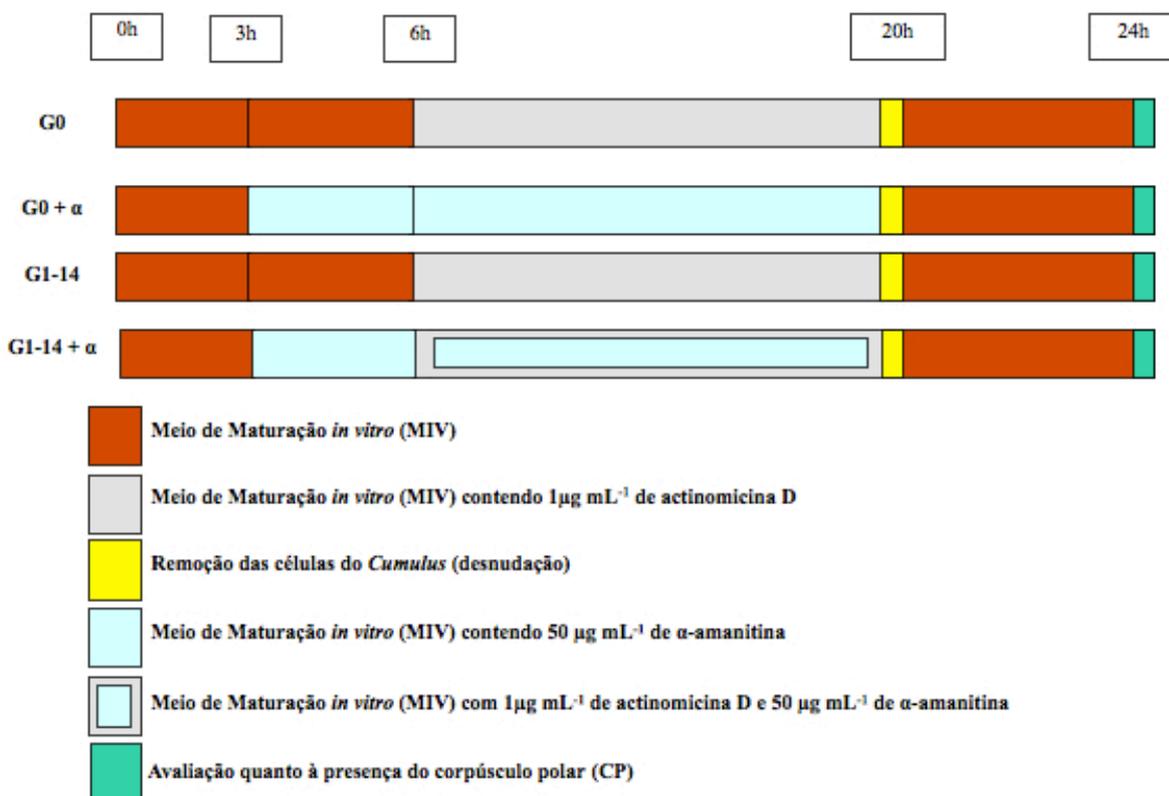


Figura 2.2 - Esquema dos grupos experimentais para avaliar o efeito da transcrição das células do *cumulus* na toxicidade da actinomicina D durante a maturação *in vitro* de ovócitos bovinos.

Experimento 3: Avaliação de diferentes concentrações de actinomicina D por duas horas no bloqueio do desenvolvimento partenogenético.

O objetivo do experimento foi testar concentrações mais altas de actinomicina D para reduzir o período de tratamento. Além do controle do sistema *in vitro*, o grupo G0 (controle da ativação partenogenética e produção *in vitro*), o grupo G1-14 (1 µg mL⁻¹ por 14h) foi utilizado como controle positivo do tratamento com actinomicina D. Foram testadas cinco concentrações diferentes de actinomicina D: 5, 10, 15 e 20 µg mL⁻¹.

Todos os tratamentos terminaram ao completar 20h de MIV. Em seguida, todos os grupos eram desnudados e avaliados quanto à presença do CP com 24h de MIV. A ativação partenogenética de todos os ovócitos foi aplicada para avaliar a capacidade de desenvolvimento dos ovócitos após os diversos tratamentos.

Experimento 4: Avaliação do desenvolvimento embrionário partenogênético bovino a partir de ovócitos tratados com $5\mu\text{g mL}^{-1}$ actinomicina D por períodos de exposição inferiores a duas horas.

Com o intuito de investigar a possibilidade de usar tratamentos com actinomicina D por períodos ainda mais curtos, a concentração de $5\mu\text{g mL}^{-1}$ foi mantida. Foram testados os períodos de 1,0h, 1,5h e 2,0h. O último serviu como controle positivo. Como controle negativo, parte dos ovócitos foi exposta apenas ao veículo (DMSO). A ativação partenogênética de todos os ovócitos foi aplicada para avaliar a capacidade de desenvolvimento dos ovócitos após os diversos tratamentos.

Experimento 5: Avaliação do tratamento com $5\mu\text{g mL}^{-1}$ de actinomicina D por períodos inferiores a uma hora no desenvolvimento embrionário partenogênético bovino.

Como todos os tratamentos do experimento 4 impediram completamente a formação de blastocistos, a prospecção de tratamentos mais curtos prosseguiu. Nesta série de réplicas foram testados os seguintes períodos além do controle: quinze minutos (0,25h), trinta minutos (0,5h) e uma hora (controle positivo).

Experimento 6: Avaliação de diferentes concentrações de actinomicina D por quinze minutos no desenvolvimento embrionário partenogênético bovino.

No último ensaio de aperfeiçoamento do protocolo de enucleação com actinomicina D, a busca foi focada na melhor concentração sobre o período de quinze minutos de tratamento. Foram testadas as seguintes concentrações: 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; $5,0\mu\text{g mL}^{-1}$ de actinomicina D. O último grupo serviu como controle positivo. O controle negativo consistiu em ovócitos tratados apenas com o veículo (DMSO).

2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Uma das limitações observadas no primeiro relato de enucleação de ovócitos pela actinomicina D foi a toxicidade do tratamento na MIV mensurada quanto à extrusão do primeiro CP (MOURA et al., 2008). Com o objetivo de investigar a influência das células do *cumulus* nesse efeito tóxico, parte dos ovócitos foi desnudada antes da exposição à actinomicina D. Como controle, a desnudação após cinco horas de MIV não afetou a maturação nuclear dos ovócitos (Tabela 2.1). Isso condiz com as evidências de que as células são necessárias apenas nas três primeiras horas de maturação para extrusão do CP (KASTROP et al., 1991; MATTIOLI et al., 1991). Como relatado, a exposição à actinomicina D nas condições descritas anteriormente reduz em cerca de 10%, o percentual de ovócitos com CP (Tabela 2.1). Mais importante, a remoção das células do *cumulus* antes da exposição à actinomicina D reverteu o efeito tóxico do inibidor. Outros autores também não observaram efeito tóxico sobre gametas desnudos, mesmo sob a concentração de $50\mu\text{g mL}^{-1}$ de actinomicina D (GRONDAHL et al., 2000).

A estratégia de remover as células do *cumulus* antes da MIV melhorou a maturação nuclear e reduziu o percentual de estruturas tratadas que clivaram após a ativação partenogénica (Tabela 2.1). Como esperado, não houve diferença na taxa de clivagem entre os grupos que não foram tratados. Essa última observação não foi confirmada na produção de blastocistos. O grupo G0D produziu cerca de 50% menos embriões que o controle desnudado após 20h de MIV. Também foi detectada a redução na produção de embriões após a desnudação seguida do tratamento com a actinomicina D (Tabela 2.1). A redução do desenvolvimento embrionário devido à antecipação da desnudação foi relatada anteriormente, onde também foram identificadas alterações no fuso meiótico destes ovócitos (LI et al., 2006).

Com o objetivo de confirmar os resultados acima e melhor elucidar o processo, outra abordagem foi usada para investigar a participação das células do *cumulus* na toxidez do tratamento com actinomicina D. Ao utilizar a α -amanitina, um inibidor reversível da RNA polimerase II (TATEMOTO & TERADA, 1995), foi possível investigar a influência da transcrição das células do *cumulus* na toxicidade. Como os ovócitos obtidos para a produção de

embriões são recuperados de folículos antrais, incapazes de realizar transcrição (ANDREU-VIEYRA et al., 2006; KOCABAS et al., 2006), seria possível aferir o efeito apenas das células somáticas na toxicidade do tratamento com actinomicina D sobre a MIV dos gametas.

Tabela 2.1 - Efeito das células do *cumulus* na toxicidade da actinomicina D durante a maturação *in vitro* de ovócitos bovinos.

Tratamento	MII (%)	Clivagem (%)	Blastocisto (%)	
			D7	D8
G0	241/300 (80,33) ^a	188/298 (63,08) ^a	89/298 (29,86) ^a	112/298 (37,58) ^a
G0D	209/263 (79,46) ^a	172/263 (65,39) ^a	36/263 (13,68) ^b	55/263 (20,91) ^b
G1-14	206/297 (69,36) ^b	136/296 (45,94) ^b	4/296 (01,35) ^c	5/296 (01,68) ^c
G1-14D	211/272 (77,57) ^a	78/272 (28,67) ^c	0/272 (00,00) ^c	0/272 (00,00) ^d

Sete réplicas. MII: Ovócitos com o primeiro corpúsculo polar após vinte e quatro horas de maturação *in vitro*. Clivagem: embriões contendo duas ou mais células após 48 de ativação. D7/D8: Blastocistos após sete e oito dias de cultivo *in vitro*, respectivamente. G0: ovócitos sem tratamento (controle); G0+ α : ovócitos tratados com 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de α -amanitina da 3-20h de MIV; G1-14: ovócitos tratados com 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de actinomicina D da 6-20h de MIV; G1-14+ α : ovócitos tratados com 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de α -amanitina da 3-6h e com 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de actinomicina D e 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de α -amanitina da 6-20h de MIV. Diferentes sobrescritos (a,b,c,d) na coluna diferem significativamente ($p < 0,05$).

O tratamento utilizado para inibir a transcrição das células do *cumulus* não afetou a maturação avaliada novamente pela presença do primeiro CP, validando o experimento (Tabela 2.2). O bloqueio da transcrição foi capaz entretanto de reverter a toxicidade do tratamento com a actinomicina D, igualando o grupo tratado sem transcrição (G1-14+ α) aos controles não tratados (G0, G0+ α).

Apesar dos avanços na elucidação da origem da toxicidade sobre a maturação dos gametas, o método de investigação mais uma vez afetou o desenvolvimento embrionário partenogenético (Tabela 2.2). Curiosamente os quatro grupos não diferiram na taxa de clivagem. O grupo G0+ α apresentou uma redução muito intensa na formação de blastocistos, o que revela um efeito negativo da α -amanitina após a ativação partenogenética sobre o

desenvolvimento embrionário (Tabela 2.2). Devido a esse fato, descarta-se a hipótese de que o tratamento com a actinomicina D e a α -amanitina sinergizam na enucleação de ovócitos.

Tabela 2.2 - Efeito da transcrição das células do *cumulus* na toxicidade da actinomicina D durante a maturação *in vitro* de ovócitos bovinos.

Tratamento	MII (%)	Clivagem (%)	Blastocisto (%)	
			D7	D8
G0	155/191 (81,15) ^a	121/191 (63,35) ^a	57/191 (29,84) ^a	71/191 (37,17) ^a
G0 (+ α)	171/210 (81,42) ^a	125/210 (59,52) ^a	1/210 (00,47) ^{b,c}	1/210 (00,47) ^{b,c}
G1-14	146/206 (70,87) ^b	122/206 (59,22) ^a	5/206 (02,42) ^b	6/206 (02,91) ^b
G1-14 (+ α)	175/208 (84,13) ^a	120/208 (57,69) ^a	0/208 (00,00) ^c	0/208 (00,00) ^c

Quatro réplicas. MII: Ovócitos com o primeiro corpúsculo polar após vinte e quatro horas de maturação *in vitro*. Clivagem: embriões contendo duas ou mais células após 48 de ativação. D7/D8: Blastocistos após sete e oito dias de cultivo *in vitro*, respectivamente. G0: ovócitos sem tratamento (controle); G0 (+ α): ovócitos tratados com 50 μ g mL⁻¹ de α -amanitina da 3-20h de MIV; G1-14: ovócitos tratados com 1 μ g mL⁻¹ de actinomicina D da 6-20h de MIV; G1-14 (+ α): ovócitos tratados com 50 μ g mL⁻¹ de α -amanitina da 3-6h e com 1 μ g mL⁻¹ de actinomicina D e 50 μ g mL⁻¹ de α -amanitina da 6-20h de MIV. Diferentes sobrescritos (a,b,c) na coluna diferem significativamente (p<0,05).

Para tentar desenvolver um protocolo que elimine a toxicidade na MIV e que possivelmente não afete o desenvolvimento embrionário, novos tratamentos com concentrações mais altas de actinomicina D foram testados durante períodos mais curtos de incubação com os gametas. Foi estipulado o período de duas horas de tratamento como ponto inicial de investigação (Tabela 2.3).

Os tratamentos com actinomicina D por duas horas não diferiram do controle não tratado para presença do CP. No entanto, os tratamentos com 10 e 20 μ g mL⁻¹ de actinomicina D também não diferiram do controle positivo (G1-14), que é conhecidamente inferior ao controle não tratado neste quesito (Tabela 2.3).

No tocante a produção de embriões, os novos tratamentos apresentaram menor taxa de clivagem que o controle positivo G1-14. Mais importante, os tratamentos com exposição de duas horas não permitiram a formação de blastocistos (Tabela 2.3). Esse fato é importante pois contrasta com o protocolo desenvolvido para enuclear células somáticas (BAYONA-

BAFALUY et al., 2003). Para estas células, a melhor condição para enucleação foi a concentração de $0,5\mu\text{g mL}^{-1}$ de actinomicina D por 15h, apesar do tratamento não ser eficaz sobre todas as células (BAYONA-BAFALUY et al., 2003).

Posteriormente foram realizados outros experimentos para diminuir o período de tratamento (Tabela 2.4). A concentração final utilizada foi $5\mu\text{g mL}^{-1}$ de actinomicina D, baseada nos dados descritos acima.

Tabela 2.3 - Desenvolvimento embrionário partenogenético bovino após o tratamento de ovócitos com diferentes concentrações de actinomicina D por duas horas.

Tratamento $\mu\text{g mL}^{-1}$ (período)	MII (%)	Clivagem (%)	Blastocisto (%)	
			D7	D8
Controle	248/284 (87,32) ^a	225/284 (79,22) ^a	103/284 (36,26) ^a	126/284 (44,36) ^a
1,0 (14h)	243/296 (82,09) ^b	173/296 (58,44) ^b	7/296 (02,36) ^b	9/296 (03,04) ^b
5,0 (2h)	256/287 (89,19) ^a	136/287 (47,38) ^c	0/287 (00,00) ^c	0/287 (00,00) ^c
10,0 (2h)	252/290 (86,89) ^{a,b}	131/290 (45,17) ^c	0/290 (00,00) ^c	0/290 (00,00) ^c
15,0 (2h)	258/287 (89,89) ^a	125/287 (43,55) ^c	0/287 (00,00) ^c	0/287 (00,00) ^c
20,0 (2h)	247/285 (86,66) ^{a,b}	147/285 (51,57) ^{b,c}	0/285 (00,00) ^c	0/285 (00,00) ^c

Cinco réplicas. MII: Ovócitos com o primeiro corpúsculo polar após vinte e quatro horas de maturação *in vitro*. Clivagem: embriões contendo duas ou mais células após 48 de ativação. D7/D8: Blastocistos após sete e oito dias de cultivo *in vitro*, respectivamente. Diferentes sobrescritos (a,b,c) na coluna diferem significativamente ($p < 0,05$).

Os resultados comprovaram que os novos períodos de tratamento não tiveram efeito na maturação nuclear dos ovócitos (Tabela 2.4). A taxa de clivagem foi semelhante entre os grupos tratados com actinomicina D e inferiores ao controle não tratado como descrito anteriormente (BELLIER et al., 1997; CHANDOLIA et al., 1999; MOURA et al., 2008). Em relação ao desenvolvimento embrionário posterior, não houve formação de blastocisto nos grupos tratados com o inibidor (Tabela 2.4). Então buscou-se reduzir mais o período de tratamento com actinomicina D (Tabela 2.5). Desta vez foram testados períodos inferiores a 1h de tratamento com a actinomicina D utilizando a concentração de $5\mu\text{g mL}^{-1}$ de

actinomicina D. Os novos tratamentos de actinomicina D não interferiram na maturação, mas na clivagem. O tratamento com $5\mu\text{g mL}^{-1}$ de actinomicina D por 1,0h clivou menos que o tratado por 0,5h. No que concerne à produção de blastocistos, os novos tratamentos com actinomicina D não permitiram a formação deste tipo de estrutura (Tabela 2.5).

Tabela 2.4 - Desenvolvimento embrionário partenogênético após tratamento de ovócitos com $5\mu\text{g mL}^{-1}$ de actinomicina D por diferentes períodos.

Grupos	MII (%)	Clivagem (%)	Blastocisto (%)	
			D7	D8
Controle	220/268 (82,08) ^a	207/268 (77,23) ^a	102/268 (38,05) ^a	116/268 (43,28) ^a
1,0 h	233/287 (81,18) ^a	121/287 (42,16) ^b	0/287 (00,00) ^b	0/287 (00,00) ^b
1,5 h	239/280 (85,35) ^a	113/280 (40,35) ^b	0/280 (00,00) ^b	0/280 (00,00) ^b
2,0 h	222/274 (81,02) ^a	125/274 (45,62) ^b	0/274 (00,00) ^b	0/274 (00,00) ^b

Cinco réplicas. MII: Ovócitos com o primeiro corpúsculo polar após vinte e quatro horas de maturação *in vitro*. Clivagem: embriões contendo duas ou mais células após 48 de ativação. D7/D8: Blastocistos após sete e oito dias de cultivo *in vitro*, respectivamente. Diferentes sobrescritos (a,b) na coluna diferem significativamente ($p<0,05$).

Tabela 2.5 - Desenvolvimento embrionário partenogênético bovino após tratamento de ovócitos durante a maturação *in vitro* com $5\mu\text{g mL}^{-1}$ de actinomicina D por períodos de até uma hora.

Grupos	MII (%)	Clivagem (%)	Blastocisto (%)	
			D7	D8
Controle	162/193 (83,93) ^a	135/192 (70,31) ^a	65/192 (33,85) ^a	81/192 (42,18) ^a
0,25 h	168/195 (86,15) ^a	97/195 (49,74) ^{b,c}	0/195 (00,00) ^b	0/195 (00,00) ^b
0,50 h	159/196 (81,12) ^a	101/196 (51,53) ^b	0/196 (00,00) ^b	0/196 (00,00) ^b
1,00 h	177/202 (87,62) ^a	81/198 (40,90) ^c	0/198 (00,00) ^b	0/198 (00,00) ^b

Três réplicas. MII: Ovócitos com o primeiro corpúsculo polar após vinte e quatro horas de maturação *in vitro*. Clivagem: embriões contendo duas ou mais células após 48 de ativação. D7/D8: Blastocistos após sete e oito dias de cultivo *in vitro*, respectivamente. Diferentes sobrescritos (a,b,c) na coluna diferem significativamente ($p<0,05$).

Em seguida foi iniciada a investigação de menores concentrações de actinomicina D por quinze minutos de tratamento (Tabela 2.6). A nova tentativa de reduzir o tempo de exposição dos ovócitos a actinomicina D não mantiveram o bloqueio no desenvolvimento embrionário partenogénico. Todas as concentrações testadas resultaram em aumento nas taxas de clivagem e blastocisto, de forma proporcional a redução da concentração de actinomicina D (Tabela 2.6).

Tabela 2.6 - Desenvolvimento embrionário partenogénico bovino após tratamento de ovócitos com diferentes concentrações de actinomicina D por quinze minutos.

Tratamento $\mu\text{g mL}^{-1}$	MII (%)	Clivagem (%)	Blastocisto (%)	
			D7	D8
Controle	141/164 (85,97) ^a	140/164 (85,36) ^{a,b}	55/164 (33,53) ^a	71/164 (43,29) ^a
0,5	150/166 (90,36) ^a	146/166 (87,95) ^a	66/166 (39,75) ^a	72/166 (43,37) ^a
1,0	148/169 (87,57) ^a	143/169 (84,61) ^{a,b}	45/169 (26,62) ^a	50/169 (29,58) ^b
1,5	142/158 (89,87) ^a	126/158 (79,74) ^b	16/158 (10,12) ^b	27/158 (17,08) ^c
2,0	148/167 (88,62) ^a	134/167 (80,23) ^{a,b}	10/167 (05,98) ^b	14/167 (08,38) ^d
5,0	136/163 (83,43) ^a	114/163 (69,93) ^c	0/163 (00,00) ^c	1/163 (00,61) ^e

Três réplicas. MII: Ovócitos com o primeiro corpúsculo polar após vinte e quatro horas de maturação *in vitro*. Clivagem: embriões contendo duas ou mais células após 48 de ativação. D7/D8: Blastocistos após sete e oito dias de cultivo *in vitro*, respectivamente. Diferentes sobrescritos (a,b,c) na coluna diferem significativamente ($p < 0,05$).

2.4. CONCLUSÕES

No presente trabalho foi possível determinar que as células do *cumulus* mediam a toxicidade na maturação dos ovócitos bovinos durante a enucleação química pela actinomicina D. Também foi observado que o processo é dependente da transcrição dessas células somáticas. A aplicação de períodos mais curtos de tratamento associada a concentrações mais altas de actinomicina D mostrou ser capaz de aumentar a eficiência da metodologia de enucleação química e eliminar a toxicidade na maturação dos gametas.

2.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDREU-VIEYRA, C.; LIN, Y.N.; MATZUK, M.M. Mining the oocyte transcriptome. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v.17, n.4, p.136-143, 2006.

BAGUISI, A.; OVERSTRÖM, E.W. Induced enucleation in nuclear transfer procedures to produce cloned animals. **Theriogenology**, v.54, p.209, 2000.

BARBERI, T.; KLIVENYI, P.; CALINGASAN, N.Y.; LEE, H.; KAWAMATA, H.; LOONAM, K.; PERRIER, A.L.; BRUSES, J.; RUBIO, M.E.; TOPE, N.; TABAR, V.; HARRISON, N.L.; BEAL, M.F.; MOORE, M.A.; STUDER, L. Neural subtype specification of fertilization and nuclear transfer embryonic stem cells and application in parkinsonian mice. **Nature Biotechnology**, v.21, n.10, p.1200-1207, 2003.

BAYONA-BAFALUY, M.P.; MANFREDI, G.; MORAES, C.T. A chemical enucleation method for the transfer of mitochondrial DNA to rho(o) cells. **Nucleic Acids Research**, v.31, n.16, p.e98, 2003.

BAYONA-BAFALUY, M.P.; MULLER, S.; MORAES, C.T. Fast adaptive coevolution of nuclear and mitochondrial subunits of ATP synthetase in orangutan. **Molecular Biology and Evolution**, v.22, n.3, p.716-724, 2005.

BELLIER, S.; CHASTANT, S.; ADENOT, P.; VINCENT, M.; RENARD, J.P.; BENSUADE, O. Nuclear translocation and carboxyl-terminal domain phosphorylation of RNA polymerase II delineate the two phases of zygotic gene activation in mammalian embryos. **EMBO Journal**, v.16, n.20, p.6250-6262, 1997.

BORDIGNON, V.; SMITH, L.C. Telophase enucleation: an improved method to prepare recipient cytoplasts for use in bovine nuclear transfer. **Molecular Reproduction and Development**, v.49, n.1, p.29-36, 1998.

BORDIGNON, V.; SMITH, L.C. Ultraviolet-irradiated spermatozoa activate oocytes but arrest preimplantation development after fertilization and nuclear transplantation in cattle. **Biology of Reproduction**, v.61, n.6, p.1513-1520, 1999.

BORDIGNON, V.; KEYSTON, R.; LAZARIS, A.; BILODEAU, A.S.; PONTES, J.H.; ARNOLD, D.; FECTEAU, G.; KEEFER, C.; SMITH, L.C. Transgene expression of green fluorescent protein and germ line transmission in cloned calves derived from in vitro-transfected somatic cells. **Biology of Reproduction**, v.68, n.6, p.2013-2023, 2003.

BRADSHAW, J.; JUNG, T.; FULKA, J. JR.; MOOR, R.M. UV irradiation of chromosomal DNA and its effect upon MPF and meiosis in mammalian oocytes. **Molecular Reproduction and Development**, v.41, n.4, p.503-512, 1995.

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.

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, p.497-502, 2007.

CHAN, A.P.; GURDON, J.B. Nuclear transplantation from stably transfected cultured cells of *Xenopus*. **International Journal of Developmental Biology**, v.40, n.2, p.441-451, 1996.

CHANDOLIA, R.K.; PELTIER, M.R.; TIAN, W.; HANSEN, P.J. Transcriptional control of development, protein synthesis, and heat-induced heat shock protein 70 synthesis in 2-cell bovine embryos. **Biology of Reproduction**, v.61, n.6, p.1644-1648, 1999.

COOPER, H.L.; BRAVERMAN, R. The mechanism by which actinomycin D inhibits protein synthesis in animal cells. **Nature**, v.269, p.527-529, 1977.

COSTA-BORGES, N.; PARAMIO, M.T.; CALDERÓN, G. SANTALÓ, J.; IBÁÑEZ, E. Antimitotic treatments for chemically assisted oocyte enucleation in nuclear transfer procedures. **Cloning and Stem Cells**, v.11, n.1, p.153-166, 2009.

DOMINKO, T.; CHAN, A.; SIMERLY, C.; LUETJENS, C.M.; HEWITSON, L.; MARTINOVICH, C.; SCHATTE, G. Dynamic imaging of the metaphase II spindle and maternal chromosomes in bovine oocytes: implications for enucleation efficiency verification, avoidance of parthenogenesis, and successful embryogenesis. **Biology of Reproduction**, v.62, n.1, p.150-154, 2000.

EGLI, D.; BIRKHOFF, G.; EGGAN, K. Mediators of reprogramming: transcription factors and transitions through mitosis. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v.9, p.505-516, 2008.

ELSHEIKH, A.S.; TAKAHASHI, Y.; HISHINUMA, M.; KANAGAWA, H. Developmental ability of mouse late 2-cell stage blastomeres fused to chemically enucleated oocytes in vitro. **Journal of Veterinary Medical Science**, v.59, n.2, p.107-113, 1997.

FULKA, J. JR.; MOOR, R.M. Noninvasive chemical enucleation of mouse oocytes. **Molecular Reproduction and Development**, v.34, n.4, p.427-430, 1993.

FULKA, J. JR.; LOI, P.; FULKA, H.; PTAK, G.; NAGAI, T. Nucleus transfer in mammals: noninvasive approaches for the preparation of cytoplasts. **Trends in Biotechnology**, v.22, n.6, p.279-283, 2004.

FULKA, J.JR.; FULKA, H. Somatic cell nuclear transfer (SCNT) in mammals: the cytoplasm and its reprogramming activities. In: SUTOVSKY, P. (Ed) **Somatic Cell Nuclear Transfer**. 1ed. Landes Science. 2007. p.93-102.

GASARYAN, K.G.; HUNG, N.M.; NEYFAKH, A.A.; IVANENKOV, V.V. Nuclear transplantation in teleost *Misgurnus fossilis* L. **Nature**, v.280, n.5723, p.585-587, 1979.

GASPARRINI, B.; GAO, S.; AINSLIE, A.; FLETCHER, J.; MCGARRY, M.; RITCHIE, W.A.; SPRINGBETT, A.J.; OVERSTRÖM, E.W.; WILMUT, I.; DE SOUSA, P.A. Cloned mice derived from embryonic stem cell karyoplasts and activated cytoplasts prepared by induced enucleation. **Biology of Reproduction**, v.68, n.4, p.1259-1266, 2003.

GOLDBERG, I.H.; RABINOWITZ, M.; REICH, E. Basis of actinomycin action. I. DNA binding and inhibition of RNA-polymerase synthetic reactions by actinomycin. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.48, p.2094-2101, 1962.

GRONDAHL, C.; LESSL, M.; FAERGE, I.; HEGELE-HARTUNG, C.; WASSERMANN, K.; OTTESEN, J.L. Meiosis-activating sterol-mediated resumption of meiosis in mouse oocytes in vitro is influenced by protein synthesis inhibition and cholera toxin. **Biology of Reproduction**, v.62, n.3, p.775-780, 2000.

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.

GURDON, J.B.; BYRNE, J.A. The first half-century of nuclear transplantation. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.100, n.14, p.8048-8052, 2003.

GURDON, J.B. From nuclear transfer to nuclear reprogramming: the reversal of cell differentiation. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v.22, p.1-22, 2006.

GURDON, J.B.; MELTON, D.A. Nuclear reprogramming in cells. **Science**, v.322, n.5909, p.1811-1815, 2008.

HAYES, E.; GALEA, S.; VERKUYLEN, A.; PERA, M.; MORRISON, J.; LACHAM-KAPLAN, O.; TROUNSON, A. Nuclear transfer of adult and genetically modified fetal cells of the rat. **Physiological Genomics**, v.5, n.4, p.193-204, 2001.

HIKAWA, N.; TAKENAKA, T. Improved method for producing neuronal hybrids using emetine and actinomycin D. **Brain Research**, v.734, n.1-2, p.345-348, 1996.

HIKAWA, N.; TAKENAKA, T. Method for production of neuronal hybridoma using emetine and actinomycin D. **Brain Research Protocols**, v.1, n.3, p.224-226, 1997.

HOCHEDLINGER, K.; BLELLOCH, R.; BRENNAN, C.; YAMADA, Y.; KIM, M.; CHIN, L.; JAENISCH, R. Reprogramming of a melanoma genome by nuclear transplantation. **Genes and Development**, v.18, n.15, p. 1875-1885, 2004.

HOCHEDLINGER, K.; JAENISCH, R. Nuclear reprogramming and pluripotency. **Nature**, v.441, n.7097, p.1061-1067, 2006.

HOLM, P.; BOOTH, P.J.; SCHMIDT, M.H.; GREVE, T.; CALLESEN, H. High bovine blastocyst development in a static in vitro production system using SOFaa medium supplemented with sodium citrate and myo-inositol with or without serum-proteins. **Theriogenology**, v.52, n.4, p.683-700, 1999.

HUA, S.; ZHANG, Z.; ZHANG, C.; ZHANG, Y. An improved enucleation method of bovine somatic cell nuclear transfer. **Journal of Genetics and Genomics**, v.34, n.6, p.491-496, 2007.

HUARTE, J.; BELIN, D.; VASSALLI, J.D. Plasminogen activator in mouse and rat oocytes: induction during meiotic maturation. **Cell**, v.43, n.2, p.551-558, 1985.

IBAÑEZ, E.; ALBERTINI, D.F.; OVERSTRÖM, E.W. Demecolcine-induced oocyte enucleation for somatic cell cloning: coordination between cell-cycle egress, kinetics of cortical cytoskeletal interactions, and second polar body extrusion. **Biology of Reproduction**, v.68, n.4, p.1249-1258, 2003.

KARMENYAN, A.V.; SHAKHBAZIAN, A.K.; SVIRIDOVA-CHAILAKHYAN, T.A.; KRIVOKHARCHENKO, A.S.; CHIOU, A.E.; CHAILAKHYAN, L.M. Use of picosecond infrared laser for micromanipulation of early mammalian embryos. **Molecular Reproduction and Development**, v.76, n.10, p.975-983, 2009.

KASTROP, P.M.; HULSHOF, S.C.; BEVERS, M.M.; DESTREE, O.H.; KRUIP, T.A. The effects of alpha-amanitin and cycloheximide on nuclear progression, protein synthesis, and phosphorylation during bovine oocyte maturation in vitro. **Molecular Reproduction and Development**, v.28, n.3, p.249-254, 1991.

KAWAKAMI, M.; TANI, T.; YABUUCHI, A.; KOBAYASHI, T.; MURAKAMI, H.; FUJIMURA, T.; KATO, Y.; TSUNODA, Y. Effect of demecolcine and nocodazole on the efficiency of chemically assisted removal of chromosomes and the developmental potential of nuclear transferred porcine oocytes. **Cloning and Stem Cells**, v.5, n.4, p.379-387, 2003.

KIM, T.M.; HWANG, W.S.; SHIN, J.H.; PARK, H.J.; HAN, J.Y.; LIM, J.M. Development of a nonmechanical enucleation method using x-ray irradiation in somatic cell nuclear transfer. **Fertility and Sterility**, v.82, n.4, p.963-965, 2004.

KIRAK, O.; FRICKEL, E.M.; GROTENBREG, G.M.; SUH, H.; JAENISCH, R.; PLOEGH, H.L. Transnuclear mice with predefined T cell receptor specificities against *Toxoplasma gondii* obtained via SCNT. **Science**, v.328, n.5975, p.243-248, 2010.

KOCABAS, A.M.; CROSBY, J.; ROSS, P.J.; OTU, H.H.; BEYHAN, Z.; CAN, H.; TAM, W.L.; ROSA, G.J.; HALGREN, R.G.; LIM, B.; FERNANDEZ, E.; CIBELLI, J.B. The transcriptome of human oocytes. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.103, n.38, p.14027-14032, 2006.

KUETEMEYER, K.; LUCAS-HAHN, A.; PETERSEN, B.; LEMME, E.; HASSEL, P.; NIEMANN, H.; HEISTERKAMP, A. Combined multiphoton imaging and automated functional enucleation of porcine oocytes using femtosecond laser pulses. **Journal of Biomedical Optics**, v.15, n.4, 046006, 2010.

KUROIWA, Y.; KASINATHAN, P.; SATHIYASEELAN, T., JIAO, J.A.; MATSUSHITA, H.; SATHIYASEELAN, J.; WU, H.; MELLQUIST, J.; HAMMITT, M.; KOSTER, J.; KAMODA, S.; TACHIBANA, K.; ISHIDA, I.; ROBL, J.M. Antigen-specific human polyclonal antibodies from hyperimmunized cattle. **Nature Biotechnology**, v.27, n.2, p.173-181, 2009.

LI, J.; ISHII, T.; FEINSTEIN, P.; MOMBAERTS, P. Odorant receptor gene choice is reset by nuclear transfer from mouse olfactory sensory neurons. **Nature**, v.428, n.6981, p.393-399, 2004a.

LI, G.P.; WHITE, K.L.; BUNCH, T.D. Review of enucleation methods and procedures used in animal cloning: state of the art. **Cloning and Stem Cells**, v.6, n.1, p.5-13, 2004b.

LI, G.P.; BUNCH, T.D.; WHITE, K.L.; RICKORDS, L.; LIU, Y.; SESSIONS, B.R. Denuding and centrifugation of maturing bovine oocytes alters oocyte spindle integrity and the ability of cytoplasm to support parthenogenetic and nuclear transfer embryo development. **Molecular Reproduction and Development**, v.73, n.4, p.446-451, 2006.

LI, J.; LIU, X.; WANG, H.; ZHANG, S.; LIU, F.; WANG, X.; WANG, Y. Human embryos derived by somatic cell nuclear transfer using an alternative enucleation approach. **Cloning and Stem Cells**, v.11, n.1, p.39-50, 2009.

LIU, L.; OLDENBOURG, R.; TRIMARCHI, J.R.; KEEFE, D.L. A reliable, noninvasive technique for spindle imaging and enucleation of mammalian oocytes. **Nature Biotechnology**, v.18, n.2, p.223-225, 2000.

LIU, J.L.; SUNG, L.Y.; BARBER, M.; YANG, X. Hypertonic medium treatment for localization of nuclear material in bovine metaphase II oocytes. **Biology of Reproduction**, v.66, n.5, p.1342-1349, 2002.

MATTIOLI, M.; GALEATI, G.; BACCI, M.L.; BARBONI, B. Changes in maturation promoting activity in the cytoplasm of pig oocytes throughout maturation. **Molecular Reproduction and Development**, v.30, n.2, p.119-125, 1991.

MCGRATH, J.; SOLTER, D. Nuclear transplantation in the mouse embryo by microsurgery and cell fusion. **Science**, v.220, n.4603, p.1300-1302, 1983.

MCGRATH, J.; SOLTER, D. Inability of mouse blastomere nuclei transferred to enucleated zygotes to support development in vitro. **Science**, v.226, n.4680, p.1317-1319, 1984.

MEISSNER, A.; JAENISCH, R. Mammalian nuclear transfer. **Developmental Dynamics**, v.235, n.9, p.2460-2469, 2006.

MOURA, Marcelo Tigre. **Utilização da actinomicina D como método de enucleação química de ovócitos bovinos destinados à Transferência nuclear**. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília, 2007. 60p. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília, 2007a.

MOURA, M.T. Enucleação de ovócitos mamíferos destinados à transferência nuclear. **Anais da Academia Pernambucana de Ciências Agrônomicas** v. 4, p. 126-146, 2007b.

MOURA, M.T.; DE SOUSA, R.V.; DE OLIVEIRA LEME, L; RUMPF, R. Analysis of actinomycin D treated cattle oocytes and their use for somatic cell nuclear transfer. **Animal Reproduction Science**, v.109, n.1-4, p.40-49, 2008.

NG, S.C.; CHEN, N.; YIP, W.Y.; LIOW, S.L.; TONG, G.Q.; MARTELLI, B.; TAN, L.G.; MARTELLI, P. The first cell cycle after transfer of somatic cell nuclei in a non-human primate. **Development**, v.131, n.10, p.2475-2484, 2004.

RIDEOUT, W.M. 3RD; HOCHEDLINGER, K; KYBA, M.; DALEY, G.Q.; JAENISCH, R. Correction of a genetic defect by nuclear transplantation and combined cell and gene therapy. **Cell**, v.109, n.1, p.17-27, 2002.

SARAIVA, N.Z.; PERECIN, F.; MÉO, S.C.; FERREIRA, C.R.; TETZNER, T.A.; GARCIA, J.M. Demecolcine effects on microtubule kinetics and on chemically assisted enucleation of bovine oocytes. **Cloning and Stem Cells**, v.11, n.1, p.141-151, 2009.

SAVARD, C.; NOVAK, S.; SAINT-CYR, A.; MOREAU, M.; POTHIER, F.; SIRARD, M.A. Comparison of bulk enucleation methods for porcine oocytes. **Molecular Reproduction and Development**, v.67, n.1, p.70-76, 2004.

SCHNIEKE, A.E.; KIND, A.J.; RITCHIE, W.A.; MYCOCK, K.; SCOTT, A.R.; RITCHIE, M.; WILMUT, I.; COLMAN, A.; CAMPBELL, K.H. Human factor IX transgenic sheep produced by transfer of nuclei from transfected fetal fibroblasts. **Science**, v.278, n.5346, p.2130-2133, 1997.

SIMERLY, C.; DOMINKO, T.; NAVARA, C.; PAYNE, C.; CAPUANO, S.; GOSMAN, G.; CHONG, K.Y.; TAKAHASHI, D.; CHACE, C.; COMPTON, D.; HEWITSON, L.; SCHATTEEN, G. Molecular correlates of primate nuclear transfer failures. **Science**, v.300, n.5617, p.297, 2003.

SIMERLY, C.; NAVARA, C.; HYUN, S.H.; LEE, B.C.; KANG, S.K.; CAPUANO, S.; GOSMAN, G.; DOMINKO, T.; CHONG, K.Y.; COMPTON, D.; HWANG, W.S.; SCHATTEEN, G. Embryogenesis and blastocyst development after somatic cell nuclear transfer in nonhuman primates: overcoming defects caused by meiotic spindle extraction. **Developmental Biology** v.276, n.2, p.237-252, 2004.

SMITH, L.C. Membrane and intracellular effects of ultraviolet irradiation with Hoechst 33342 on bovine secondary oocytes matured in vitro. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.99, n.1, p.39-44, 1993.

SOBELL, H.M. Actinomycin and DNA transcription. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.82, n.16, p.5328-5331, 1985.

SOLTER, D. Mammalian cloning: advances and limitations. **Nature Reviews Genetics**, v.1, n.3, p.199-207, 2000.

STADTFELD, M.; HOCHEDLINGER, K. Induced pluripotency: history, mechanisms, and applications. **Genes and Development**, v.24, n.20, p.2239-2263, 2010.

TANI, T.; SHIMADA, H.; KATO, Y.; TSUNODA, Y. Demecolcine-assisted enucleation for bovine cloning. **Cloning and Stem Cells**, v.8, n.1, p.61-66, 2006.

TATEMOTO, H.; TERADA, T. Time-dependent effects of cycloheximide and alpha-amanitin on meiotic resumption and progression in bovine follicular oocytes. **Theriogenology**, v.43, n.6, p.1107-1113, 1995.

TATHAM, B.G.; DOWSING, A.T.; TROUNSON, A.O. Enucleation by centrifugation of in vitro-matured bovine oocytes for use in nuclear transfer. **Biology of Reproduction**, v.53, n.5, p.1088-1094, 1995.

TRASK, D.K.; MULLER, M.T. Stabilization of type I topoisomerase-DNA covalent complexes by actinomycin D. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.85, n.5, p.1417-1421, 1988.

WAGONER, E.J.; ROSENKRANS, C.F., JR.; GLIEDT, D.W.; PIERSON, J.N.; MUNYON A.L. Functional enucleation of bovine oocytes: Effects of centrifugation and ultraviolet light. **Theriogenology**, v.46, n.2, p.279-284, 1996.

WAKAMATSU, Y.; JU, B.; PRISTYAZNHYUK, I.; NIWA, K.; LADYGINA, T.; KINOSHITA, M.; ARAKI, K.; OZATO, K. Fertile and diploid nuclear transplants derived from embryonic cells of a small laboratory fish, medaka (*Oryzias latipes*). **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.98, n.3, p.1071-1076, 2001.

WANG, M.K.; LIU, J.L.; LI, G.P.; LIAN, L.; CHEN, D.Y. Sucrose pretreatment for enucleation: an efficient and non-damage method for removing the spindle of the mouse MII oocyte. **Molecular Reproduction and Development**, v.58, n.4, p.432-436, 2001.

WELLS, D.N.; MISICA, P.M.; TERVIT, H.R.; VIVANCO, W.H. Adult somatic cell nuclear transfer is used to preserve the last surviving cow of the Enderby Island cattle breed. **Reproduction, Fertility and Development**, v.10, n.4, p.369-378, 1998.

WESTHUSIN, M.E.; LONG, C.R.; SHIN, T.; HILL, J.R.; LOONEY, C.R.; PRYOR, J.H.; PIEDRAHITA, J.A. Cloning to reproduce desired genotypes. **Theriogenology**, v.55, n.1, p.35-49, 2001.

WILLADSEN, S.M. Nuclear transplantation in sheep embryos. **Nature**, v.320, n.6057, p.63-65, 1986.

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.; BEAUJEAN, N.; DE SOUSA, P.A.; DINNYES, A.; KING, T.J.; PATERSON, L.A.; WELLS, D.N.; YOUNG, L.E. Somatic cell nuclear transfer. **Nature**, v.419, n.6907, p.583-586, 2002.

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

ZHANG, G.; SUN, Q.Y.; CHEN, D.Y. Effects of sucrose treatment on the development of mouse nuclear transfer embryos with morula blastomeres as donors. **Zygote**, v.16, n.1, p.15-19, 2008.

CAPÍTULO 3 - ANÁLISE DA ESPECIFICIDADE DA ACTINOMICINA D NA ENUCLEAÇÃO QUÍMICA DE OVÓCITOS DESTINADOS A TRANSFERÊNCIA NUCLEAR.

Marcelo Tigre Moura^(1,2), Jeferson Badaraco⁽³⁾, Regivaldo Vieira de Sousa⁽²⁾, Carolina Madeira Lucci⁽¹⁾, e Rodolfo Rumpf^(1,2,3)

⁽¹⁾ Universidade de Brasília (UnB), Brasília, DF.

⁽²⁾ Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF.

⁽³⁾ Geneal Biotecnologia Animal, Uberaba, MG.

RESUMO

A introdução de uma célula somática em um ovócito enucleado pelo processo de transferência nuclear (TN) permite o restabelecimento da totipotência no núcleo doador. No entanto, a técnica permanece complexa e pouco eficiente. A enucleação do gameta é a etapa mais laboriosa da TN, e por isso, foco de intensa investigação para simplificá-la. As metodologias alternativas de enucleação descritas até o momento são pouco eficientes ou reduzem a viabilidade dos ovócitos. No entanto, as razões da baixa eficiência ou possível toxidez dessas abordagens não tem sido investigadas em detalhe e portanto, permanecem pouco elucidadas. Recentemente foi descrito que o tratamento de ovócitos com a actinomicina D, um inibidor irreversível de transcrição e replicação do DNA é capaz de impedir o desenvolvimento embrionário partenogênético bovino. No entanto, o desenvolvimento embrionário após o tratamento com actinomicina D após a TN é inferior aos controles. O objetivo do presente trabalho foi investigar a especificidade do tratamento com actinomicina D para melhor entender as causas do baixo desenvolvimento embrionário após a TN. A remoção do DNA do ovócito tratado com actinomicina D antes da introdução do núcleo doador por TN recuperou a capacidade de desenvolvimento embrionário *in vitro*, os embriões apresentaram índices semelhantes de atividade da *Caspase-3* em relação aos controles e foram capazes de estabelecer gestações. Com o objetivo de avaliar a generalidade dos resultados, a especificidade da mitomicina C, um inibidor irreversível de replicação do DNA, também foi testada. Inicialmente se determinou as condições em que a mitomicina C impede o desenvolvimento embrionário partenogênético bovino. Apesar da TN para ovócitos tratados com mitomicina C ser pouco eficiente, a enucleação mecânica após o tratamento novamente recuperou o desenvolvimento embrionário. O estabelecimento de gestações representa uma evidência inicial de que o tratamento com a mitomicina C também não apresenta efeitos inespecíficos em longo prazo. Os resultados demonstram que o fator limitante da enucleação de ovócitos pela actinomicina D é a presença do DNA tratado e sugere que alternativas que impeçam a sua identificação pelo citoplasma do gameta possam aumentar o desenvolvimento embrionário.

Palavras chave: transferência nuclear, enucleação funcional, bovino, clonagem animal.

ANALYSIS OF ACTINOMYCIN D SPECIFICITY DURING CHEMICAL ENUCLEATION OF OOCYTES DESTINED FOR NUCLEAR TRANSFER

Marcelo Tigre Moura^(1,2), Jeferson Badaraco⁽³⁾, Regivaldo Vieira de Sousa⁽²⁾, Carolina

Madeira Lucci⁽¹⁾, e Rodolfo Rumpf^(1,2,3)

⁽¹⁾ Universidade de Brasília (UnB), Brasília, DF.

⁽²⁾ Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF.

⁽³⁾ Geneal Biotecnologia Animal, Uberaba, MG.

ABSTRACT

The introduction of a somatic cell into an enucleated oocyte via nuclear transfer (NT) allows the reestablishment of totipotency in the donor nucleus. However, the technique is labor intensive and holds a low efficiency. The oocyte enucleation procedure is the most labor intensive step during NT, and efforts to ease its accomplishment are under intense investigation. All alternate enucleation methodologies described so far are inefficient or reduce oocyte viability. The causes of such limitations have not been investigated and thus remain poorly understood. It was recently described that treatment of oocytes with actinomycin D, a DNA transcription and replication irreversible inhibitor, is capable of blocking bovine parthenogenetic development. It was observed that actinomycin D severely affected embryonic development after NT. The objective of the current research was to address the specificity of actinomycin D treatment and to better understand the causes of low embryonic development after NT into treated oocytes. Removal of chromosomal DNA from treated oocytes before NT fully recovered embryonic development, produced embryos that had similar *Caspase-3* activity in comparison with controls and were capable of establishing mid-gestation pregnancies. In order to evaluate the generality of the results, the specificity of mitomycin C, a DNA replication irreversible inhibitor, was also addressed. The conditions in which mitomycin C completely abolishes embryonic development were determined. Although NT into mitomycin C treated oocytes had a low efficiency, mechanical enucleation after mitomycin C treatment rescued embryonic development and early pregnancy were established. In conclusion, the results demonstrate that the limiting factor to actinomycin D enucleation is the presence of treated DNA inside the oocyte and further suggests that approaches that circumvent this DNA identification by the gamete may enhance embryonic development.

Keywords: Nuclear transfer, functional enucleation, bovine, animal cloning.

3.1. INTRODUÇÃO

A clonagem por transferência nuclear (TN) foi demonstrada em diversas espécies de mamíferos (WILMUT et al., 1997; MEISSNER & JAENISCH, 2006). Essa tecnologia auxilia a investigação diferentes aspectos do desenvolvimento embrionário, permite multiplicar genomas de interesse, torna mais eficiente a produção de animais transgênicos e viabiliza a produção de células-tronco embrionárias geneticamente idênticas ao doador (WILMUT et al., 1997; SCHNIEKE et al., 1997; WELLS et al., 1998; WESTHUSIN et al., 2001; RIDEOUT et al., 2002; BARBERI et al., 2003; LI et al., 2004a; HOCHEDLINGER et al., 2004; HOCHEDLINGER & JAENISCH, 2006; MEISSNER & JAENISCH, 2006; BYRNE et al., 2007; KUROIWA et al., 2009).

A investigação da clonagem por TN em mamíferos foi inicialmente limitada pela ausência de um método de enucleação de ovócitos, pois as metodologias utilizadas para enuclear gametas em anfíbios e peixes não se mostraram eficazes (GASARYAN et al., 1979; BRADSHAW et al., 1995; CHAN & GURDON, 1996; BORDIGNON & SMITH, 1999; WAKAMATSU et al., 2001; GURDON, 2006). A demonstração de que gametas intactos (não enucleados) reconstruídos com blastômeros desenvolviam *in vitro* não comprova inequivocamente que o núcleo doador foi reprogramado (BROMHALL, 1975; MODLINSKI, 1975, 1978, 1981). Os embriões de TN não eram transferidos para receptoras porque fetos tetraplóides não desenvolvem a termo (EAKIN & BEHRINGER, 2003). Quando células diplóides são introduzidas em um embrião 4n, as células tetraplóides contribuem quase exclusivamente para a formação da placenta e seus anexos (NAGY et al., 1993; EAKIN & BEHRINGER, 2003). O progresso na enucleação dos gametas permitiu avaliar o desenvolvimento dos embriões de TN *in vivo* (HOPPE & ILLMENSEE, 1977; MODLINSKI, 1980; MCGRATH & SOLTER, 1983, 1984), e demonstrou ser possível clonar mamíferos a partir de células embrionárias e somáticas (ILLMENSEE & HOPE, 1981; WILLADSEN, 1986; PRATHER et al., 1987, 1989; STICE & ROBL, 1988; WILMUT et al., 1997; MEISSNER & JAENISCH, 2006).

Apesar do potencial da tecnologia, a aplicação da clonagem é limitada por fatores biológicos e técnicos (GURDON & BYRNE, 2003; HOCHEDLINGER & JAENISCH, 2006; GURDON & MELTON, 2008; EGLI et al., 2008). O desenvolvimento de metodologias menos complexas tem grande apelo para a expansão da tecnologia (VAJTA et al., 2001), onde a enucleação do ovócito é a etapa mais laboriosa da TN. A busca por alternativas mais simples para a enucleação de ovócitos resultou em um número expressivo de metodologias (FULKA et al., 2004; LI et al., 2004b; FULKA & FULKA, 2007; MOURA, 2007a,b). Porém, esses métodos apresentam baixa eficiência ou reduzem a viabilidade do ovócito.

A demonstração de que a actinomicina D, um inibidor irreversível de transcrição e replicação do DNA (GOLDBERG et al., 1962; COOPER & BRAVERMAN, 1977; SOBELL, 1985, TRASK & MULLER, 1988) impede o desenvolvimento embrionário partenogenético bovino sugere que o procedimento possa ser utilizado para enucleação química de ovócitos (HIKAWA & TAKENAKA, 1996, 1997; BAYONA-BAFALUY et al., 2003, 2005; MOURA et al., 2008). Apesar do bloqueio do desenvolvimento embrionário partenogenético pela actinomicina D, a TN com células somáticas produziu blastocistos com incidência de apoptose semelhante aos controles (aferida pela presença de fragmentação do DNA cromossômico). Baseado nestes experimentos, as principais limitações da enucleação pela actinomicina D identificadas foram: *i*) toxicidade do tratamento observada pela redução da maturação nuclear dos gametas, *ii*) necessidade de um período longo de incubação com a actinomicina D, *iii*) desenvolvimento de apenas 1% dos embriões até a fase blastocisto após o tratamento com o inibidor, *iv*) e desconhecimento da(s) causa(s) do baixo desenvolvimento embrionário após a TN (MOURA et al., 2008).

Mais recentemente, foi possível determinar que as células do *cumulus* mediam a toxicidade da actinomicina D durante a maturação dos ovócitos, e que a incubação de gametas desnudos recupera as taxas de extrusão do primeiro corpúsculo polar (Capítulo 2) e que utilizando a concentração de $5\mu\text{g mL}^{-1}$ por quinze minutos obtém-se completo bloqueio do desenvolvimento embrionário partenogenético (Capítulo 2).

A principal limitação da enucleação de ovócitos pela actinomicina D é a baixa capacidade de desenvolvimento dos embriões após a TN. Embora a presença das células do *cumulus* durante o tratamento com actinomicina D tenha efeito negativo sobre os gametas, ainda é necessário determinar se os avanços são capazes de aumentar a taxa de desenvolvimento embrionário *in vitro* e *in vivo*. O objetivo do presente trabalho foi

determinar a capacidade de desenvolvimento dos embriões reconstruídos utilizando o novo protocolo de enucleação química pela actinomicina D descrito acima. Além disso, foi testada a hipótese de que o baixo desenvolvimento embrionário se deve exclusivamente ao efeito da actinomicina D sobre o DNA do ovócito.

3.2. MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1. Coleta dos ovários e seleção dos ovócitos

Ovários foram coletados em abatedouros na região do entorno de Brasília/DF. Após a coleta foram transportados em solução fisiológica (NaCl 0,9%) ou em *phosphate buffered saline* (PBS) a uma temperatura de 35°C para o laboratório. Os ovócitos foram recuperados dos folículos ovarianos através de um sistema de bomba a vácuo utilizando escalpes de 19G acoplados a tubos cônicos de 15mL. Esses eram mantidos parcialmente imersos em banho maria com temperatura de 35°C por pelo menos dez minutos, para haver a sedimentação do material aspirado. Apenas folículos com diâmetro entre dois e oito milímetros foram aspirados. O *pellet* de cada tubo era diluído em meio de lavagem (LAV), composto por TCM-199 Hank's ou PBS suplementados com 10% de soro fetal bovino (SFB - Gibco®), 10UI mL⁻¹ de penicilina (Sigma®) e 50µg mL⁻¹ de estreptomicina (Sigma®). A procura dos ovócitos foi feita em placa de *petri* de 100mm, sob estereomicroscópio (ZEISS® - Stemi SV6). Após a recuperação, os ovócitos foram selecionados e apenas os complexos *cumulus*-ovócito (CCO) que apresentavam três ou mais camadas de células do *cumulus* e citoplasma homogêneo foram submetidos à maturação *in vitro* (MIV).

3.2.2. Maturação *in vitro* dos ovócitos

Os CCOs selecionados foram imediatamente lavados em meio para MIV. A maturação era feita em placa de 35mm contendo 2,0-3,0mL de meio MIV (>7µL por ovócito) coberto com óleo mineral (Sigma®). O meio de maturação é composto de TCM-199 com sais de Earle's suplementado com 10% de SFB, 2mM L-glutamina, 0,01UI mL⁻¹ Hormônio Folículo Estimulante (FSH), 24UI mL⁻¹ Hormônio Luteinizante (LH), 100UI mL⁻¹ de penicilina e 50µg mL⁻¹ de estreptomicina, sendo estabilizado por duas horas em incubadora a 39°C e 5% de dióxido de carbono (CO₂) em ar, onde se realizou a maturação.

3.2.3. Desnudação e quantificação da maturação

Após a 16h de MIV, os ovócitos eram desnudados utilizando hialuronidase (Sigma®) 0,2% por cinco minutos. Imediatamente foram transferidos para outra gota do mesmo reagente e submetidos à pipetagem pelo mesmo período. Posteriormente, mais cinco minutos de pipetagem em LAV. Após a remoção das células do *cumulus*, os gametas retornavam para o meio MIV. Os ovócitos que se apresentavam degenerados após a desnudação eram descartados. Os ovócitos foram avaliados quanto à presença do primeiro corpúsculo polar (CP) sob estereomicroscópio (ZEISS® - Stemi SV11) e apenas os que apresentavam CP foram utilizados para ativação partenogênética ou transferência nuclear.

3.2.4. Tratamento com inibidores

O tratamento com actinomicina D (Fluka®) foi baseado nos experimentos anteriores (Capítulo 2). Foi utilizada a concentração de $5\mu\text{g mL}^{-1}$ de actinomicina D por quinze minutos (0,25h). Para o tratamento com Mitomicina C (Sigma®) foi utilizada a concentração de $10\mu\text{g mL}^{-1}$. Antes do início da incubação com os inibidores, os gametas eram lavados uma vez com meio MIV contendo o respectivo inibidor. Após o tratamento, os gametas eram lavados em meio MIV por cinco vezes.

3.2.5. Cultivo de células somáticas

Palhetas de 0,25mL ou 0,5mL contendo fibroblastos de três fêmeas bovinas adultas foram retiradas do nitrogênio líquido (-196°C) e descongeladas em recipiente contendo água aquecida a $37-38^{\circ}\text{C}$. O conteúdo das palhetas era depositado em um tubo cônico de 15mL. O tubo continha 5mL de meio de cultivo celular composto por Dubelcco's Minimum Eagle Medium (DMEM - GIBCO®) suplementado com $3,7\text{g L}^{-1}$ bicarbonato de sódio, 110mg L^{-1} piruvato, 10% SFB e antibióticos. O conteúdo era centrifugado com o objetivo de separar as células do meio contendo Dimetil Sulfóxido (DMSO - Sigma®). Retirado o sobrenadante, o *pellet* era resuspendido com 3mL de meio de cultivo e era depositado em uma garrafa de cultivo celular de 25cm^2 . O cultivo era realizado em incubadora a 39°C e 5% de CO_2 em ar.

A cada três dias, as placas eram avaliadas quanto à proliferação e morfologia celular, quando o meio era trocado. Ao atingir a confluência, aproximadamente a cada sete dias, as placas eram repicadas com 1mL de tripsina – EDTA (0,05% - Sigma®) por cinco a dez minutos. Para inativar a tripsina adiciona-se 2mL de DMEM contendo SFB. Posteriormente a solução com as células era retirada da garrafa e o conteúdo era dividido em dois microtubos. Após a centrifugação a 200 \times g, os *pellets* eram resuspendidos em meio de congelamento (DMEM acrescido de 10% de DMSO) ou eram utilizados para preparação de uma nova placa de cultivo. O congelamento requer a manutenção das palhetas em -20°C ou -80°C por cerca de 12h para manter a viabilidade das células. Em seguida, as palhetas eram transferidas para nitrogênio líquido (-196°C). Quando mantidas para TN, o cultivo deveria estar em confluência por pelo menos quatro dias para sincronização do ciclo celular das células doadoras de núcleo (indução da quiescência).

3.2.6. Transferência Nuclear

Os ovócitos eram maturados e desnudados como descrito acima. Apenas ovócitos que apresentavam granulação citoplasmática homogênea e o primeiro CP eram utilizados. Antes da micromanipulação, os gametas eram incubados em solução contendo 0,33 μ g mL⁻¹ de citocalasina D (Sigma®) e 7,5 μ g mL⁻¹ hoechst 33342 (Sigma®) por quinze a trinta minutos. Os ovócitos eram utilizados em grupos de 16-20.

Os ovócitos eram presos individualmente à pipeta *holding* e posicionava-se o CP na posição de 4h. Para a enucleação pela actinomicina D, o grupo TN (AD), introduzia-se a pipeta de injeção e cuidadosamente retirava-se apenas o CP evitando remover citoplasma [caso parte do citoplasma houvesse sido removido, a biópsia era exposta a luz ultravioleta (UV) para determinar se o gameta foi enucleado]. Uma célula somática era imediatamente depositada no espaço perivitelino através do mesmo furo na zona pelúcida e cuidadosamente aderida ao citoplasma do ovócito. Para a enucleação mecânica por micropipeta, grupo TN (C), parte do citoplasma adjacente ao CP era removido e a biópsia obtida do ovócito era exposta à UV para confirmação da enucleação. Para o grupo TN (AD-C), a enucleação mecânica por micropipeta era iniciada após, pelo menos, 1h do tratamento com actinomicina D.

Terminada a fase de reconstrução, as estruturas eram submetidas à eletrofusão. Foi utilizada uma placa de fusão de 500 μ m e um eletrofusor ECM 200 (BTX®), com dois pulsos

de 2.1 kVA, com 30 μ s de duração. Como solução para realização da eletrofusão, era utilizado o Mannitol (Sigma[®]) a 0,28M contendo 0,1mM de MgSO₄ (Sigma[®]). Após a realização da primeira fusão de todas as estruturas, esperava-se trinta minutos para avaliar o resultado do procedimento. Os ovócitos não fusionados eram submetidos a uma segunda fusão. Todas as estruturas não fusionadas eram descartadas.

Após a eletrofusão, as estruturas fusionadas eram mantidas na estufa em meio de cultivo de embriões (descrito abaixo). Concluída a fusão de todos os ovócitos reconstruídos, os mesmos eram submetidos à ativação partenogenética como descrito a seguir.

3.2.7. Ativação partenogenética dos ovócitos

Os ovócitos eram submetidos à ativação partenogenética utilizando 5 μ M de *ionomycin* (Sigma[®]) por cinco minutos em meio para cultivo de embriões. Esse era composto por meio *synthetic oviductual fluid* (SOF) suplementado com aminoácidos essenciais, citrato de sódio, mio-inositol e 5% de SFB (SOFaaci), como descrito anteriormente (HOLM et al., 1999). Para completar a ativação, os ovócitos eram posteriormente lavados em SOFaaci e imediatamente cultivados em 2mM de *6-dimethylaminopurine* (6DMAP - Sigma[®]) em SOFaaci por 4-5 horas. Após o 6DMAP, os ovócitos eram lavados em SOFaaci e cultivados por até oito dias em incubadora a 39°C e 5% de CO₂ em ar.

3.2.8. Cultivo *in vitro* de embriões

No dia do início da maturação dos ovócitos, antes da chegada dos ovários, placas de 60 mm eram preparadas para o cultivo dos embriões com quatro gotas de 200 μ L cada de SOFaaci e cobertas com óleo mineral (Sigma[®]) e estabilizadas na incubadora de CO₂ por pelo menos duas horas (MOURA, 2007a).

Após a seleção dos ovócitos destinados à MIV, um grupo de aproximadamente 20 ovócitos descartado era desnudado por pipetagem em LAV por cerca de um minuto. Em seguida, os ovócitos eram retirados da gota e o meio contendo as células era depositado em um microtubo. Esse era centrifugado por cinco minutos a 200xg, o sobrenadante removido, e o

pellet era resuspendido com 200µL de SOFaaci. Posteriormente, 7µL da solução era depositada em cada gota da placa de cultivo.

No dia seguinte, logo após o início do cultivo dos gametas ou ovócitos reconstruídos com 6DMAP, era feita a troca de todo o meio das gotas das placas de cultivo, permitindo a remoção de células que não se fixaram ao fundo da placa. Após a incubação das estruturas na solução com 6DMAP, os mesmos eram lavados cinco vezes em meio SOFaaci, colocados nas gotas da placa de cultivo e retornavam a incubadora. Os embriões eram avaliados quanto ao seu desenvolvimento após 48 horas (clivagem), e blastocistos: 168 horas (D7) e 192 horas (D8).

3.2.9. Análise da apoptose pela atividade da *Caspase 3*

Foi utilizado o kit de atividade de *Caspase 3* (Merck®). Para preparar a solução de uso, 57µL do substrato do kit (PhiPhiLux®-G2D2) era acrescido de 6,3µL de SFB e 20µL de meio SOFaaci ou LAV. Após colocar os embriões em pequenas gotas de meio dentro de uma câmara úmida, as estruturas eram mantidas protegidas da luz em estufa por 40 minutos. Os embriões eram lavados três vezes em meio SOFaaci ou LAV e depositados sobre lâminas com parafina e lamínula evitando a exposição à luz. A avaliação era feita sob microscópio de fluorescência com aumento de 20x (Zeiss®-Axiophot). Embriões mantidos por 12h em cultivo sob temperatura de 41° C eram utilizados como controle positivo do kit.

3.2.10. Transferência de embriões

As transferências de embriões foram realizadas pela equipe da Geneal Biotecnologia de acordo com o procedimento padrão da empresa. As fêmeas bovinas destinadas ao experimento que apresentaram sinais de estro 6-8 dias antes da data da TE foram apartadas e contidas em brete. A realização da palpação retal permitia a identificação do lado onde ocorreu a ovulação e posterior formação do corpo lúteo. Em seguida, era realizada anestesia local e preparação do animal para inovulação. O embrião era preparado para ser transferido e o inovulador contendo a estrutura era introduzido pela vagina até o fundo de saco. Passada a cérvix, o inovulador era direcionado ao corno uterino ipsilateral ao corpo lúteo. Após trazer a

ponta do inovulador o mais profundo possível e próxima à junção útero - tuba uterina era feita a deposição do embrião.

3.2.11. Análise estatística

Os dados referentes às taxas de maturação, clivagem, blastocisto, e prenhez foram analisados pelo teste do Qui-quadrado (χ^2). O nível de significância considerado foi $P < 0,05$.

3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os avanços obtidos na enucleação química de ovócitos pela actinomicina D descritos no capítulo anterior motivaram a avaliação do novo tratamento no desenvolvimento embrionário após a TN (Tabela 3.1). A demonstração que o tratamento com actinomicina D não afeta a maturação *in vitro* e impede o desenvolvimento partenogenético não são suficientes para demonstrar a eficiência da metodologia. Apenas a avaliação do desenvolvimento embrionário e fetal posterior à TN exclui a possibilidade de que outros fatores, mediados pela actinomicina D e independentes da inativação dos cromossomos, contribuam para o bloqueio do desenvolvimento partenogenético. Para determinar se há especificidade de ação da actinomicina D no DNA dos gametas, parte dos ovócitos expostos ao inibidor foi enucleada por micropipeta e reconstruída com células somáticas (Tabela 3.1).

Tabela 3.1 - Desenvolvimento embrionário a partir de ovócitos enucleados pela actinomicina D e reconstruídos com células somáticas.

Grupo	Fusão (%)	Clivagem (%)	Blastocisto (%)	
			D7	D8
P (C)	NA	166/194 (85,56) ^a	53/194 (27,31) ^a	65/194 (33,50) ^a
P (AD)	NA	88/166 (53,01) ^b	00/166 (00,00) ^b	02/166 (01,20) ^b
TN (AD)	178/217 (82,02) ^a	135/178 (75,84) ^a	06/178 (03,37) ^c	08/178 (04,49) ^b
TN (AD-C)	194/221 (87,78) ^a	163/194 (84,02) ^a	46/194 (23,71) ^a	59/194 (30,41) ^a

Cinco réplicas. NA: Não aplicável. Fusão: número de ovócitos fusionados à célula somáticas. Clivagem: embriões contendo duas ou mais células após 48 de ativação. D7/D8: Blastocistos após sete e oito dias de cultivo *in vitro*, respectivamente. Diferentes sobrescritos (a,b,c) na coluna diferem significativamente ($p < 0,05$). P (C): Controle partenogenético; P (AD): Controle partenogenético tratado com $5\mu\text{g mL}^{-1}$ de actinomicina D por 15 minutos; TN (AD): Ovócitos tratado com $5\mu\text{g mL}^{-1}$ de actinomicina D por quinze minutos e utilizados para TN; TN (AD-C): Ovócitos tratados com $5\mu\text{g mL}^{-1}$ de actinomicina D por 15 minutos, enucleados por micropipeta e reconstruídos por TN.

O tipo de enucleação não afetou a taxa de fusão dos ovócitos reconstruídos (Tabela 3.1). No que concerne à taxa de clivagem, o grupo P (AD) foi inferior ao controle P (C), confirmando o efeito do tratamento com a actinomicina D no desenvolvimento embrionário, inclusive antes da ativação do genoma (CHANDOLIA et al., 1999; MOURA et al., 2008). Um resultado importante foi o fato que o grupo TN (AD), semelhante ao grupo TN (AD-C), obteve índice superior de clivagem ao P (AD) e semelhante aos grupos TN (AD-C) e P (C).

Em relação à produção de blastocistos, o grupo P (AD) não apresentou estruturas no dia 7, mas no dia seguinte (Tabela 3.1). A reconstrução após a enucleação pela actinomicina D não recuperou a taxa de formação de blastocistos. No sétimo dia de cultivo o grupo TN (AD) ainda apresentava maior desenvolvimento de blastocistos do que o P (AD), embora no oitavo dia não tenha havido diferença. O grupo TN (AD-C) resultou na formação de blastocistos com a mesma eficiência que o grupo partenogênético não tratado P (C), demonstrando que a micromanipulação não afeta o desenvolvimento dos embriões e o efeito do inibidor é restrito ao DNA. Do ponto de vista morfológico, os grupos P (C), TN (AD), TN (AD-C) apresentaram embriões indistinguíveis dos controles (Figura 3.1).

Para melhor compreender o efeito da introdução das células somáticas por TN no citoplasma do ovócito enucleado pela actinomicina D, a avaliação da clivagem dos embriões foi dividida em quatro categorias: não clivados, fragmentados, clivados e clivados com fragmentação (Tabela 3.2). Embora a TN não interferiu no percentual de estruturas clivadas (Tabela 3.1), a enucleação pela actinomicina D influenciou a clivagem independente da introdução de uma célula somática (Tabela 3.2). Os grupos P (C) e TN (AD-C) apresentaram menor fragmentação que o grupo P (AD). A reconstrução por TN, todavia, reduziu essa característica no grupo TN (AD), tornando-o semelhante aos grupos não tratados (Tabela 3.2). Apesar da fragmentação ser um aspecto correlacionado a redução da viabilidade do embrião (JURISICOVA & ACTON, 2004), a ativação de ovócitos enucleados por micropipeta causa o mesmo fenômeno. Por isso, a alta incidência de fragmentação apenas no grupo P (AD) pode ser interpretada como uma demonstração da eficiente enucleação química dos gametas. Em relação a clivagem sem fragmentação, os grupos P (C) e TN (AD-C) foram superiores ao grupo TN (AD), que por sua vez foi superior ao grupo P (AD). Em resumo, a reconstrução de ovócitos tratados com actinomicina D melhorou a qualidade morfológica dos embriões no segundo dia de cultivo.

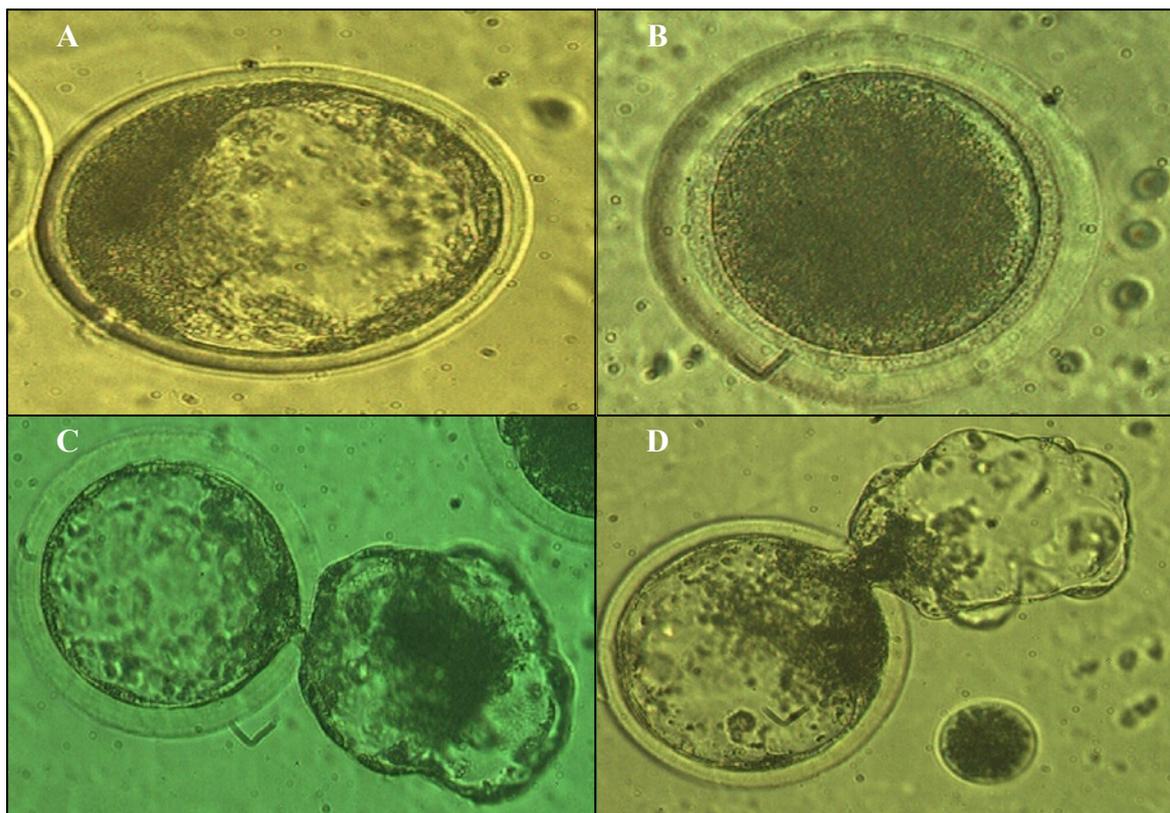


Figura 3.1 - Formação de blastocistos após transferência nuclear com ovócitos enucleados pela actinomicina D. A) P (C). B) P (AD) C) TN (AD). D) TN (AD-C). Os embriões apresentavam sete dias de cultivo *in vitro* após a ativação.

Tabela 3.2 - Efeito do tratamento de ovócitos com actinomicina D na qualidade dos embriões reconstruídos após dois dias de cultivo.

Grupo	Não clivados (%)	Fragmentados (%)	Clivados (%)	Clivados com fragmentação (%)
P (C)	13/194 (06,70) ^a	16/194 (08,24) ^a	147/194 (75,77) ^a	18/194 (09,27) ^a
P (AD)	39/166 (23,49) ^b	39/166 (23,49) ^b	67/166 (40,36) ^c	21/166 (12,65) ^{a,b}
TN (AD)	26/178 (14,60) ^c	20/178 (11,23) ^a	102/178 (57,30) ^b	30/178 (16,85) ^b
TN (AD-C)	16/194 (08,24) ^{a,c}	15/194 (07,73) ^a	140/194 (72,16) ^a	23/194 (11,85) ^{a,b}

Cinco réplicas. Diferentes sobrescritos (a,b,c) na coluna diferem significativamente ($p < 0,05$). P(C): Controle partenogenético; P(AD): Controle partenogenético tratado com $5\mu\text{g mL}^{-1}$ de actinomicina D por 15 minutos; TN (AD): Ovócitos tratado com $5\mu\text{g mL}^{-1}$ de actinomicina D por 15 minutos e utilizado para TN; TN (AD-C): Ovócitos tratado com $5\mu\text{g mL}^{-1}$ de actinomicina D por 15 minutos, enucleado por micropipeta e reconstruído por TN.

Os resultados sugerem que o efeito direto da actinomicina D sobre o DNA reduz o potencial de desenvolvimento dos embriões após a TN. A actinomicina D inibe as reações mediadas pelas RNA e DNA polimerases (GOLDBERG et al., 1962; SOBELL, 1985), e a ação do inibidor forma nos cromossomos estruturas não fisiológicas como o *crosslinking* entre o DNA e proteínas (TRASK & MULLER, 1988). Isso induz o mecanismo de reparo do DNA (Figura 3.2), com o objetivo de preservar a integridade do genoma (LEGERSKI et al., 1987; ASHWOOD-SMITH & EDWARDS, 1996; LJUNGMAN & LANE, 2004).

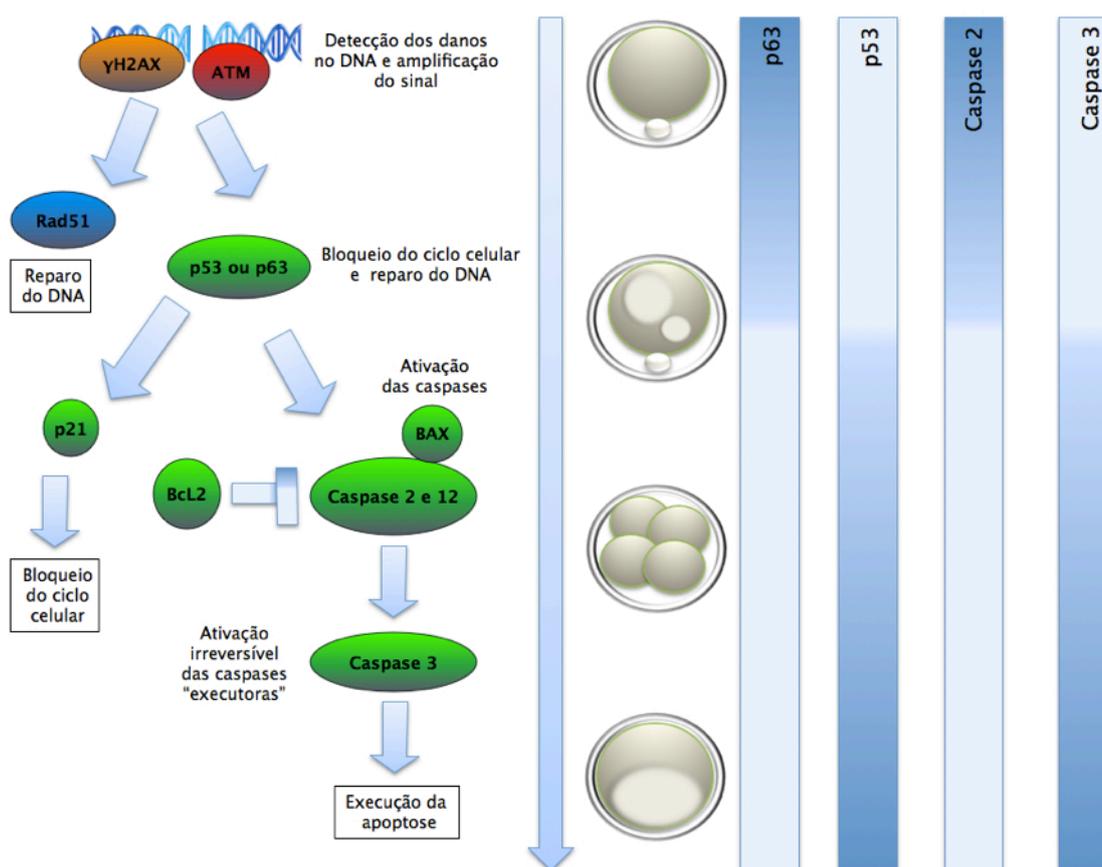


Figura 3.2 - Mecanismo de resposta a danos no DNA em ovócitos e embriões. Componentes da via determinados nos dois sistemas (a distribuição temporal de alguns componentes está destacada acima).

Um processo associado ao reparo do DNA é o bloqueio do ciclo celular em alguns pontos específicos (fases G1, S, G2/M) denominados de “*checkpoints*” (SHIMURA et al., 2002; TOYOSHIMA et al., 2005; FATEHI et al., 2006; PENG et al., 2008). A interrupção do ciclo tem como objetivo evitar que a porção do genoma danificado seja transmitido após a divisão celular ou replicado de forma incorreta. Além disso, caso o insulto ao genoma seja irreparável, a célula ou embrião entra no processo de morte celular programada (MCP) ou

senescência (LJUNGMAN & LANE, 2004). No caso de danos ao DNA de ovócitos, o efeito pode ser apenas observado durante o desenvolvimento embrionário (Tilly, 2001; Paula-Lopes & Hansen, 2002; BRAD et al., 2007).

A MCP por apoptose é um processo que resulta na degradação das proteínas celulares por *Caspases* (YUAN & KROEMER, 2010). Dentre estas enzimas, as *Caspases 3, 6, e 7* compõem o grupo da família responsável pela “execução” do processo de apoptose (ADAMS, 2003; KUROKAWA & KORNBLUTH, 2009). As *Caspases* executoras são ativadas por clivagem e por isso, determinam de forma irreversível, o momento em que a célula se compromete a realizar a MCP (KUROKAWA & KORNBLUTH, 2009). Baseado em tais características, a atividade das caspases executoras tem sido utilizada como indicador do processo de MCP por apoptose (PAULA-LOPES & HANSEN, 2002).

O baixo desenvolvimento do grupo TN (AD) motivou a caracterização da especificidade de ação da actinomicina D durante a enucleação química. O objetivo foi testar se o DNA inativado pela actinomicina D presente no gameta representa a única (ou principal) barreira para o desenvolvimento embrionário após a TN. A confirmação de tal hipótese direcionaria (e consequentemente simplificaria) futuras investigações para buscar métodos que impeçam a identificação do DNA inativo pelo ovócito após a TN em gametas enucleados com a actinomicina D.

Com o intuito de determinar a qualidade dos embriões produzidos após o tratamento com o inibidor, os mesmos foram avaliados quanto a presença de um marcador de MCP por apoptose, a atividade da *Caspase 3* (Tabela 3.3). Além disso, a avaliação da incidência de apoptose em embriões reconstruídos com ovócitos enucleados com actinomicina D pode confirmar que a via de reparo ao DNA (indução do reparo ao DNA e apoptose) representa o mecanismo celular que detecta o DNA tratado com o inibidor e impede o desenvolvimento do embriões.

A determinação do momento da avaliação da atividade da *Caspase 3* nos embriões foi baseado no fato de que no período que antecede a ativação genômica (no estágio de oito para dezesseis células no embrião bovino), o embrião bovino possui uma baixa capacidade de entrar em MCP (HARDY, 1999; PAULA-LOPES & HANSEN, 2002; GJØRRET et al., 2003, 2005). Por isso, a análise foi realizada quando as estruturas apresentavam pleno potencial para desencadear o mecanismo de apoptose (72h após ativação partenogenética). Para reduzir a chance de que possíveis alterações no cultivo dos embriões e do tratamento com actinomicina

D interferissem na avaliação da atividade da *Caspase 3*, os grupos P (C) e P (AD) também foram avaliados, respectivamente (Tabela 3.3).

Tabela 3.3 - Apoptose em embriões obtidos a partir de ovócitos enucleados pela actinomicina D e reconstruídos com células somáticas.

Grupo	Fusão (%)	Clivagem (%)	Apoptose (%)	Blastocisto (%)	
				D7 (%)	D8 (%)
P (C)	NA	99/110 (90,00) ^a	11/50 (22,00) ^a	18/55 (32,72) ^a	25/55 (45,45) ^a
P (AD)	NA	79/113 (69,91) ^b	37/56 (66,07) ^b	00/57 (00,00) ^b	00/57 (00,00) ^b
TN (C)	57/62 (91,93) ^a	41/57 (71,92) ^b	18/51 (35,29) ^a	NA	NA
TN (AD)	54/68 (79,41) ^b	38/47 (80,85) ^{a,b}	28/47 (59,57) ^b	NA	NA
TN (AD-C)	40/49 (81,63) ^{a,b}	34/39 (87,17) ^a	13/35 (37,14) ^a	NA	NA

Três réplicas. NA: Não avaliado. Fusão: número de ovócitos fusionados à célula somáticas. Clivagem: embriões contendo duas ou mais células após 48 de ativação. Apoptose: determinada pela atividade da caspase 3. D7/D8: Blastocistos após sete e oito dias de cultivo *in vitro*, respectivamente. Diferentes sobrescritos (a,b) na coluna diferem significativamente ($p < 0,05$). P(C): Controle partenogenético; P(AD): Controle partenogenético tratado com $5\mu\text{g mL}^{-1}$ de actinomicina D por 15 minutos; TN(C): Ovócitos enucleado por micropipeta e reconstruído por TN. TN (AD): Ovócitos tratado com $5\mu\text{g mL}^{-1}$ de actinomicina D por 15 minutos e utilizado para TN; TN (AD-C): Ovócitos tratado com $5\mu\text{g mL}^{-1}$ de actinomicina D por 15 minutos, enucleado por micropipeta e reconstruído por TN.

Para efeito de controle do sistema de produção *in vitro* de embriões, parte dos controles foram cultivados até o oitavo dia após a ativação partenogenética. As taxas de clivagem e desenvolvimento até a fase de blastocisto nos dias 7 e 8 nos grupos P (C) e P (AD) foi semelhante aos dados obtidos anteriormente (Tabela 3.1), validando o experimento (Tabela 3.3). Os grupos TN (AD) e TN (AD-C) apresentaram taxas de clivagem um pouco inferiores aos dados anteriores. Curiosamente, o grupo TN (C) apresentou menor capacidade de clivar que os tratamentos P (C) e TN (AD-C), embora semelhante ao grupo P (AD).

No que concerne a atividade da *Caspase 3*, o controle P (C) apresentou um percentual inferior de embriões positivos em relação aos demais grupos (Tabela 3.3). A taxa de 22% dos embriões positivos pode ser considerada alta quando comparada a relatos anteriores ($< 10\%$; PAULA-LOPES & HANSEN, 2002). No entanto, duas réplicas ficaram com percentual semelhante aos dados publicados anteriormente. A razão para tal variação é desconhecida, mas pode ser devida a variabilidade na qualidade dos ovócitos provenientes de ovários

coletados em abatedouro. A taxa de apoptose no grupo P (AD) foi três vezes superior ao controle P (C), o que confirma a capacidade da actinomicina D de induzir (direta ou indiretamente) a atividade de *Caspases* (HIETANEN et al., 2000; CHOONG et al., 2009). Como determinado anteriormente, foi observado no presente trabalho que embriões obtidos a partir da TN com células somáticas apresentam maior incidência de apoptose que os controles P(C) e P (AD) (GJØRRET et al., 2005). No entanto, o grupo TN (AD) apresentou taxa de atividade de *Caspase 3* semelhante ao P (AD) e superior aos demais grupos frutos da TN. No entanto, a demonstração que TN (AD-C) apresenta uma taxa de apoptose semelhante ao TN (C) sugere que o processo que culmina na indução de caspases pela actinomicina D foi reduzido ao nível do controle TN (C) (Tabela 3.3).

Para melhor caracterizar a especificidade do tratamento com a actinomicina D sobre os cromossomos do gameta, parte dos blastocistos TN dos grupos TN (AD-C) e TN (C) foram transferidos para receptoras previamente sincronizadas para aferir a capacidade de desenvolvimento dos embriões *in vivo* (Tabela 3.4). As taxas de gestação obtidas nos grupos TN (C) e TN (AD-C) foram semelhantes. No grupo TN (C), uma das prenhez que ultrapassou os 90 dias de desenvolvimento foi perdida com 167 dias. A outra gestação permaneceu viável, onde uma bezerra foi obtida após 292 dias de gestação. No entanto, o animal morreu cerca de 24h após a cesariana (Figura 3.3). No grupo TN (AD-C) três gestações desenvolveram mais de 60 dias, mas foram abortadas espontaneamente com 82, 151, e 155 dias. A prenhez perdida com 151 dias não apresentou alterações morfológicas significativas (Figura 3.4).

Existe a possibilidade que não havia tempo suficiente entre o tratamento com a actinomicina D e a remoção por micropipeta do DNA, no grupo TN (AD-C), para o ovócito detectar os danos em seu genoma (bloqueio do ciclo celular por *checkpoints* e indução do reparo do DNA). Neste caso não seria possível afirmar que houve reversão do processo de resposta aos danos no DNA, embora o questionamento não interfira na hipótese da especificidade da actinomicina D sobre os cromossomos do gameta. No entanto, a identificação de tais danos ocorre nos ovócitos de anfíbios cerca de 20 minutos após o insulto (YOU et al., 2007), período esse muito inferior ao intervalo mínimo entre o tratamento com actinomicina D e o início da remoção do DNA dos gametas (>1h). Apesar da possibilidade de haver diferenças espécie-específicas, pode ser considerado plausível que houve o

reconhecimento dos efeitos da actinomicina D nos cromossomos antes da enucleação por micropipeta.

Tabela 3.4 - Desenvolvimento *in vivo* de embriões obtidos por transferência nuclear de células somáticas em ovócitos enucleados pela actinomicina D.

Grupo	Embriões transferidos (receptoras)	Prenhez n (%) [*]			
		35 dias	60 dias	90 dias	290 dias
TN(C)	16 (12)	5 (31,25) ^a	2 (12,50) ^a	2 (12,50) ^a	1 (06,25) ^a
TN(AD-C)	27 (22)	10 (37,03) ^a	3 (11,11) ^a	2 (07,40) ^a	0 (00,00) ^a

Duas réplicas. TN(C): Ovócitos não tratados e reconstruído por TN; TN (AD-C): Ovócitos tratado com 5 μ g mL⁻¹ de actinomicina D por quinze minutos, enucleado por micropipeta e reconstruído por TN. * Percentual sobre o número de embriões transferidos.



Figura 3.3 - Bezerra obtida no grupo TN (C) no experimento da enucleação de ovócitos com actinomicina D (A e B). TN(C): Ovócitos não tratados e reconstruído por TN.

Para avaliar a generalidade dos dados obtidos com a actinomicina D, foi testada a capacidade de outro inibidor de metabolismo de DNA, a mitomicina C, para enuclear quimicamente ovócitos bovinos. A mitomicina C é um inibidor irreversível de replicação de DNA, que causa *crosslinking* no DNA e impede a associação de DNA polimerases e o DNA (TOMASZ & PALOM, 1997). Caso a mitomicina C apresente resultados semelhantes a actinomicina D, a possibilidade de que os resultados são fruto de alguma característica peculiar da actinomicina D fica reduzida.

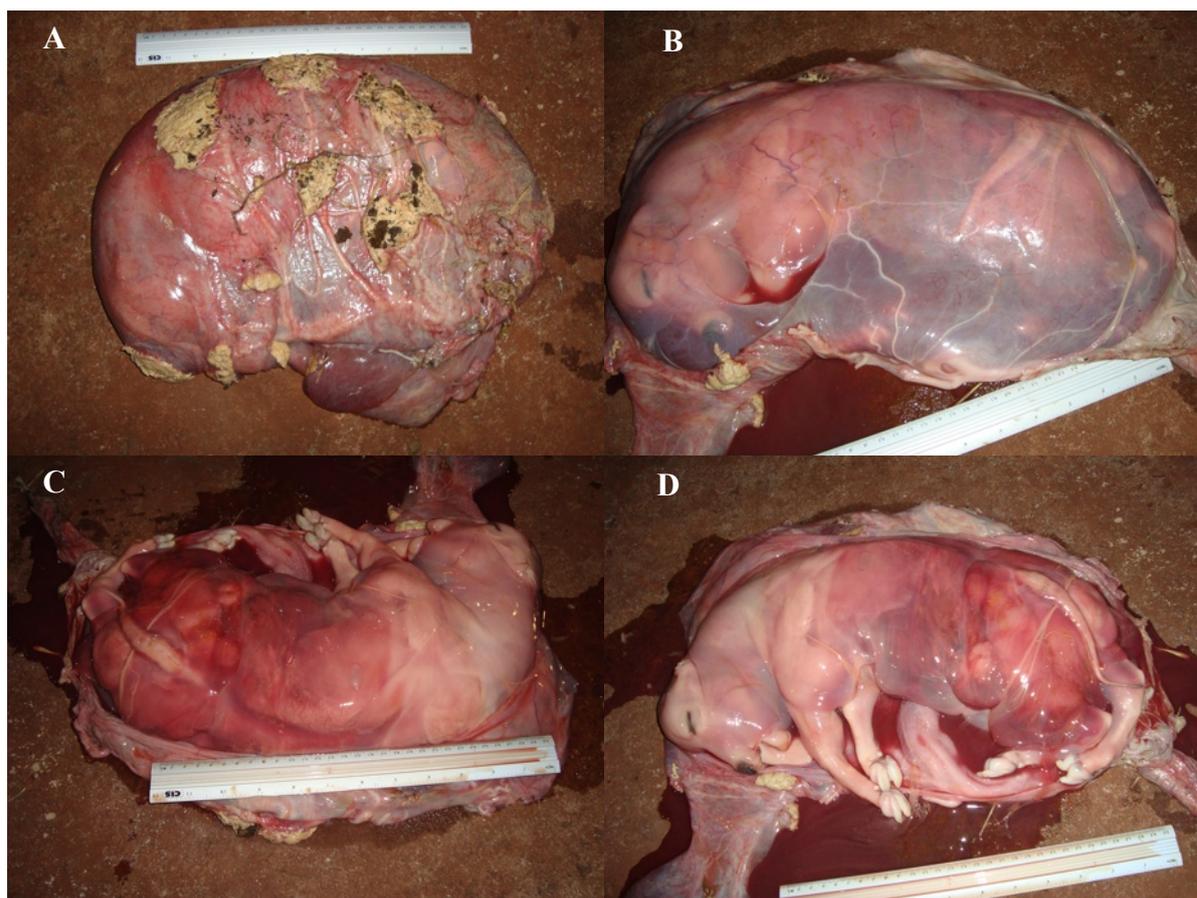


Figura 3.4 - Gestação obtida a partir de ovócito tratado com actinomicina D, enucleado por micropipeta, e reconstruído com células somática. A) Placenta. B) Saco vitelínico. C e D) Visão dorsal e lateral do feto, respectivamente.

O primeiro objetivo foi determinar as condições pelas quais o tratamento com mitomicina C seria capaz de bloquear o desenvolvimento embrionário bovino após a ativação partenogenética. Como a mitomicina C é frequentemente utilizada na concentração de $10\mu\text{g mL}^{-1}$, testou-se esse valor por diferentes períodos de incubação (Tabela 3.5).

O tratamento de ovócitos com mitomicina C não afetou a taxa de maturação de ovócitos, com exceção do grupo tratado por 1h. Em relação a taxa de clivagem, os grupos tratados por 0,5h e 1,5h apresentaram taxas semelhantes ao controle não tratado. Os grupos tratados por 1,0h e 2,0h apresentaram taxas inferiores de clivagem (Tabela 3.5).

A mitomicina C nas condições testadas demonstrou ser eficiente no bloqueio do desenvolvimento embrionário (Tabela 3.5). Foi observada uma resposta tempo de incubação-dependente, embora nenhum dos tratamentos tenha sido capaz de impedir completamente a formação dos blastocistos. Os tratamentos com 1,5h e 2,0h de duração apresentaram

desempenho semelhante, onde o menor tempo de incubação foi escolhido para os experimentos seguintes (Tabela 3.5).

Tabela 3.5 - Desenvolvimento embrionário partenogênético bovino após o tratamento de ovócitos com mitomicina C.

Concentração de MMC (horas)	MII (%)	Clivagem (%)	Blastocisto (%)	
			D7	D8
0,0 (2,0h)	187/218 (85,77) ^a	159/218 (72,93) ^a	61/218 (27,98) ^a	74/218 (33,94) ^a
10,0 (0,5h)	181/211 (85,78) ^a	137/211 (64,92) ^{a,b}	12/211 (05,68) ^b	16/211 (07,58) ^b
10,0 (1,0h)	147/202 (72,77) ^b	122/202 (60,39) ^{b,c}	04/202 (01,98) ^b	05/202 (02,47) ^c
10,0 (1,5h)	182/217 (83,87) ^a	144/217 (66,35) ^{a,b}	00/217 (00,00) ^c	01/217 (00,46) ^c
10,0 (2,0h)	160/195 (82,05) ^a	105/195 (53,84) ^c	01/195 (00,51) ^c	01/195 (00,51) ^c

Cinco réplicas. MII: Ovócitos com o primeiro corpúsculo polar após vinte e quatro horas de maturação *in vitro*. Clivagem: embriões contendo duas ou mais células após 48 de ativação. D7/D8: Blastocistos após sete e oito dias de cultivo *in vitro*, respectivamente. Diferentes sobrescritos (a,b,c) na coluna diferem significativamente ($p < 0,05$). MMC: mitomicina C. Concentração em $\mu\text{g mL}^{-1}$.

O objetivo seguinte foi determinar a viabilidade dos embriões reconstruídos pela TN com células somáticas após terem sido enucleados pela Mitomicina C. A taxa de fusão não sofreu influência do tratamento com mitomicina C (Tabela 3.6.). Ao contrário dos resultados do experimento anterior (Tabela 3.5), o tratamento com mitomicina C reduziu a capacidade de desenvolvimento nos grupos P (MMC) e TN (MMC). No entanto, o grupo TN (MMC-C) apresentou taxa de clivagem semelhante aos controles P(C) e TN (C). O desenvolvimento embrionário até a fase de blastocisto foi inferior nos grupos TN (C) e TN (MMC-C) em relação ao controle P (C), enquanto que o grupo TN (MMC) foi semelhante ao P (MMC). Contudo, a enucleação por micropipeta dos ovócitos tratados com mitomicina C recuperou completamente a capacidade de desenvolvimento *in vitro* (Tabela 3.6).

Parte dos embriões que desenvolveram até fase de blastocisto foram transferidos para receptoras previamente sincronizadas (Tabela 3.7). Do total de estruturas transferidas, cinco prenhez foram confirmadas um mês após a transferência. Mais importante, uma gestação inicial foi obtida no grupo TN (MMC). Das gestações iniciais apenas uma prenhez pertencente ao grupo TN (C) desenvolveu mais do que 60 dias (Tabela 3.7). No entanto, a receptora apresentou hidropsia e sofreu aborto com 173 dias de gestação.

Tabela 3.6 - Desenvolvimento embrionário a partir de ovócitos tratados com mitomicina C e reconstruídos com células somáticas.

Grupo	Fusão (%)	Clivagem (%)	Blastocisto (%)	
			D7	D8
P (C)	NA	109/126 (86,50) ^a	46/126 (36,50) ^a	60/126 (47,61) ^a
P (MMC)	NA	85/128 (66,40) ^b	00/128 (00,00) ^c	00/128 (00,00) ^d
TN (C)	114/139 (82,01) ^a	99/114 (86,84) ^a	25/114 (21,92) ^b	30/114 (26,31) ^b
TN (MMC)	93/121 (76,85) ^a	57/88 (64,77) ^b	02/88 (02,27) ^c	04/88 (04,54) ^c
TN (MMC-C)	104/134 (77,61) ^a	76/97 (78,35) ^a	22/97 (22,68) ^b	24/97 (24,74) ^b

Cinco réplicas. NA: Não aplicável. Fusão: número de ovócitos fusionados à célula somáticas. Clivagem: embriões contendo duas ou mais células após 48 de ativação. D7/D8: Blastocistos após sete e oito dias de cultivo *in vitro*, respectivamente. Diferentes sobrescritos (a,b,c,d) na coluna diferem significativamente ($p < 0,05$). MMC: mitomicina C. P (C): Controle partenogenético; P (MMC): Controle partenogenético tratado com $10\mu\text{g mL}^{-1}$ de mitomicina C por 1,5h; TN (C): Ovócitos enucleado por micropipeta e reconstruído por TN. TN (MMC): Ovócitos tratado com $10\mu\text{g mL}^{-1}$ de mitomicina C por 1,5h e utilizado para TN; TN (MMC-C): Ovócitos tratado com $10\mu\text{g mL}^{-1}$ de mitomicina C por 1,5h, enucleados por micropipeta e reconstruído por TN.

Tabela 3.7 - Desenvolvimento *in vivo* de embriões obtidos pela transferência nuclear de células somáticas em ovócitos enucleados pela Mitomicina C.

Grupo	Embriões transferidos	Receptoras	Prenhez n (%) [*]	
			35 dias	60 dias
TN(C)	11	10	2 (18,18) ^a	1 (09,09) ^a
TN(MMC)	1	1	1 (100,00) ^b	0 (00,00) ^a
TN(MMC-C)	9	8	2 (22,22) ^a	0 (00,00) ^a

Duas réplicas. TN(C): Ovócitos não tratados e reconstruído por TN. TN (MMC): Ovócitos tratado com $10\mu\text{g mL}^{-1}$ de mitomicina C por 1,5h e utilizado para TN; TN (MMC-C): Ovócitos tratado com $10\mu\text{g mL}^{-1}$ de mitomicina C por 1,5h, enucleado por micropipeta e reconstruído por TN. * Percentual sobre o número de embriões transferidos.

Os resultados descritos acima determinaram a principal causa do baixo desenvolvimento embrionário após a TN com ovócitos enucleados pela actinomicina D: a presença do DNA tratado dentro do gameta (Figura 3.5). Diversas evidências corroboram esta

hipótese. A ativação partenogenética após a reconstrução dos ovócitos tratados pela TN com células somáticas produz embriões com baixa viabilidade e com maior atividade de *Caspase 3*. A retirada específica do DNA do gameta tratado com actinomicina D recupera o potencial de desenvolvimento e produz embriões que, sob todas as avaliações realizadas são indistinguíveis dos controles. Em relação a avaliação *in vivo*, a incapacidade de obter nascimentos a partir de gametas tratados com o inibidor provavelmente se deve, provavelmente, a baixa eficiência da clonagem por TN com células somáticas. A taxa média de nascimento de bovinos através da TN com células somáticas é cerca de 5% dos embriões transferidos (WILMUT et al., 2002).

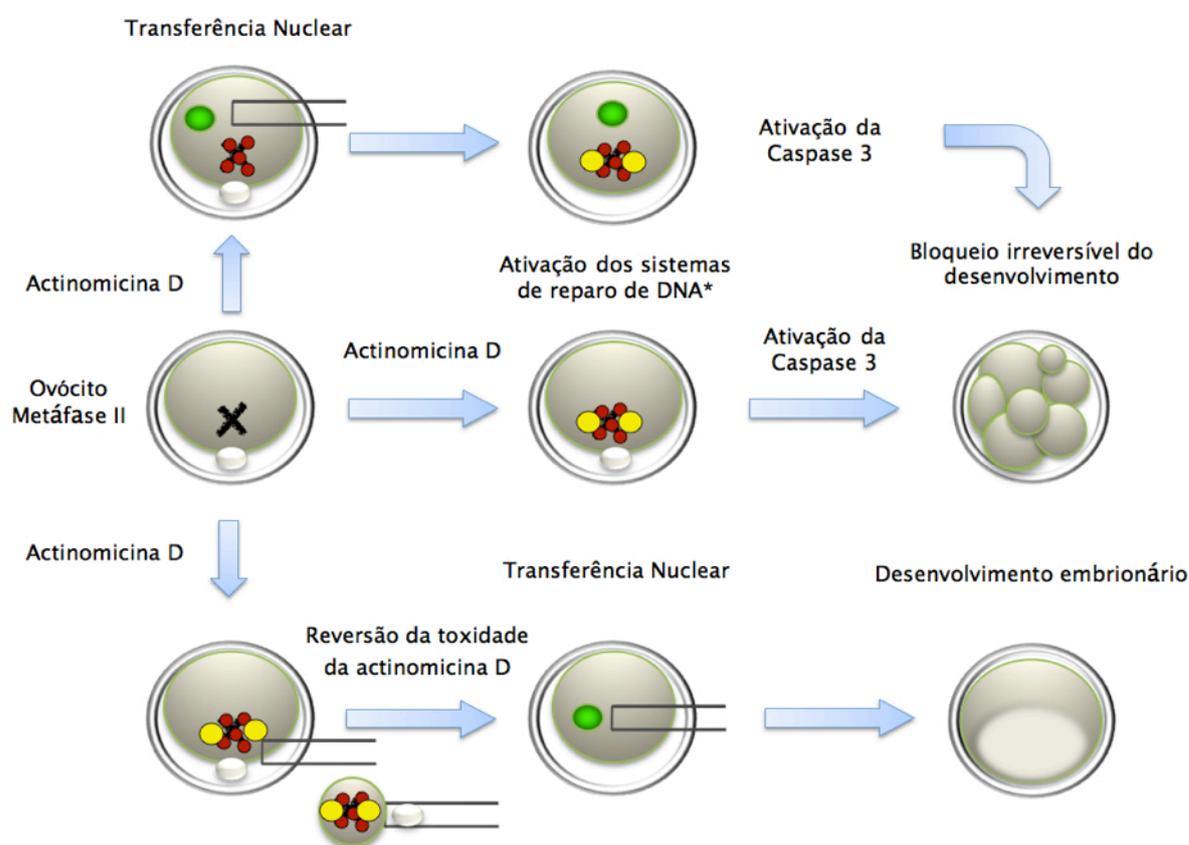


Figura 3.5 - Efeito da enucleação pela actinomicina D no desenvolvimento embrionário. O tratamento de ovócitos bovinos destinados a ativação partenogenética impede o desenvolvimento embrionário. Este bloqueio não pode ser revertido pela introdução de uma célula somática pela transferência nuclear. C) A remoção do DNA tratado com actinomicina e a reconstrução do ovócito pela TN recupera o potencial de desenvolvimento. *Não demonstrado no trabalho.

Outro indício importante do modelo da toxicidade aqui proposto vem dos relatos que demonstraram a enucleação com actinomicina D de células somáticas transformadas (HIKAWA & TAKENAKA, 1996, 1997; BAYONA-BAFALUY et al., 2003, 2005), que são reconhecidamente mais resistentes aos processos de bloqueio do ciclo celular ou MCP por apoptose (HANAHAN & WEINBERG, 2000; JACKSON-GRUSBY et al., 2001). Apesar dos autores considerarem que a transformação das células não é necessária para manter a viabilidade celular após o tratamento com a actinomicina D (BAYONA-BAFALUY et al., 2003), este fato ainda não foi demonstrado experimentalmente.

O uso da mitomicina C produziu resultados semelhantes a actinomicina D sobre o desenvolvimento embrionário, e o fato sugere que os dados em conjunto são a manifestação do mecanismo fisiológico de resposta aos danos no DNA. Por isso, os resultados indicam que investigações futuras devem buscar condições que evitem a detecção do DNA tratado no gameta. Nestas condições, a enucleação pela actinomicina D deve se tornar simples, eficiente, e sem toxicidade.

3.4. CONCLUSÕES

Os recentes avanços obtidos no desenvolvimento do protocolo de enucleação química de ovócitos pela actinomicina D não recuperaram a viabilidade dos embriões reconstruídos por TN. Apesar do progresso em relação à maturação dos gametas e a sugestão de que o tratamento com o antibiótico não afeta diretamente o citoplasma receptor, a presença dos cromossomos danificados impede o prosseguimento do desenvolvimento embrionário.

Os grupos TN (AD-C) e TN (MMC-C) sugerem que o efeito da actinomicina D sobre o DNA do gameta seja a principal causa da toxidez do tratamento nos embriões. As evidências experimentais sugerem que torna-se necessário buscar formas que impeçam o ovócito de identificar os efeitos do tratamento com actinomicina D sobre o seu DNA. Abordagens genéticas (e posteriormente por meios químicos) poderiam elucidar qual (is) mecanismo (s) evitaria (m) o reconhecimento dos danos ao DNA e favoreceriam o desenvolvimento embrionário após a TN com ovócitos tratados com actinomicina D ou mitomicina C.

3.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, J.M. Ways of dying: multiple pathways to apoptosis. **Genes and Development**, v.17, p.2481-2495, 2003.

ASHWOOD, M.J.; EDWARDS, R.G. DNA repair by oocytes. **Molecular Human Reproduction**, v.2, n.1, p.46-51, 1996.

BARBERI, T.; KLIVENYI, P.; CALINGASAN, N.Y.; LEE, H.; KAWAMATA, H.; LOONAM, K.; PERRIER, A.L.; BRUSES, J.; RUBIO, M.E.; TOPF, N.; TABAR, V.; HARRISON, N.L.; BEAL, M.F.; MOORE, M.A.; STUDER, L. Neural subtype specification of fertilization and nuclear transfer embryonic stem cells and application in parkinsonian mice. **Nature Biotechnology**, v.21, n.10, p.1200-1207, 2003.

BAYONA-BAFALUY, M.P.; MANFREDI, G.; MORAES, C.T. A chemical enucleation method for the transfer of mitochondrial DNA to rho(o) cells. **Nucleic Acids Research**, v.31, n.16, p.e98, 2003.

BAYONA-BAFALUY, M.P.; MULLER, S.; MORAES, C.T. Fast adaptive coevolution of nuclear and mitochondrial subunits of ATP synthetase in orangutan. **Molecular Biology and Evolution**, v.22, n.3, p.716-724, 2005.

BORDIGNON, V.; SMITH, L.C. Ultraviolet-irradiated spermatozoa activate oocytes but arrest preimplantation development after fertilization and nuclear transplantation in cattle. **Biology of Reproduction**, v.61, n.6, p.1513-1520, 1999.

BRAD, A.M.; HENDRICKS, K.E.; HANSEN, P.J. The block to apoptosis in bovine two-cell embryos involves inhibition of caspase-9 activation and caspase-mediated DNA damage. **Reproduction**, v.134, n.6, p.789-797, 2007.

BRADSHAW, J.; JUNG, T.; FULKA, J. JR.; MOOR, R.M. UV irradiation of chromosomal DNA and its effect upon MPF and meiosis in mammalian oocytes. **Molecular Reproduction and Development**, v.41, n.4, p.503-512, 1995.

BROMHALL, J.D. Nuclear transplantation in the rabbit egg. **Nature**, v.258, n.5537, p.719-722, 1975.

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, p.497-502, 2007.

CHAN, A.P.; GURDON, J.B. Nuclear transplantation from stably transfected cultured cells of *Xenopus*. **International Journal of Developmental Biology**, v.40, n.2, p.441-451, 1996.

CHANDOLIA, R.K.; PELTIER, M.R.; TIAN, W.; HANSEN, P.J. Transcriptional control of development, protein synthesis, and heat-induced heat shock protein 70 synthesis in 2-cell bovine embryos. **Biology of Reproduction**, v.61, n.6, p.1644-1648, 1999.

CHOONG, M.L.; YANG, H.; LEE, M.A.; LANE, D.P. Specific activation of the p53 pathway by low dose actinomycin D: a new route to p53 based cyclotherapy. **Cell Cycle**, v.8, n.17, p.2810-2818, 2009.

COOPER, H.L.; BRAVERMAN, R. The mechanism by which actinomycin D inhibits protein synthesis in animal cells. **Nature**, v.269, p.527-529, 1977.

EAKIN, G.S.; BEHRINGER, R.R. Tetraploid development in the mouse. **Developmental Dynamics**, v.228, n.4, p.751-766, 2003.

EGLI, D.; BIRKHOFF, G.; EGGAN, K. Mediators of reprogramming: transcription factors and transitions through mitosis. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v.9, p.505-516, 2008.

FATEHI, A.N.; BEVERS, M.M.; SCHOEVERS, E.; ROELEN, B.A.; COLENBRANDER, B.; GADELLA, B.M. DNA damage in bovine sperm does not block fertilization and early embryonic development but induces apoptosis after the first cleavages. **Journal of Andrology**, v.27, n.2, p.176-188, 2006.

FULKA, J. JR.; LOI, P.; FULKA, H.; PTAK, G.; NAGAI, T. Nucleus transfer in mammals: noninvasive approaches for the preparation of cytoplasts. **Trends in Biotechnology**, v.22, n.6, p.279-283, 2004.

FULKA, J. JR.; FULKA, H. Somatic cell nuclear transfer (SCNT) in mammals: the cytoplasm and its reprogramming activities. In: SUTOVSKY, P. (Ed) **Somatic Cell Nuclear Transfer**. 1ed. Landes Science. 2007. p.93-102.

GASARYAN, K.G.; HUNG, N.M.; NEYFAKH, A.A.; IVANENKOV, V.V. Nuclear transplantation in teleost *Misgurnus fossilis* L. **Nature**, v.280, n.5723, p.585-587, 1979.

GJØRRET, J.O.; KNIJN, H.M.; DIELEMAN, S.J.; AVERY, B.; LARSSON, L.I.; MADDOX-HYTTEL, P. Chronology of apoptosis in bovine embryos produced in vivo and in vitro. **Biology of Reproduction**, v.69, n.4, p.1193-1200, 2003.

GJØRRET, J.O.; WENGLER, J.; MADDOX-HYTTEL, P.; KING, W.A. Chronological appearance of apoptosis in bovine embryos reconstructed by somatic cell nuclear transfer from quiescent granulosa cells. **Reproduction in Domestic Animals**, v.40, n.3, p.210-216, 2005.

GOLDBERG, I.H.; RABINOWITZ, M.; REICH, E. Basis of actinomycin action. I. DNA binding and inhibition of RNA-polymerase synthetic reactions by actinomycin. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.48, p.2094-2101, 1962.

GURDON, J.B.; BYRNE, J.A. The first half-century of nuclear transplantation. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.100, n.14, p.8048-8052, 2003.

GURDON, J.B. From nuclear transfer to nuclear reprogramming: the reversal of cell differentiation. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v.22, p.1-22, 2006.

GURDON, J.B.; MELTON, D.A. Nuclear reprogramming in cells. **Science**, v.322, n.5909, p.1811-1815, 2008.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R.A. The hallmarks of cancer. **Cell**, v.100, n.1, p.57-70, 2000.

HARDY, K. Apoptosis in the human embryo. **Reviews in Reproduction**, v.4, n.3, p.125-134, 1999.

HIETANEN, S.; LAIN, S.; KRAUSZ, E.; BLATTNER, C.; LANE, D.P. Activation of p53 in cervical carcinoma cells by small molecules. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.97, n.15, p.8501-8506, 2000.

HIKAWA, N.; TAKENAKA, T. Improved method for producing neuronal hybrids using emetine and actinomycin D. **Brain Research**, v.734, n.1-2, p.345-348, 1996.

HIKAWA, N.; TAKENAKA, T. Method for production of neuronal hybridoma using emetine and actinomycin D. **Brain Research Protocols**, v.1, n.3, p.224-226, 1997.

HOCHEDLINGER, K.; BLELLOCH, R.; BRENNAN, C.; YAMADA, Y.; KIM, M.; CHIN, L.; JAENISCH, R. Reprogramming of a melanoma genome by nuclear transplantation. **Genes and Development**, v.18, n.15, p.1875-1885, 2004.

HOCHEDLINGER, K.; JAENISCH, R. Nuclear reprogramming and pluripotency. **Nature**, v.441, n.7097, p.1061-1067, 2006.

HOLM, P.; BOOTH, P.J.; SCHMIDT, M.H.; GREVE, T.; CALLESEN, H. High bovine blastocyst development in a static in vitro production system using SOFaa medium supplemented with sodium citrate and myo-inositol with or without serum-proteins. **Theriogenology**, v.52, n.4, p.683-700, 1999.

HOPPE, P.C.; ILLMENSEE, K. Microsurgically produced homozygous-diploid uniparental mice. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.74, n.12, p.5657-5661, 1977.

ILLMENSEE, K.; HOPPE, P.C. Nuclear transplantation in *Mus musculus*: developmental potential of nuclei from preimplantation embryos. **Cell**, v.23, n.1, p.9-18, 1981.

JACKSON-GRUSBY, L.; BEARD, C.; POSSEMATO, R.; TUDOR, M.; FAMBROUGH, D.; CSANKOVSKI, G.; DAUSMAN, J.; LEE, P.; WILSON, C.; LANDER, E.; JAENISCH, R. Loss of genomic methylation causes p53-dependent apoptosis and epigenetic deregulation. **Nature Genetics**, v.27, n.1, p.31-39, 2001.

JURISICOVA, A.; ACTON, B.M. Deadly decisions: the role of genes regulating programmed cell death in human preimplantation embryo development. **Reproduction**, v.128, n.3, p.281-291, 2004.

KUETEMEYER, K.; LUCAS-HAHN, A.; PETERSEN, B.; LEMME, E.; HASSEL, P.; NIEMANN, H.; HEISTERKAMP, A. Combined multiphoton imaging and automated functional enucleation of porcine oocytes using femtosecond laser pulses. **Journal of Biomedical Optics**, v.15, n.4, 046006, 2010.

KUROIWA, Y.; KASINATHAN, P.; SATHIYASEELAN, T.; JIAO, J.A.; MATSUSHITA, H.; SATHIYASEELAN, J.; WU, H.; MELLQUIST, J.; HAMMITT, M.; KOSTER, J.; KAMODA, S.; TACHIBANA, K.; ISHIDA, I.; ROBL, J.M. Antigen-specific human polyclonal antibodies from hyperimmunized cattle. **Nature Biotechnology**, v.27, n.2, p.173-181, 2009.

KUROKAWA, M.; KORNBLUTH, S. Caspases and kinases in a death grip. **Cell**, v.138, n.5, p.838-854, 2009.

LEGERSKI, R.J.; PENKALA, J.E.; PETERSON, C.A.; WRIGHT, D.A. Repair of UV induced lesions in *Xenopus laevis* oocytes. **Molecular and Cellular Biology**, v.7, n.12, p.4317-4323, 1987.

LI, J.; ISHII, T.; FEINSTEIN, P.; MOMBAERTS, P. Odorant receptor gene choice is reset by nuclear transfer from mouse olfactory sensory neurons. **Nature**, v.428, n.6981, p.393-399, 2004a.

LI, G.P.; WHITE, K.L.; BUNCH, T.D. Review of enucleation methods and procedures used in animal cloning: state of the art. **Cloning and Stem Cells**, v.6, n.1, p.5-13, 2004b.

LJUNGMAN, M.; LANE, D.P. Transcription – guarding the genome by sensing DNA damage. **Nature Reviews Cancer**, v.4, p.727-737, 2004.

MCGARRY, T.J.; BONAGUIDI, M.; LYASS, L.; KESSLER, J.A.; BODILY, J.M.; DOGLIO, L. Enucleation of feeder cells and egg cells with psoralens. **Developmental Dynamics**, v.238, n.10, p.2614-2621, 2009.

MCGRATH, J.; SOLTER, D. Nuclear transplantation in the mouse embryo by microsurgery and cell fusion. **Science**, v.220, n.4603, p.1300-1302, 1983.

MCGRATH, J.; SOLTER, D. Inability of mouse blastomere nuclei transferred to enucleated zygotes to support development in vitro. **Science**, v.226, n.4680, p.1317-1319, 1984.

MEISSNER, A.; JAENISCH, R. Mammalian nuclear transfer. **Developmental Dynamics**, v.235, n.9, p.2460-2469, 2006.

MODLINSKI, J.A. Haploid mouse embryos obtained by microsurgical removal of one pronucleus. **Journal of Embryology & Experimental Morphology**, v.33, n.4, p.897-905, 1975.

MODLINSKI, J.A. Transfer of embryonic nuclei to fertilised mouse eggs and development of tetraploid blastocysts. **Nature**, v.273, n.5662, p.466-467, 1978.

MODLINSKI, J.A. Preimplantation development of microsurgically obtained haploid and homozygous diploid mouse embryos and effects of pretreatment with Cytochalasin B on enucleated eggs. **Journal of Embryology & Experimental Morphology**, v.60, p.153-161, 1980.

MODLINSKI, J.A. The fate of inner cell mass and trophectoderm nuclei transplanted to fertilized mouse eggs. **Nature**, v.292, n.5821, p.342-343, 1981.

MOURA, Marcelo Tigre. **Utilização da actinomicina D como método de enucleação química de ovócitos bovinos destinados à Transferência nuclear**. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília, 2007. 60p. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília, 2007a.

MOURA, M.T. Enucleação de ovócitos mamíferos destinados à transferência nuclear. **Anais da Academia Pernambucana de Ciências Agrônomicas** v. 4, p.126-146, 2007b.

MOURA, M.T.; DE SOUSA, R.V.; DE OLIVEIRA LEME, L; RUMPF, R. Analysis of actinomycin D treated cattle oocytes and their use for somatic cell nuclear transfer. **Animal Reproduction Science**, v.109, n.1-4, p.40-49, 2008.

NAGY, A.; ROSSANT, J.; NAGY, R.; ABRAMOW-NEWERLY, W.; RODER, J.C. Derivation of completely cell culture-derived mice from early-passage embryonic stem cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.90, n.18, p.8424-8428, 1993.

PAULA-LOPES, F.F.; HANSEN, P.J. Apoptosis is an adaptive response in bovine preimplantation embryos that facilitates survival after heat shock. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.295, n.1, p.37-42, 2002.

PENG, A.; LEWELLYN, A.L.; MALLER, J.L. DNA damage signaling in early *Xenopus* embryos. **Cell Cycle**, v.7, n.1, p.3-6, 2008.

PRATHER, R.S.; BARNES, F.L.; SIMS, M.M.; ROBL, J.M.; EYESTONE, W.H.; FIRST, N.L. Nuclear transplantation in the bovine embryo: assessment of donor nuclei and recipient oocyte. **Biology of Reproduction**, v.37, n.4, p.859-866, 1987.

PRATHER, R.S.; SIMS, M.M.; FIRST, N.L. Nuclear transplantation in early pig embryos. **Biology of Reproduction**, v.41, n.3, p.414-418, 1989.

RIDEOUT, W.M. 3RD; HOCHEDLINGER, K; KYBA, M.; DALEY, G.Q.; JAENISCH, R. Correction of a genetic defect by nuclear transplantation and combined cell and gene therapy. **Cell**, v.109, n.1, p.17-27, 2002.

SCHNIEKE, A.E.; KIND, A.J.; RITCHIE, W.A.; MYCOCK, K.; SCOTT, A.R.; RITCHIE, M.; WILMUT, I.; COLMAN, A.; CAMPBELL, K.H. Human factor IX transgenic sheep produced by transfer of nuclei from transfected fetal fibroblasts. **Science**, v.278, n.5346, p.2130-2133, 1997.

SHIMURA, T.; INOUE, M.; TAGA, M.; SHIRAISHI, K.; UEMATSU, N.; TAKEI, N.; YUAN, Z.M.; SHINOHARA, T.; NIWA, O. p53-dependent S-phase damage checkpoint and pronuclear cross talk in mouse zygotes with X-irradiated sperm. **Molecular and Cellular Biology**, v.22, n.7, p.2220-2228, 2002.

SOBELL, H.M. Actinomycin and DNA transcription. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.82, n.16, p.5328-5331, 1985.

STICE, S.L.; ROBL, J.M. Nuclear reprogramming in nuclear transplant rabbit embryos. **Biology of Reproduction**, v.39, p.657-664, 1988.

TILLY, J.L. Commuting the death sentence: how oocytes strive to survive. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v.2, n.11, p.838-848, 2001.

TOMASZ, M.; PALOM, Y. The mitomycin bioreductive antitumor agents: cross-linking and alkylation of DNA as the molecular basis of their activity. **Pharmacology & Therapeutics**, v.76, n.1-3, p.73-87, 1997.

TOYOSHIMA, M.; SHIMURA, T.; ADIGA, S.K.; TAGA, M.; SHIRAISHI, K.; INOUE, M.; YUAN, Z.M.; NIWA, O. Transcription-independent suppression of DNA synthesis by p53 in sperm-irradiated mouse zygotes. **Oncogene**, v.24, n.20, p.3229-3235, 2005.

TRASK, D.K.; MULLER, M.T. Stabilization of type I topoisomerase-DNA covalent complexes by actinomycin D. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.85, n.5, p.1417-1421, 1988.

VAJTA, G.; LEWIS, I.M.; HYTTEL, P.; THOUAS, G.A.; TROUNSON, A.O. Somatic cell cloning without micromanipulators. **Cloning**, v.3, n.2, p.89-95, 2001.

WAKAMATSU, Y.; JU, B.; PRISTYAZNHYUK, I.; NIWA, K.; LADYGINA, T.; KINOSHITA, M.; ARAKI, K.; OZATO, K. Fertile and diploid nuclear transplants derived from embryonic cells of a small laboratory fish, medaka (*Oryzias latipes*). **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.98, n.3, p.1071-1076, 2001.

WELLS, D.N.; MISICA, P.M.; TERVIT, H.R.; VIVANCO, W.H. Adult somatic cell nuclear transfer is used to preserve the last surviving cow of the Enderby Island cattle breed. **Reproduction, Fertility and Development**, v.10, n.4, p.369-378, 1998.

WESTHUSIN, M.E.; LONG, C.R.; SHIN, T.; HILL, J.R.; LOONEY, C.R.; PRYOR, J.H.; PIEDRAHITA, J.A. Cloning to reproduce desired genotypes. **Theriogenology**, v.55, n.1, p.35-49, 2001.

WILLADSEN, S.M. Nuclear transplantation in sheep embryos. **Nature**, v.320, n.6057, p.63-65, 1986.

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.; BEAUJEAN, N.; DE SOUSA, P.A.; DINNYES, A.; KING, T.J.; PATERSON, L.A.; WELLS, D.N.; YOUNG, L.E. Somatic cell nuclear transfer. **Nature**, v.419, n.6907, p.583-586, 2002.

YOU, Z.; BAILIS, J.M.; JOHNSON, S.A.; DILWORTH, S.M.; HUNTER, T. Rapid activation of ATM on DNA flanking double-strand breaks. **Nature Cell Biology**, v.9, n.11, p.1311-1318, 2007.

YUAN, J.; KROEMER, G. Alternative cell death mechanisms in development and beyond. **Genes and Development**, v.24, n.23, p.2592-2602, 2010.

CAPÍTULO 4 - TENTATIVAS DE INDUZIR A PLURIPOTÊNCIA POR FATORES DEFINIDOS EM CÉLULAS SOMÁTICAS NA AUSÊNCIA DE OCT4 EXÓGENO.

Marcelo Tigre Moura^(1,2,4), Carolina Madeira Lucci⁽¹⁾, Rodolfo Rumpff^(1,2,3), e Kevin Eggan⁽⁴⁾

⁽¹⁾ Universidade de Brasília (UnB), Brasília, DF.

⁽²⁾ Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF.

⁽³⁾ Geneal Biotecnologia Animal, Uberaba, MG.

⁽⁴⁾ Harvard University, Cambridge, MA - EUA.

RESUMO

O fenômeno de reprogramação epigenética permanece pouco elucidado. A demonstração de que um grupo de fatores de transcrição (*Oct4*, *Sox2*, *cMyc*, e *Klf4*) é capaz de converter células somáticas em pluripotentes demonstra a importância dos genes que os codificam para manutenção e transição entre fenótipos celulares. A expressão dos fatores de transcrição tem sido baseada na integração dos transgenes, fato que pode afetar a qualidade das células reprogramadas. O uso de moléculas que substituam a atividade de cada um dos fatores apresenta grande potencial para eliminar o uso de ácidos nucleicos exógenos para reprogramação. No entanto, não existem moléculas descritas que permitam substituir a atividade do gene *Oct4* durante o processo. O fator de transcrição *Nr5a2* foi testado como uma forma de compensar a falta da atividade do gene *Oct4* ou induzir sua expressão. A expressão do *Nr5a2* reduziu a eficiência de reprogramação e em conjunto com *Sox2* e *Klf4* não reprogramou fibroblastos em células pluripotentes. A titulação do *Nr5a2* para tentar aprimorar a estequiometria viral e o uso do agonista Prostaglandina E2 não permitiu obter células reprogramadas. Como hepatócitos são responsivos a PGE2, testou-se este tipo celular na reprogramação celular com *Nr5a2*. O uso de hepatócitos apresentou resultados inferiores aos fibroblastos, demonstrando a necessidade de ajustar as condições experimentais para esse tipo celular. Em conclusão, o fator de transcrição *Nr5a2* não mostrou ser capaz de substituir o *Oct4* na reprogramação por fatores definidos.

Palavras chave: reprogramação, *Nr5a2*, moléculas, células iPS.

ATTEMPTS TO INDUCE PLURIPOTENCY BY DEFINED FACTORS IN SOMATIC CELLS IN THE ABSENCE OF EXOGENOUS OCT4.

Marcelo Tigre Moura^(1,2,4), Carolina Madeira Lucci⁽¹⁾, Rodolfo Rumpf^(1,2,3), e Kevin Eggan⁽⁴⁾

⁽¹⁾ Universidade de Brasília (UnB), Brasília, DF.

⁽²⁾ Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF.

⁽³⁾ Genial Biotecnologia Animal, Uberaba, MG.

⁽⁴⁾ Harvard University, Cambridge, MA - EUA.

ABSTRACT

The phenomenon of epigenetic reprogramming remains poorly understood. The demonstration that a key set of transcription factors (*Oct4*, *Sox2*, *cMyc*, and *Klf4*) is capable of converting somatic cells into pluripotent ones demonstrates the importance of these genes in maintaining and converting cellular states. The expression of reprogramming factors has been based on integrating vectors, a fact that raises concerns about the quality of reprogrammed cells. The use of small molecules that compensate the activity of each factor holds great potential to completely eliminate the use of exogenous nucleic acids in reprogramming. However, there are no small molecules that can substitute exogenous *Oct4* in the process. The transcription factor *Nr5a2* was tested as an approach to compensate for the activity of *Oct4*. The expression of *Nr5a2* reduced overall reprogramming efficiency and concomitant with only *Sox2* and *Klf4* did not reprogram fibroblasts into pluripotent cells. The titration of *Nr5a2* to improve viral stoichiometry and addition of agonist Prostaglandin E2 did not yield reprogrammed cells. Since hepatocytes are responsive to PGE2, this cell type was used for reprogramming with *Nr5a2*. The use of hepatocytes yielded lower results than fibroblasts, demonstrating the need to adapt experimental conditions to this cell type. In conclusion, *Nr5a2* failed to replace exogenous *Oct4* during reprogramming by defined factors.

Palavras chave: reprogramming, *Nr5a2*, small molecules, iPS cells.

4.1 INTRODUÇÃO

O processo de clonagem por transferência nuclear (TN) reestabelece a totipotência em células somáticas (WILMUT et al., 1997, 2002; CIBELLI et al., 1998; WAKAYAMA et al., 1998; YANG et al., 2007). Os embriões obtidos por TN permitem isolar células-tronco embrionárias (CTE) geneticamente idênticas ao doador e com potencial semelhante de diferenciação às obtidas de embriões frutos de fecundação (EGGAN et al., 2004; LI et al., 2004; BRAMBRINK et al., 2006; WAKAYAMA et al., 2006; BYRNE et al., 2007; EGLI et al., 2007, 2008). Além disso, existem diversas evidências, em modelos animais, de que células obtidas pelo processo de reprogramação epigenética por TN apresentam potencial terapêutico (LANZA et al., 2002, 2004; RIDEOUT et al., 2002, BARBERI et al., 2003; TABAR et al., 2008). No entanto, por questões técnicas e éticas ainda não foi possível isolar linhagens pluripotentes de embriões produzidos por TN em humanos (SIMERLY et al., 2003; STOJKOVIC et al., 2005; HALL et al., 2007; CHUNG et al., 2009). As limitações da TN e a oferta limitada de gametas humanos fomentaram o desenvolvimento de métodos alternativos para converter células somáticas em pluripotentes (HOCHEDLINGER & JAENISCH, 2006).

A fusão entre fibroblastos e células embrionárias demonstrou que o estado indiferenciado torna-se dominante na célula tetraplóide (MILLER & RUDDLE, 1976). Mais recentemente o resultado foi confirmado utilizando CTE de camundongos e humanos (TADA et al., 2001; COWAN et al., 2005; YU et al., 2006), permitindo inclusive identificar alguns aspectos do processo de reprogramação (DO & SCHÖLER, 2004; KIMURA et al., 2004; HAN et al., 2008). No entanto, a produção de células poliplóides dificulta a caracterização *in vitro* e *in vivo* das células reprogramadas, limitando suas aplicações (HOCHEDLINGER & JAENISCH, 2006).

Considerando a capacidade de reprogramação das CTE e a capacidade dos fatores de transcrição, como por exemplo, *MyoD* para conversão de fibroblastos em células musculares (TAPSCOTT et al., 1988; WEINTRAUB et al., 1989), Takahashi & Yamanaka (2006) testaram 24 fatores de transcrição expressos em CTE como candidatos para a reprogramação epigenética sem utilizar ovócitos ou CTE. A demonstração de que a expressão exógena de

apenas quatro fatores de transcrição (*Oct4*, *Sox2*, *cMyc*, e *Klf4*) era suficiente para iniciar a conversão de células diferenciadas em pluripotentes representa um importante passo para o entendimento do processo de reprogramação (MAHERALI et al., 2007; OKITA et al., 2007; TAKAHASHI et al., 2007; YU et al., 2007; LOWRY et al., 2008; PARK et al., 2008a; HANNA et al., 2010). As células reprogramadas, denominadas *induced pluripotent stem* (iPS) demonstraram ser pluripotentes *in vitro* e *in vivo* (MAHERALI et al., 2007; OKITA et al., 2007; WERNIG et al., 2007). Esta nova tecnologia permitiu o estabelecimento de células pluripotentes com genomas de pacientes, fato que iniciou o estabelecimento de novas metodologias de investigação de doenças humanas (DIMOS et al., 2008; PARK et al., 2008b; SAHA & JAENISCH, 2009). Evidências em camundongos demonstram que a abordagem também possui potencial para a terapia celular (HANNA et al., 2007; WERNIG et al., 2008).

A metodologia utilizada para a introdução dos fatores de transcrição foi baseada em vetores virais (retrovírus), devido a alta eficiência de transformação e elevada expressão dos transgenes (TAKAHASHI & YAMANAKA, 2006). No entanto, os vetores são integrados aleatoriamente no genoma, o que pode causar variações na atividade do transgene ou interferência na regulação *Cis* de uma sequência endógena. Ambas situações podem causar alterações no fenótipo celular (HACEIN-BEY-ABINA ET AL., 2003; OKITA et al., 2007). Para evitar que tais fatos influenciem o potencial das células iPS, alternativas que mantenham a integridade do genoma têm sido intensamente investigadas (KISKINIS & EGGAN, 2010).

Diversas metodologias foram descritas como capazes de gerar células iPS sem a integração de DNA exógeno: transfecção sequencial de plasmídeos (OKITA et al., 2008; SITAYEB et al., 2010), uso de adenovírus (STADFELD et al., 2008), vírus Sendai (FUSAKI et al., 2009), transdução de proteínas (KIM et al., 2009; ZHOU et al., 2009), sistema *Piggybac* (SOLDNER et al., 2009; WOLTJEN et al., 2009), e vetores episomais (YU et al., 2009). A busca por métodos alternativos de reprogramação demonstrou que a integração dos vetores não é necessária para obtenção de células iPS (OKITA et al., 2008; STADFELD et al., 2008; VARAS et al., 2009; YU et al., 2009). Este resultado exclui a possibilidade de que algum gene ou via de sinalização seja afetado sistematicamente durante o processo aleatório de integração dos transgenes e, portanto, seria necessário para reprogramação. O sistema *Piggybac* em células iPS humanas também determinou que a eliminação da expressão exógena dos transgenes após o processo de reprogramação torna as iPS mais semelhantes às CTE

(SOLDNER et al., 2009). Apesar dos avanços, as metodologias descritas acima apresentam limitações, principalmente devido a eficiência de reprogramação ser relativamente baixa em relação aos métodos virais (KISKINIS & EGGAN, 2010).

Recentemente foi relatado que RNA modificados são capazes de gerar células iPS livres de DNA exógeno com maior eficiência de reprogramação que métodos anteriores e em um intervalo inferior (WARREN et al., 2010). Apesar das células iPS e CTE serem pluripotentes, pouco se sabe sobre os mecanismos fisiológicos necessários para a formação dos diversos tecidos somáticos durante o desenvolvimento. Por isso, a indução da diferenciação de células pluripotentes para um determinado tipo celular *in vitro* é geralmente pouco eficiente e variável entre indivíduos (OSAFUNE et al., 2008). Entretanto, o método de RNA modificados demonstrou ser útil para direcionar as células iPS ao tipo celular desejado, por aumentar a quantidade de RNAs de genes importantes para diferenciação celular (WARREN et al., 2010). No entanto, ainda é necessário reproduzir estes resultados de forma independente.

Outra alternativa em potencial é a identificação de moléculas que possam substituir a função dos fatores de transcrição durante a reprogramação ou induzir a sua expressão nas células somáticas (FENG et al., 2009). Caso seja possível encontrar compostos que compensem a atividade dos quatro fatores (*Oct4*, *Sox2*, *cMyc*, e *Klf4*), seria possível em princípio, realizar a reprogramação apenas por meios químicos. Esta abordagem tem grande apelo pela sua simplicidade, segurança, possibilidade de realizar a reprogramação em larga escala e poder contribuir para o entendimento do processo de reprogramação (ICHIDA et al., 2009).

Diversas moléculas que aumentam a eficiência da reprogramação para pluripotência foram identificadas (HUANGFU et al., 2008a,b; SHI et al., 2008; LI et al., 2009a,b). Mais importante, compostos que compensam a ausência do *cMyc*, *Sox2* e *Klf4* foram descritas (FENG et al., 2009; ICHIDA et al., 2009; LI et al., 2009b; LYSSIOTIS et al., 2009; MAHERALI & HOCHEDLINGER, 2009). Em relação ao *Sox2*, observa-se que existem mecanismos diferentes para substituí-lo, como por exemplo, a inativação das vias MEK/ERK ou TGF- β (ICHIDA et al., 2009; LI et al., 2009b; MAHERALI & HOCHEDLINGER, 2009). Este fato corrobora com a evidência de que a função deste fator de transcrição pode ser compensada para manutenção da pluripotência (MASUI et al., 2007). Recentemente foi

demonstrado que células iPS podem ser obtidas pela transdução com apenas *Oct4* e agentes químicos (LI et al., 2010; ZHU et al., 2010; YUAN et al., 2011).

Apesar dos avanços obtidos, o grande entrave da reprogramação por moléculas é a ausência de compostos que compensem ou induzam a atividade do gene *Oct4*. A prospeção em larga escala de compostos que substituam o produto do gene resultou em algumas moléculas candidatas, embora estes resultados não tenham sido posteriormente confirmados em escalas maiores (EGGAN, K., *dados não publicados*). Apesar de um relato ter descrito ser possível substituir com moléculas que modificam a cromatina (inibidor da histona metiltransferase G9a), as células iPS obtidas sem *Oct4* exógeno foram pouco avaliadas quanto à sua capacidade de diferenciação *in vitro* e *in vivo* (SHI et al., 2008). Outra limitação foi a utilização de células-tronco neurais fetais para reprogramação, que não podem ser obtidas de pacientes.

Oct4 é um fator de transcrição com um papel central na manutenção da pluripotência (BOIANI & SCHÖLER, 2005; BOYER et al., 2005; KELLNER & KIKYO, 2010), expresso apenas em células germinativas e embriões antes da implantação, sendo precocemente silenciado por mecanismos epigenéticos como a metilação de histonas e do DNA em suas sequências regulatórias (FELDMAN et al., 2006; EPSZTEJN-LITMAN et al., 2008; ATHANASIADOU et al., 2010). Devido as características descritas acima, supõem-se que caso seja possível reativar *Oct4* por moléculas, este processo seria indireto. Ao analisar os mecanismos regulatórios em *trans* do gene *Oct4* (KELLNER & KIKYO, 2010), identifica-se um receptor nuclear importante para a manutenção da atividade do *Oct4* (GU et al., 2005; GAO et al., 2006). O gene *Nr5a2* (também conhecido como LRH-1) é expresso em diversos tecidos (FAYARD et al., 2004), fato relevante para tentativas de reprogramação por moléculas. Os receptores nucleares são uma classe de fatores de transcrição naturalmente regulados por moléculas e diversos compostos que aumentem a expressão do *Nr5a2* foram identificados (ZHOU et al., 2005; WHITBY et al., 2006; HADIZADEH et al., 2008). Caso o *Nr5a2* exógeno compense ou induza a atividade do *Oct4* durante a reprogramação, será possível prospectar moléculas para elevar sua expressão. O objetivo do presente trabalho foi avaliar se o produto do gene *Nr5a2* é capaz de substituir a função do gene *Oct4* exógeno na obtenção de células iPS.

4.2. MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1. Isolamento de fibroblastos fetais

Todos os protocolos descritos abaixo foram aprovados pelo comitê de ética da Universidade de Harvard, Cambridge, EUA. Foram utilizados camundongos transgênicos portando o gene repórter *Oct4::GFP* (YEOM et al., 1996). Fêmeas entre 6 e 12 semanas de idade foram submetidas a superovulação com uma injeção subcutânea de 5UI de *pregnant mare serum gonadotropin* (PMSG) e uma dose de 5UI de *human chorionic gonadotropin* (HCG) 48h depois. Em seguida à injeção de HCG, as fêmeas eram acasaladas e a confirmação da cópula feita pela identificação do tampão vaginal na manhã do dia seguinte (E 0.5). No décimo terceiro dia e meio de gestação (E13.5), os fetos eram recuperados para o isolamento de fibroblastos fetais.

As fêmeas eram sacrificadas com CO₂. Uma incisão era feita na região abdominal do animal e feita a remoção do útero. Os fetos eram retirados da placenta e saco vitelínico, lavados em PBS e expostos à luz ultravioleta (UV) na região das cristas gonadais. Este procedimento permite confirmar que o animal possui o transgene *Oct4::GFP* devido a presença de células germinativas primordiais que são GFP positivas. Outra possibilidade era genotipar os animais por PCR. Os fetos selecionados tinham a cabeça e órgãos internos removidos. A carcaça era fragmentada com pinças e tratada com tripsina 0,25% por cinco minutos. Após várias lavagens em solução de tripsina e passagens pelo vórtex, a suspensão de células era lavada e ressuspendida em meio DMEM contendo 20% de soro fetal bovino (SFB). A suspensão de fibroblastos era cultivada ou congelada utilizando uma solução composta pelo meio DMEM contendo 10% de SFB e 10% de Dimetil Sulfoxido (DMSO). Durante o congelamento, os recipientes contendo as células eram mantidos a -80° C por 12h e imersos em nitrogênio líquido (-196° C).

4.2.2. Isolamento de Hepatócitos

O isolamento de hepatócitos foi realizado utilizando um protocolo de perfusão em duas etapas. Camundongos com até quatro meses de idade portando o transgene *Oct4::GFP* foram utilizados para o experimento. O animal era anestesiado, a cavidade abdominal exposta e os órgãos eram afastados para visualização da veia porta e a veia cava inferior. Esta última era fechada com um grampo bem próximo do local do início da perfusão. A veia cava era então canulada com uma borboleta 24G e a veia porta seccionada. Uma solução de EDTA era injetada continuamente (3mL por minuto) durante cinco minutos a partir do local da infusão (Kreb's-Ringer Buffer contendo 154mM NaCl, 6mM KCl, 25mM NaHCO₃, 20mM HEPES, 6mM Glicose e 1mM de EDTA). Em seguida uma enzima com atividade de collagenase era injetada com a mesma pressão da solução anterior (Blenzyme Liberase na concentração de 3,5mg mL⁻¹). O aumento do volume e perda da cor vermelha característica do fígado eram indícios do sucesso no procedimento.

Ao fim da perfusão, o fígado era removido e colocado em uma placa de *petri* contendo meio William's gelado (William's medium contendo 10% de SFB, 2mM de glutamax e antibióticos). Cuidadosamente a cápsula de Glisson era fragmentada e os hepatócitos liberados. A suspensão celular passava por um filtro de 40µM sobre um tubo falcon de 50mL. As células eram lavadas duas vezes em meio william's gelado e ressuspensos em 20mL de meio.

Dois volumes da solução de Percoll (7,8mL de Percoll 100%, 1mL de PBS 10X e 1,2mL de H₂O) eram preparadas, misturadas a 10mL da suspensão celular cada e centrifugadas a 200xg por dez minutos. O sobrenadante era removido e o *pellet* lavado duas vezes com meio *William's*. Após a última lavagem o *pellet* era resuspendido em 25mL de meio *William's* e realizava-se a contagem de células para determinação da concentração da solução. Uma alíquota contendo 30.000 células era depositada em um poço de placas de seis poços tratadas com colágeno I (*Invitrogen*). Cerca de três horas depois do início do cultivo, o meio era trocado por meio *William's* contendo 10% de *Knockout serum replacement* (KSR), 40ng mL⁻¹ de *Hepatocyte growth factor* (HGF) e 20ng mL⁻¹ de *Epidermal growth factor* (EGF). A transdução ocorria até três dias depois do isolamento.

4.2.3. Clonagem gênica

Um plasmídeo contendo o cDNA da sequência de camundongos do gene *Nr5a2* (*LRH-1*) foi obtido da Addgene. Foi utilizada a metodologia de clonagem Gateway (Invitrogen). A sequência codante do gene foi transferida para o “plasmídeo de entrada” após uma reação BP conforme descrito pelo fabricante. O cDNA foi então transferido para o “plasmídeo de destino” pMXs pela reação LR e confirmado por sequenciamento.

4.2.4. Preparação de retrovírus

A produção de retrovírus foi realizada como descrito anteriormente (ICHIDA et al., 2009). Plasmídeos pMXs contendo os cDNA murinos dos genes *Oct4*, *Sox2*, *cMyc*, e *Klf4* foram obtidos da Addgene e do gene *Nr5a2* (*LRH-1*) como descrito acima. Diferentes placas de células Plat-E foram transfectadas com um dos plasmídeos para gerar retrovírus utilizando o reagente Fugene 6 (Roche). Após 24 horas da transfecção o meio das células era trocado e no dia seguinte o meio contendo retrovírus era coletado e filtrado (0,22 μ M).

4.2.5. Transdução de células somáticas

O meio de transdução era obtido pela composição das diversas combinações virais usadas e diluídas 1:1 com meio DMEM. Em seguida era adicionado 5 μ g mL⁻¹ ou 8 μ g mL⁻¹ de polybrene (para fibroblastos e hepatócitos, respectivamente) para aumentar a capacidade infectante das partículas produzidas. À solução de transdução eram adicionados às células em lugar do meio DMEM. Após 12h e 24h, o meio era removido e nova solução de transdução era adicionada às células. Um dia depois da última transdução, o meio era trocado por DMEM. No quarto dia pós-transdução o meio era trocado para meio ES (descrito abaixo).

4.2.6. Meio de cultivo de células-tronco embrionárias

O meio de cultivo de CTE de camundongos (Meio ES) era composto de Knockout-DMEM (KO-DMEM-Gibco), contendo 15% de SFB (Hyclone-Chemicon) ou 15% de KSR, 2mM L-glutamina, 0,1mM β -mercaptoetanol, 1x Aminoácidos não essenciais (Gibco) e 1000

U mL⁻¹ de *leukaemia inhibitory factor* - LIF (ESGRO-Chemicon). O meio era trocado a cada dois dias.

4.2.7. Avaliação da eficiência de reprogramação

No quarto dias após a transdução, as células somáticas infectadas eram repicadas com tripsina 0,25% e cultivadas em placas contendo fibroblastos fetais irradiados em meio ES. Em alguns experimentos, as células foram transfectadas na presença das células irradiadas como descrito abaixo. No décimo quarto e vigésimo oitavo dias pós-transdução era aferido o número de colônias de células com morfologia de células tronco embrionárias e GFP positivas. A eficiência de reprogramação era estimada pela divisão do número de colônias GFP positivas pela quantidade inicial de células plaqueadas.

4.2.8. Isolamento de linhagens iPS primárias

Terminada a avaliação no vigésimo oitavo dia, algumas colônias eram isoladas para posterior caracterização. Com uma pipeta Gilson P200 sob estereomicroscópio, os fibroblastos fetais irradiados que circundam a colônia eram removidos e a fluorescência do colônia confirmada pela exposição à UV. Em seguida, as células iPS eram removidas e depositadas em um microtubo. Por meio de pipetagem a colônia era dissociada e depositada em um poço de uma placa de 6 poços sobre uma camada nova de fibroblastos fetais. Cerca de uma semana depois, a linhagem primária iPS (passagem 0) poderia ser repicada com tripsina 0,25%.

4.2.9. Análise estatística

Os dados referentes às taxas de reprogramação foram analisados pelo teste do Qui-quadrado (χ^2). O nível de significância considerado foi $P < 0,05$.

4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para testar a capacidade do produto do gene *Nr5a2* em substituir o *Oct4* na reprogramação por fatores definidos, a sequência codante do receptor nuclear foi clonada no plasmídeo pMXs utilizando a tecnologia *Gateway* (Invitrogen). O uso de um vetor retroviral (pMXs) garante que quando a célula atinge o fenótipo indiferenciado o transgene é silenciado por metilação de DNA e histonas, como observado em CTE (CHERRY et al., 2000; OKITA et al., 2007; MATSUI et al., 2010). O incorreto silenciamento dos transgenes pode afetar negativamente o fenótipo das células, reduzindo sua capacidade de diferenciação (OKITA et al., 2007).

A primeira etapa da clonagem gênica consistiu no isolamento do cDNA do *Nr5a2* do vetor inicial e adição dos adaptadores por PCR. Estes adaptadores servem como sítios para recombinação (transferência do cDNA entre plasmídeos) e garantem que o gene vai estar na direção correta no vetor seguinte. Em seguida, o produto de PCR foi introduzido no primeiro plasmídeo *Gateway* (*entry plasmid*) por uma reação de recombinação. Uma nova sequência de transferência *Gateway* permitiu introduzir o cDNA do *Nr5a2* no vetor pMXs (*destination plasmid*). A orientação e identidade do cDNA foram confirmadas por sequenciamento.

Para avaliar os possíveis efeitos do *Nr5a2* na indução de pluripotência, o transgene foi introduzido concomitantemente com cDNAs dos genes de reprogramação (*Oct4*, *Sox2*, e *Klf4* ou *Sox2* e *Klf4*) para testar seu efeito no aumento da eficiência de reprogramação e sua capacidade de substituir a atividade do *Oct4* (Tabela 4.1). O plasmídeo pMXs vazio foi utilizado como controle negativo. Com o intuito de melhorar as condições experimentais para facilitar a reprogramação, o meio de cultivo foi formulado com um suplemento definido, o KSR, ao invés do SFB. Este procedimento aumenta substancialmente a eficiência de reprogramação (BLELLOCH et al., 2007; OKADA et al., 2010).

A expressão do gene *Nr5a2* reduziu a eficiência de reprogramação com três fatores (Tabela 4.1). Na tentativa de substituir o gene *Oct4*, apenas uma colônia *GFP* positiva foi encontrada. A partir dela foi possível estabelecer uma linhagem iPS com morfologia e crescimento característico de células pluripotentes (Figura 4.1).

Tabela 4.1 - Efeito da expressão do gene *Nr5a2* na reprogramação por fatores definidos de fibroblastos em células pluripotentes.

Vírus	Fibroblastos	Reprogramação			
		Colônias D14 (n)	Colônias D14 (%)	Colônias D28 (n)	Colônias D28 (%)
KSO + V	690000	2365	0,342 ^a	5825	0,8442 ^a
KSO + N	630000	129	0,020 ^b	316	0,0500 ^b
KS + V	690000	0	0,000 ^c	0	0,0000 ^c
KS + N	690000	0	0,000 ^c	1	0,0001 ^c

Cinco réplicas. Diferentes sobrescritos na coluna diferem significativamente ($p < 0,05$). K: *Klf4*; S: *Sox2*; O: *Oct4*; N: *Nr5a2*; V: vetor vazio. Apenas colônias com morfologia de células-tronco e expressão do gene repórter *Oct4::GFP* foram consideradas como eventos de reprogramação. D14 e D28: Dia 14 e 28 após a transdução, respectivamente.

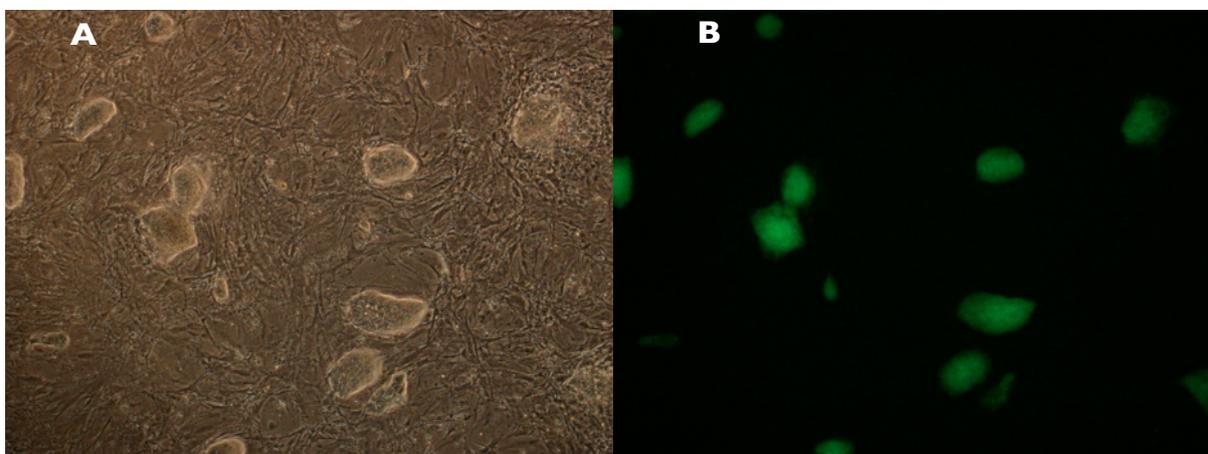


Figura 4.1 - Linhagem celular iPS obtida sem Oct4 exógeno. A) Morfologia característica de células pluripotentes durante a quinta passagem. B) Atividade do gene repórter Oct4::GFP restrita às células reprogramadas.

O restabelecimento da pluripotência por fatores definidos depende da promoção da correta estequiometria dos transgenes durante o processo de reprogramação (PAPAPETROU et al. 2009). Com intuito de investigar se a baixa eficiência obtida com *Nr5a2* era em decorrência da incorreta concentração do transgene, foi realizada uma titulação da carga viral para transdução (Tabela 4.2). No entanto, a expressão do gene *Nr5a2* não foi compatível com a formação de colônias *GFP* positivas em todas as condições testadas.

Tabela 4.2 - Efeito da titulação do *Nr5a2* na reprogramação de fibroblastos em células pluripotentes por fatores definidos sem *Oct4* exógeno.

Vírus	Células transduzidas	Reprogramação			
		Colônias 14 dias (n)	Colônias 14 dias (%)	Colônias 28 dias (n)	Colônias 28 dias (%)
KSO	180000	175	0,09 ^a	537	0,29 ^a
KS + V	180000	0	0,00 ^b	0	0,00 ^b
KS + 0,25N	180000	0	0,00 ^b	0	0,00 ^b
KS + 0,50N	180000	0	0,00 ^b	0	0,00 ^b
KS + 1,00N	180000	0	0,00 ^b	0	0,00 ^b

Duas réplicas. Diferentes sobrescritos na coluna diferem significativamente ($p < 0,05$). K: *Klf4*; S: *Sox2*; O: *Oct4*; N: *Nr5a2*; V: vetor vazio. Apenas colônias com morfologia de células-tronco e expressão do gene repórter *Oct4::GFP* foram considerados como eventos de reprogramação. D14 e D28: Dia 14 e 28 após a transdução, respectivamente.

Durante a realização dos experimentos descritos acima, um relato foi publicado demonstrando a capacidade do *Nr5a2* de substituir *Oct4* na formação de células iPS (HENG et al., 2010). Nas condições experimentais de Heng et al., (2010), a eficiência de reprogramação (utilizando *Nr5a2*, *Sox2*, e *Klf4*) em fibroblastos era de 1 colônia de células iPS a cada 50.000 células ou 0,002%.

Devido a este relato, foi decidido investigar moléculas que substituam o *Oct4* na reprogramação por fatores definidos pela modulação da expressão do *Nr5a2*. Diferentes moléculas apresentam atividade como agonistas do gene *Nr5a2* (WHITBY et al., 2006; HADIZADEH et al., 2008), e a molécula melhor caracterizada é a prostaglandina E2 (PGE2) (ZHOU et al., 2005; HADIZADEH et al., 2008). Por isso, investigou-se o efeito da PGE2 na reprogramação. Foi testada a concentração de 1 mg mL^{-1} , descrita em um relato anterior (HADIZADEH et al., 2008).

O uso da PGE2 não afetou a reprogramação utilizando três fatores com 14 dias após a transdução (Tabela 4.3). A frequência de formação de colônias foi inferior ao controle KSO com 28 dias pós-transdução (Figura 4.3), embora células expostas a PGE2 foram capazes de estabelecer linhagens iPS. Ao utilizar o agonista em substituição de cada um dos fatores, apenas uma colônia foi formada após a transdução com *Oct4* e *Klf4*. No entanto, não foi possível estabelecer uma linhagem iPS, em contraste com todas as colônias controle isoladas

que permitiram estabelecer linhagens *GFP* positivas (n=6). Devido a diversidade de mecanismos descritos para manter e estabelecer a pluripotência em células somáticas sem *Sox2* (MASUI et al., 2007; ICHIDA et al., 2009; LI et al., 2009b; MAHERALI & HOCHEDLINGER, 2009), não se deve descartar a possibilidade que a PGE2 permita eliminar esse fator na reprogramação de fibroblastos por fatores definidos.

Tabela 4.3 - Efeito da prostaglandina E2 na reprogramação de fibroblastos por fatores definidos.

Vírus	Células transduzidas	Reprogramação			
		Colônias 14 dias (n)	Colônias 14 dias (%)	Colônias 28 dias (n)	Colônias 28 dias (%)
KSO	150000	766	0,51 ^a	2033	1,3553 ^a
KSO + PGE2	150000	717	0,47 ^a	1654	1,1026 ^b
KO + V	120000	0	0,00 ^b	0	0,0000 ^c
KO + V + PGE2	120000	0	0,00 ^b	1	0,0008 ^c
KS + V	120000	0	0,00 ^b	0	0,0000 ^c
KS + V + PGE2	150000	0	0,00 ^b	0	0,0000 ^c
SO + V	120000	0	0,00 ^b	0	0,0000 ^c
SO + V + PGE2	120000	0	0,00 ^b	0	0,0000 ^c

Três réplicas. Diferentes sobrescritos na coluna diferem significativamente ($p < 0,05$). K: *Klf4*; S: *Sox2*; O: *Oct4*; V: vetor vazio; PGE2: Prostaglandina E2. Apenas colônias com morfologia de células-tronco e expressão do gene repórter *Oct4::GFP* foram considerados como eventos de reprogramação. D14 e D28: Dia 14 e 28 após a transdução, respectivamente.

Devido às inconsistências dos resultados acima, os esforços subsequentes foram direcionados à reprogramação de hepatócitos. Este tipo celular apresenta o maior nível de expressão de *Nr5a2* dentre os diversos tecidos no organismo adulto (www.nursa.org). Além disso, a reprogramação de hepatócitos apresenta maior eficiência, e ocorre em um intervalo de tempo inferior até sob a seleção do gene *Fbx15* (AOI et al., 2008). O objetivo foi estabelecer as condições de transdução para hepatócitos com o intuito de avaliar moléculas em larga escala que permitam a reprogramação sem *Oct4* exógeno.

Três transduções utilizando hepatócitos foram realizadas. No entanto, poucas colônias foram formadas mesmo após a transdução com três fatores (*Oct4*, *Sox2*, e *Klf4*). Este fato demonstra a necessidade de ajustar as condições de transdução para as células do fígado.

Apesar disso, foi observada a formação de colônias com morfologia de células iPS no grupo sem *Oct4*, transduzidos com *Nr5a2*, *Sox2*, e *Klf4* (Figura 4.4). Tentativas de ajustar a estequiometria do *Nr5a2* na reprogramação de hepatócitos não melhoraram os resultados. Esforços adicionais serão necessários para obtenção de resultados semelhantes aos publicados anteriormente (AOI et al., 2008).

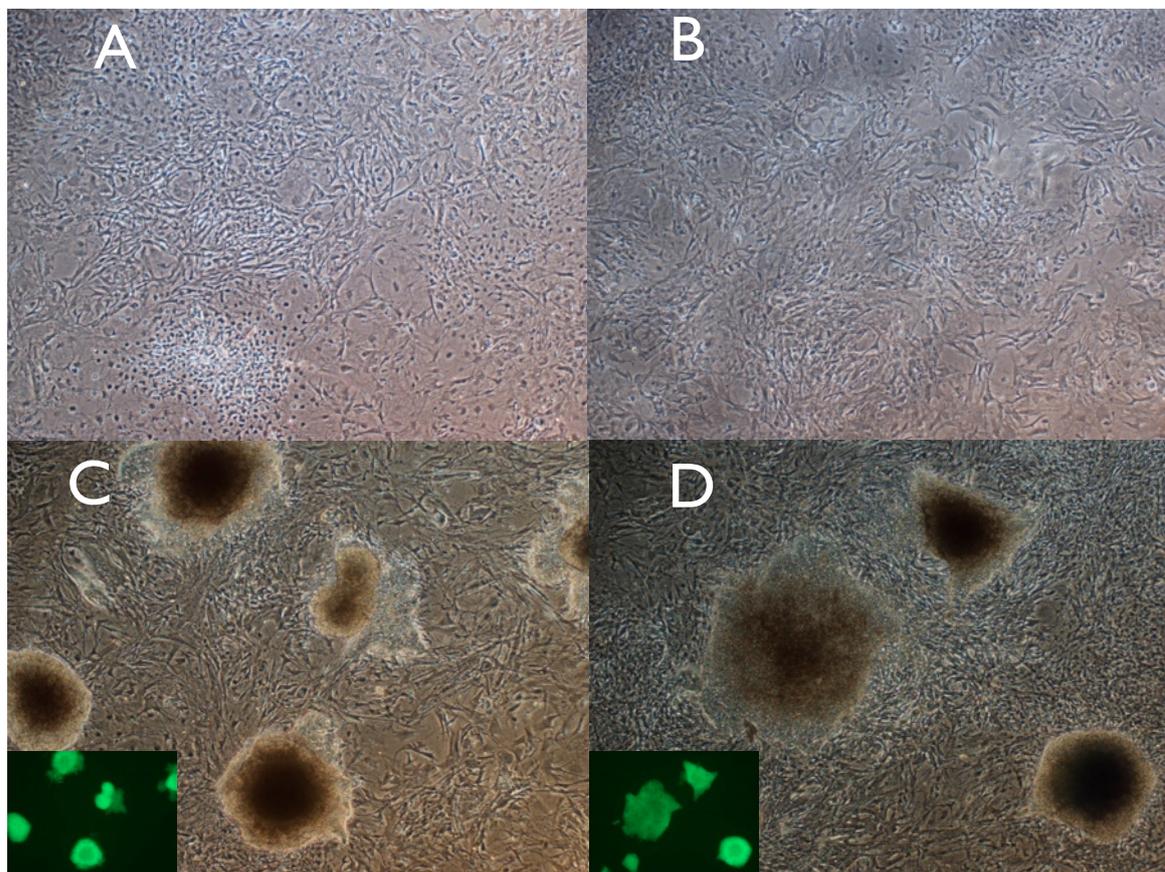


Figura 4.3 - Efeito da prostaglandina E2 na reprogramação de fibroblastos por fatores definidos. A) Transdução com *Sox2* e *Klf4*. B) Transdução com *Sox2* e *Klf4* e tratamento com 1 mg mL^{-1} de PGE2. C) Transdução com *Oct4*, *Sox2*, e *Klf4*. D) Transdução com três fatores e tratamento com PGE2. Dia 28 após a transdução.

Os resultados obtidos no presente experimento não foram capazes de demonstrar que o fator de transcrição *Nr5a2* permite a indução da pluripotência sem a adição do *Oct4*. O relato de HENG et al., (2010) confirma o modelo proposto, sob condições experimentais semelhantes às descritas acima. A demonstração que o produto do gene *Nr5a2* é capaz de converter células-tronco epiblasticas (CTEP) em CTE colabora com a hipótese de ação do *Nr5a2* na reprogramação (GUO & SMITH, 2010).

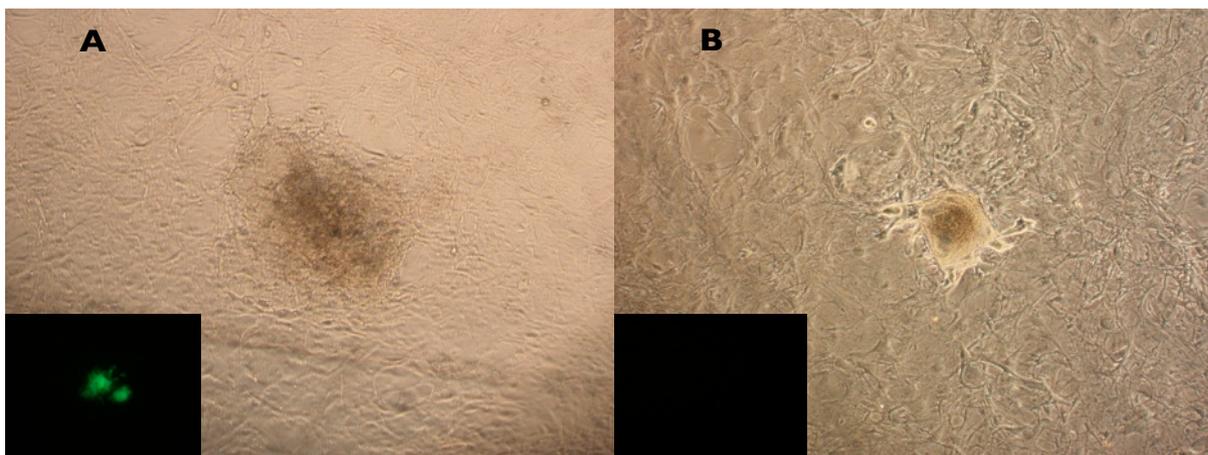


Figura 4.3 - Reprogramação de hepatócitos por fatores definidos. A) Hepatócitos transduzidos com *Oct4*, *Sox2*, e *Klf4*. B) Hepatócitos transduzidos com *Nr5a2*, *Sox2*, e *Klf4*. Apenas o grupo controle apresenta células *GFP* positivas. Dia 28 após a transdução.

Considerando estes relatos, existem duas possibilidades para explicar a atual incapacidade de repetir tais resultados. Uma explicação plausível seria que devido a alguma diferença nas condições experimentais não foi possível observar a formação de colônias utilizando *Nr5a2* em substituição ao *Oct4*. No entanto, a eficiência de reprogramação nos grupos controles ficou dentro do intervalo relatado na literatura (0,1-1,0%). Não houve introdução de práticas ou reagentes novos no procedimento e a escala dos experimentos seria suficiente para observar eventos de reprogramação (baseado na eficiência dos relatos acima).

Uma outra possibilidade seria algum problema no processo de clonagem do gene *Nr5a2* ou no vetor de expressão utilizado. A cada etapa da clonagem, o inserto foi confirmado por sequenciamento, inclusive a alíquota utilizada para transfecção das células Plat-E, que produzem as partículas virais. Apesar de não ser possível excluir algum outro problema no vetor (independente do inserto), esta possibilidade seria remota pela estabilidade do plasmídeo e devido ao uso frequente no laboratório. Por isso, ajustes no processo de transdução receberam maior atenção em detrimento de avaliações para confirmar a atividade dos transgenes nas células somáticas.

4.4 CONCLUSÕES

A ação do fator de transcrição *Nr5a2* pode representar um novo paradigma na investigação de moléculas que compensem a atividade do *Oct4* exógeno no processo de reprogramação por fatores definidos. Além disso, a abordagem pode auxiliar no entendimento das condições necessárias para reativar o *Oct4* endógeno em células somáticas. As tentativas para demonstrar que o receptor nuclear *Nr5a2* compensa a atividade do *Oct4* não permitiram reprogramar fibroblastos em células iPS. A razão deste fato permanece desconhecida.

É prematuro excluir a possibilidade de que a hipótese proposta esteja incorreta, porque existem relatos na literatura que descrevem a atividade do *Nr5a2* no processo de reprogramação em diferentes contextos. No entanto, ainda é necessário que os resultados sejam repetidos de forma independente. O uso de hepatócitos pode representar uma nova perspectiva para investigação desse modelo, embora seja preciso ajustar o protocolo de reprogramação para esse tipo celular.

4.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AOI, T.; YAE, K.; NAKAGAWA, M.; ICHISAKA, T.; OKITA, K.; TAKAHASHI, K.; CHIBA, T.; YAMANAKA, S. Generation of pluripotent stem cells from adult mouse liver and stomach cells. **Science**, v.321, n.5889, p.699-702, 2008.

ATHANASIADOU, R.; DE SOUSA, D.; MYANT, K.; MERUSI, C.; STANCHEVA, I.; BIRD, A. Targeting of de novo DNA methylation throughout the Oct-4 gene regulatory region in differentiating embryonic stem cells. **PLoS One**, v.5, n.4, e9937, 2010.

BARBERI, T.; KLIVENYI, P.; CALINGASAN, N.Y.; LEE, H.; KAWAMATA, H.; LOONAM, K.; PERRIER, A.L.; BRUSES, J.; RUBIO, M.E.; TOPE, N.; TABAR, V.; HARRISON, N.L.; BEAL, M.F.; MOORE, M.A.; STUDER, L. Neural subtype specification of fertilization and nuclear transfer embryonic stem cells and application in parkinsonian mice. **Nature Biotechnology**, v.21, n.10, p.1200-1207, 2003.

BLELLOCH, R.; VENERE, M.; YEN, J.; RAMALHO-SANTOS, M. Generation of induced pluripotent stem cells in the absence of drug selection. **Cell Stem Cell**, v.1, n.3, p.245-247, 2007.

BOIANI, M.; SCHÖLER, H.R. Regulatory networks in embryo-derived pluripotent stem cells. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v.6, n.11, p.872-884, 2005.

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.

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.

CHERRY, S.R.; BINISZKIEWICZ, D.; VAN PARIJS, L.; BALTIMORE, D.; JAENISCH, R. Retroviral expression in embryonic stem cells and hematopoietic stem cells. **Molecular and Cellular Biology**, v.20, n.20, p.7419-7426, 2000.

CHUNG, Y.; BISHOP, C.E.; TREFF, N.R.; WALKER, S.J.; SANDLER, V.M.; BECKER, S.; KLIMANSKAYA, I.; WUN, W.S.; DUNN, R.; HALL, R.M.; SU, J.; LU, S.J.; MASERATI, M.; CHOI, Y.H.; SCOTT, R.; ATALA, A.; DITTMAN, R.; LANZA, R. Reprogramming of human somatic cells using human and animal oocytes. **Cloning and Stem Cells**, v.11, n.2, p.213-223, 2009.

CIBELLI, J.B.; STICE, S.L.; GOLUEKE, P.J.; KANE, J.J.; JERRY, J.; BLACKWELL, C.; PONCE DE LEÓN, 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.

DIMOS, J.T.; RODOLFA, K.T.; NIAKAN, K.K.; WEISENTHAL, L.M.; MITSUMOTO, H.; CHUNG, W.; CROFT, G.F.; SAPHIER, G.; LEIBEL, R.; GOLAND, R.; WICHTERLE, H.; HENDERSON, C.E.; EGGAN, K. Induced pluripotent stem cells generated from patients with ALS can be differentiated into motor neurons. **Science**, v.321, n.5893, p.1218-1221, 2008.

DO, J.T.; SCHÖLER, H.R. Nuclei of embryonic stem cells reprogram somatic cells. **Stem Cells**, v.22, n.6, p.941-949, 2004.

EGGAN, K.; BALDWIN, K.; TACKETT, M.; OSBORNE, J.; GOGOS, J.; CHESS, A.; AXEL, R.; JAENISCH, R. Mice cloned from olfactory sensory neurons. **Nature**, v.428, n.6978, p.44-49, 2004.

EGLI, D.; ROSAINS, J.; BIRKHOFF, G.; EGGAN, K. Developmental reprogramming after chromosome into mitotic mouse zygotes. **Nature**, v.447, n.7145, p.479-485, 2007.

EGLI, D.; BIRKHOFF, G.; EGGAN, K. Mediators of reprogramming: transcription factors and transitions through mitosis. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v.9, n.7, p.505-516, 2008.

EPSZTEJN-LITMAN, S.; FELDMAN, N.; ABU-REMAILEH, M.; SHUFARO, Y.; GERSON, A.; UEDA, J.; DEPLUS, R.; FUKS, F.; SHINKAI, Y.; CEDAR, H.; BERGMAN, Y. De novo DNA methylation promoted by G9a prevents reprogramming of embryonically silenced genes. **Nature Structural & Molecular Biology**, v.15, n.11, p.1176-1183, 2008.

FAYARD, E.; AUWERX, J.; SCHOONJANS, K. LRH-1: an orphan nuclear receptor involved in development, metabolism and steroidogenesis. **Trends in Cell Biology**, v.14, n.5, p.250-260, 2004.

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

FENG, B.; NG, J.H.; HENG, J.C.; NG, H.H. Molecules that promote or enhance reprogramming of somatic cells to induced pluripotent stem cells. **Cell Stem Cell**, v.4, n.4, p.301-312, 2009.

FUSAKI, N.; BAN, H.; NISHIYAMA, A.; SAEKI, K.; HASEGAWA, M. Efficient induction of transgene-free human pluripotent stem cells using a vector based on Sendai virus, an RNA virus that does not integrate into the host genome. **Proc. Jpn. Acad., Ser. B, Phys. Biol. Sci.**, v.85, n.8, p.348-362, 2009.

GAO, D.M.; WANG, L.F.; LIU, J.; KONG, Y.Y.; WANG, Y.; XIE, Y.H. Expression of mouse liver receptor homologue 1 in embryonic stem cells is directed by a novel promoter. **FEBS Letters**, v.580, n.7, p.1702-1708, 2006.

GU, P.; GOODWIN, B.; CHUNG, A.C.; XU, X.; WHEELER, D.A.; PRICE, R.R.; GALARDI, C.; PENG, L.; LATOUR, A.M.; KOLLER, B.H.; GOSSEN, J.; KLIEWER, S.A.; COONEY, A.J. Orphan nuclear receptor LRH-1 is required to maintain Oct4 expression at the epiblast stage of embryonic development. **Molecular and Cellular Biology**, v.25, n.9, p.3492-3505, 2005.

GUO, G.; SMITH, A. A genome-wide screen in EpiSCs identifies Nr5a nuclear receptors as potent inducers of ground state pluripotency. **Development**, v.137, n.19, p.3185-3192, 2010.

HACEIN-BEY-ABINA, S.; VON KALLE, C.; SCHMIDT, M.; MCCORMACK, M.P.; WULFFRAAT, N.; LEBOULCH, P.; LIM, A.; OSBORNE, C.S.; PAWLIUK, R.; MORILLON, E.; SORENSEN, R.; FORSTER, A.; FRASER, P.; COHEN, J.I.; DE SAINT BASILE, G.; ALEXANDER, I.; WINTERGERST, U.; FREBOURG, T.; AURIAS, A.; STOPPA-LYONNET, D.; ROMANA, S.; RADFORD-WEISS, I.; GROSS, F.; VALENSI, F.; DELABESSE, E.; MACINTYRE, E.; SIGAUX, F.; SOULIER, J.; LEIVA, L.E.; WISSLER, M.; PRINZ, C.; RABBITTS, T.H.; LE DEIST, F.; FISCHER, A.; CAVAZZANA-CALVO, M. LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. **Science**, v.302, n.5644, p.415-419, 2003.

HADIZADEH, S.; KING, D.N.; SHAH, S.; SEWER, M.B. Sphingosine-1-phosphate regulates the expression of the liver receptor homologue-1. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.283, n.1-2, p.104-113, 2008.

HALL, V.J.; COMPTON, D.; STOJKOVIC, P.; NESBITT, M.; HERBERT, M.; MURDOCH, A.; STOJKOVIC, M. Developmental competence of human in vitro aged oocytes as host cells for nuclear transfer. **Human Reproduction**, v.22, n.1, p.52-62, 2007.

HAN, D.W.; DO, J.T.; GENTILE, L.; STEHLING, M.; LEE, H.T.; SCHÖLER, H.R. Pluripotential reprogramming of the somatic genome in hybrid cells occurs with the first cell cycle. **Stem Cells**, v.26, n.2, p.445-454, 2008.

HANNA, J.; WERNIG, M.; MARKOULAKI, S.; SUN, C.W.; MEISSNER, A.; CASSADY, J.P.; BEARD, C.; BRAMBRINK, T.; WU, L.C.; TOWNES, T.M.; JAENISCH, R. Treatment of sickle cell anemia mouse model with iPS cells generated from autologous skin. **Science**, v.318, n.5858, p.1920-1923, 2007.

HANNA, J.H.; SAHA, K.; JAENISCH, R. Pluripotency and cellular reprogramming: facts, hypotheses, unresolved issues. **Cell**, v.143, n.4, p.508-525, 2010.

HENG, J.C.; FENG, B.; HAN, J.; JIANG, J.; KRAUS, P.; NG, J.H.; ORLOV, Y.L.; HUSS, M.; YANG, L.; LUFKIN, T.; LIM, B.; NG, H.H. The nuclear receptor Nr5a2 can replace Oct4 in the reprogramming of murine somatic cells to pluripotent cells. **Cell Stem Cell**, v.6, n.2, p.167-174, 2010.

HOCHEDLINGER, K.; JAENISCH, R. Nuclear reprogramming and pluripotency. **Nature**, v.441, n.7097, p.1061-1067, 2006.

HUANGFU, D.; MAEHR, R.; GUO, W.; EIJKELENBOOM, A.; SNITOW, M.; CHEN, A.E.; MELTON, D.A. Induction of pluripotent stem cells by defined factors is greatly improved by small-molecule compounds. **Nature Biotechnology**, v.26, n.7, p.795-797, 2008a.

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. **Nature Biotechnology**, v.26, n.11, p.1269-1275, 2008b.

ICHIDA, J.K.; BLANCHARD, J.; LAM, K.; SON, E.Y.; CHUNG, J.E.; EGLI, D.; LOH, K.M.; CARTER, A.C.; DI GIORGIO, F.P.; KOSZKA, K.; HUANGFU, D.; AKUTSU, H.; LIU, D.R.; RUBIN, L.L.; EGGAN, K. A small-molecule inhibitor of tgf-Beta signaling replaces sox2 in reprogramming by inducing nanog. **Cell Stem Cell**, v.5, n.5, p.491-503, 2009.

KELLNER, S.; KIKYO, N. Transcriptional regulation of the Oct4 gene, a master gene for pluripotency. **Histology and Histopathology**, v.25, n.3, p.405-412, 2010.

KIM, D.; KIM, C.H.; MOON, J.I.; CHUNG, Y.G.; CHANG, M.Y.; HAN, B.S.; KO, S.; YANG, E.; CHA, K.Y.; LANZA, R.; KIM, K.S. Generation of human induced pluripotent stem cells by direct delivery of reprogramming proteins. **Cell Stem Cell**, v.4, n.6, p.472-476, 2009.

KISKINIS, E.; EGGAN, K. Progress toward the clinical application of patient-specific pluripotent stem cells. **Journal of Clinical Investigation**, v.120, n.1, p.51-59, 2010.

KIMURA, H.; TADA, M.; NAKATSUJI, N.; TADA, T. Histone code modifications on pluripotential nuclei of reprogrammed somatic cells. **Molecular and Cellular Biology**, v.24, n.13, p.5710-5720, 2004.

LANZA, R.P.; CHUNG, H.Y.; YOO, J.J.; WETTSTEIN, P.J.; BLACKWELL, C.; BORSON, N.; HOFMEISTER, E.; SCHUCH, G.; SOKER, S.; MORAES, C.T.; WEST, M.D.; ATALA, A. Generation of histocompatible tissues using nuclear transplantation. **Nature Biotechnology**, v.20, n.7, p.689-696, 2002.

LANZA, R.; MOORE, M.A.; WAKAYAMA, T.; PERRY, A.C.; SHIEH, J.H.; HENDRIKX, J.; LERI, A.; CHIMENTI, S.; MONSEN, A.; NURZYNSKA, D.; WEST, M.D.; KAJSTURA, J.; ANVERSA, P. Regeneration of the infarcted heart with stem cells derived by nuclear transplantation. **Circulation Research**, v.94, n.6, p.820-827, 2004.

LI, J.; ISHII, T.; FEINSTEIN, P.; MOMBAERTS, P. Odorant receptor gene choice is reset by nuclear transfer from mouse olfactory sensory neurons. **Nature**, v.428, n.6981, p.393-399, 2004.

LI, W.; WEI, W.; ZHU, S.; ZHU, J.; SHI, Y.; LIN, T.; HAO, E.; HAYEK, A.; DENG, H.; DING, S. Generation of rat and human induced pluripotent stem cells by combining genetic reprogramming and chemical inhibitors. **Cell Stem Cell**, v.4, n.1, p.16-19, 2009a.

LI, W.; ZHOU, H.; ABUJAROUR, R.; ZHU, S.; YOUNG JOO, J.; LIN, T.; HAO, E.; SCHÖLER, H.R.; HAYEK, A.; DING, S. Generation of human-induced pluripotent stem cells in the absence of exogenous Sox2. **Stem Cells**, v.27, n.12, p.2992-3000, 2009b.

LI, Y.; ZHANG, Q.; YIN, X.; YANG, W.; DU, Y.; HOU, P.; GE, J.; LIU, C.; ZHANG, W.; ZHANG, X.; WU, Y.; LI, H.; LIU, K.; WU, C.; SONG, Z.; ZHAO, Y.; SHI, Y.; DENG, H. Generation of iPSCs from mouse fibroblasts with a single gene, Oct4, and small molecules. **Cell Research**, v.21, n.1, p.196-204, 2010.

LOWRY, W.E.; RICHTER, L.; YACHECHKO, R.; PYLE, A.D.; TCHIEU, J.; SRIDHARAN, R.; CLARK, A.T.; PLATH, K. Generation of human induced pluripotent stem cells from dermal fibroblasts. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.105, n.8, p.2883-2888, 2008.

LYSSIOTIS, C.A.; FOREMAN, R.K.; STAERK, J.; GARCIA, M.; MATHUR, D.; MARKOULAKI, S.; HANNA, J.; LAIRSON, L.L.; CHARETTE, B.D.; BOUCHEZ, L.C.; BOLLONG, M.; KUNICK, C.; BRINKER, A.; CHO, C.Y.; SCHULTZ, P.G.; JAENISCH, R. Reprogramming of murine fibroblasts to induced pluripotent stem cells with chemical complementation of Klf4. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.106, n.22, p.8912-8917, 2009.

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.

MAHERALI, N.; HOCHEDLINGER, K. Tgfbeta signal inhibition cooperates in the induction of iPSCs and replaces Sox2 and cMyc. **Current Biology**, v.19, n.20, p.1718-1723, 2009.

MASUI, S.; NAKATAKE, Y.; TOYOOKA, Y.; SHIMOSATO, D.; YAGI, R.; TAKAHASHI, K.; OKOCHI, H.; OKUDA, A.; MATOBA, R.; SHAROV, A.A.; KO, M.S.; NIWA, H. Pluripotency governed by Sox2 via regulation of Oct3/4 expression in mouse embryonic stem cells. **Nature Cell Biology**, v.9, n.6, p.625-635, 2007.

MATSUI, T.; LEUNG, D.; MIYASHITA, H.; MAKSAKOVA, I.A.; MIYACHI, H.; KIMURA, H.; TACHIBANA, M.; LORINCZ, M.C.; SHINKAI, Y. Proviral silencing in embryonic stem cells requires the histone methyltransferase ESET. **Nature**, v.464, n.7290, p.927-931, 2010.

MILLER, R.A.; RUDDLE, F.H. Pluripotent teratocarcinoma-thymus somatic cell hybrids. **Cell**, v.9, n.1, p.45-55, 1976.

OKADA, M.; OKA, M.; YONEDA, Y. Effective culture conditions for the induction of pluripotent stem cells. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1800, n.9, p.956-963, 2010.

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.

OSAFUNE, K.; CARON, L.; BOROWIAK, M.; MARTINEZ, R.J.; FITZ-GERALD, C.S.; SATO, Y.; COWAN, C.A.; CHIEN, K.R.; MELTON, D.A. Marked differences in differentiation propensity among human embryonic stem cell lines. **Nature Biotechnology**, v.26, n.3, p.313-315, 2008.

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, 2008a.

PARK, I.H.; ARORA, N.; HUO, H.; MAHERALI, N.; AHFELDT, T.; SHIMAMURA, A.; LENSCH, M.W.; COWAN, C.; HOCHEDLINGER, K.; DALEY, G.Q. Disease-specific induced pluripotent stem cells. **Cell**, v.134, n.5, p.877-886, 2008b.

RIDEOUT, W.M. 3RD; HOCHEDLINGER, K; KYBA, M.; DALEY, G.Q.; JAENISCH, R. Correction of a genetic defect by nuclear transplantation and combined cell and gene therapy. **Cell**, v.109, n.1, p.17-27, 2002.

SAHA, K.; JAENISCH, R. Technical challenges in using human induced pluripotent stem cells to model disease. **Cell Stem Cell**, v.5, n.6, p.584-595, 2009.

SHI, Y.; DO, J.T.; DESPONTS, C.; HAHM, H.S.; SCHÖLER, H.R.; DING, S. A combined chemical and genetic approach for the generation of induced pluripotent stem cells. **Cell Stem Cell**, v.2, n.6, p.525-528, 2008.

SIMERLY, C.; DOMINKO, T.; NAVARA, C.; PAYNE, C.; CAPUANO, S.; GOSMAN, G.; CHONG, K.Y.; TAKAHASHI, D.; CHACE, C.; COMPTON, D.; HEWITSON, L.; SCHATTEN, G. Molecular correlates of primate nuclear transfer failures. **Science**, v.300, n.5617, p.297, 2003.

SI-TAYEB, K.; NOTO, F.K.; SEPAC, A.; SEDLIC, F.; BOSNJAK, Z.J.; LOUGH, J.W.; DUNCAN, S.A. Generation of human induced pluripotent stem cells by simple transient transfection of plasmid DNA encoding reprogramming factors. **BMC Developmental Biology**, v.10, 81, 2010.

SOLDNER, F.; HOCKEMEYER, D.; BEARD, C.; GAO, Q.; BELL, G.W.; COOK, E.G.; HARGUS, G.; BLAK, A.; COOPER, O.; MITALIPOVA, M.; ISACSON, O.; JAENISCH, R. Parkinson's disease patient-derived induced pluripotent stem cells free of viral reprogramming factors. **Cell**, v.136, n.5, p.964-977, 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.

STOJKOVIC, M.; STOJKOVIC, P.; LEARY, C.; HALL, V.J.; ARMSTRONG, L.; HERBERT, M.; NESBITT, M.; LAKO, M.; MURDOCH, A. Derivation of a human blastocyst after heterologous nuclear transfer to donated oocytes. **Reproductive Biomedicine Online**, v.11, n.2, p.226-231, 2005.

TABAR, V.; TOMISHIMA, M.; PANAGIOTAKOS, G.; WAKAYAMA, S.; MENON, J.; CHAN, B.; MIZUTANI, E.; AL-SHAMY, G.; OHTA, H.; WAKAYAMA, T.; STUDER, L. Therapeutic cloning in individual parkinsonian mice. **Nature Medicine**, v.14, n.4, p.379-381, 2008.

TADA, M.; TAKAHAMA, Y.; ABE, K.; NAKATSUJI, N.; TADA, T. Nuclear reprogramming of somatic cells by in vitro hybridization with ES cells. **Current Biology**, v.11, n.19, p.1553-1558, 2001.

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.

TAPSCOTT, S.J.; DAVIS, R.L.; THAYER, M.J.; CHENG, P.F.; WEINTRAUB, H.; LASSAR, A.B. MyoD1: a nuclear phosphoprotein requiring a Myc homology region to convert fibroblasts to myoblasts. **Science**, v.242, n.4877, p.405-411, 1988.

VARAS, F.; STADTFELD, M.; DE ANDRES-AGUAYO, L.; MAHERALI, N.; DI TULLIO, A.; PANTANO, L.; NOTREDAME, C.; HOCHEDLINGER, K.; GRAF, T. Fibroblast-derived induced pluripotent stem cells show no common retroviral vector insertions. **Stem Cells**, v.27, n.2, p.300-306, 2009.

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, S.; JAKT, M.L.; SUZUKI, M.; ARAKI, R.; HIKICHI, T.; KISHIGAMI, S.; OHTA, H.; VAN THUAN, N.; MIZUTANI, E.; SAKAIDE, Y.; SENDA, S.; TANAKA, S.; OKADA, M.; MIYAKE, M.; ABE, M.; NISHIKAWA, S.; SHIOTA, K.; WAKAYAMA, T. Equivalency of nuclear transfer-derived embryonic stem cells to those derived from fertilized mouse blastocysts. **Stem Cells**, v.24, n.9, p.2023-2033, 2006.

WARREN, L.; MANOS, P.D.; AHFELDT, T.; LOH, Y.H.; LI, H.; LAU, F.; EBINA, W.; MANDAL, P.K.; SMITH, Z.D.; MEISSNER, A.; DALEY, G.Q.; BRACK, A.S.; COLLINS, J.J.; COWAN, C.; SCHLAEGER, T.M.; ROSSI, D.J. Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells with synthetic modified mRNA. **Cell Stem Cell**, v.7, n.5, p.618-613, 2010.

WEINTRAUB, H.; TAPSCOTT, S.J.; DAVIS, R.L.; THAYER, M.J.; ADAM, M.A.; LASSAR, A.B.; MILLER, A.D. Activation of muscle-specific genes in pigment, nerve, fat, liver, and fibroblast cell lines by forced expression of MyoD. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.86 n.14, p.5434-5438, 1989.

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, 318-324, 2007.

WERNIG, M.; ZHAO, J.P.; PRUSZAK, J.; HEDLUND, E.; FU, D.; SOLDNER, F.; BROCCOLI, V.; CONSTANTINE-PATON, M.; ISACSON, O.; JAENISCH, R. Neurons derived from reprogrammed fibroblasts functionally integrate into the fetal brain and improve

symptoms of rats with Parkinson's disease. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.105, n.15, p.5856-5861, 2008.

WHITBY, R.J.; DIXON, S.; MALONEY, P.R.; DELERIVE, P.; GOODWIN, B.J.; PARKS, D.J.; WILLSON, T.M. Identification of small molecule agonists of the orphan nuclear receptors liver receptor homolog-1 and steroidogenic factor-1. **Journal of Medical Chemistry**, v.49, n.23, p.6652-6655, 2006.

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.; BEAUJEAN, N.; DE SOUSA, P.A.; DINNYES, A.; KING, T.J.; PATERSON, L.A.; WELLS, D.N.; YOUNG, L.E. Somatic cell nuclear transfer. **Nature**, v.419, n.6907, p.583-586, 2002.

WOLTJEN, K.; MICHAEL, I.P.; MOHSENI, P.; DESAI, R.; MILEIKOVSKY, M.; HANMALLA INEN, R.; COWLING, R.; WANG, W.; LIU, P.; GERTSENSTEIN, M.; KAJI, K.; SUNG, H.K.; NAGY, A. PiggyBac transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells. **Nature**, v.458, n.7239, p.766-770, 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. **Nature Genetics**, v.39, n.3, p.295-302, 2007.

YEOM, Y.I.; FUHRMANN, G.; OVITT, C.E.; BREHM, A.; OHBO, K.; GROSS, M.; HÜBNER, K.; SCHÖLER, H.R. Germline regulatory element of Oct-4 specific for the totipotent cycle of embryonal cells. **Development**, v.122, n.3, p.881-894, 1996.

YU, J.; VODYANIK, M.A.; HE, P.; SLUKVIN, I.I.; THOMSON, J.A. Human embryonic stem cells reprogram myeloid precursors following cell-cell fusion. **Stem Cells**, v.24, n.1, p.168-176, 2006.

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, I.I.; 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, I.I.; THOMSON, J.A. Human induced pluripotent stem cells free of vector and transgene sequences. **Science**, v.324, n.5928, p.797-801, 2009.

YUAN, X.; WAN, H.; ZHAO, X.; ZHU, S.; ZHOU, Q.; DING, S. Combined Chemical Treatment Enables Oct4-Induced Reprogramming from Mouse Embryonic Fibroblasts. **Stem Cells**, v.29, n.3, p.549-553, 2011.

ZHOU, J.; SUZUKI, T.; KOVACIC, A.; SAITO, R.; MIKI, Y.; ISHIDA, T.; MORIYA, T.; SIMPSON, E.R.; SASANO, H.; CLYNE, C.D. Interactions between prostaglandin E(2), liver receptor homologue-1, and aromatase in breast cancer. **Cancer Research**, v.65, n.2, p.657-663, 2005.

ZHOU, H.; WU, S.; JOO, J.Y.; ZHU, S.; HAN, D.W.; LIN, T.; TRAUGER, S.; BIEN, G.; YAO, S.; ZHU, Y.; SIUZDAK, G.; SCHÖLER, H.R.; DUAN, L.; DING, S. Generation of induced pluripotent stem cells using recombinant proteins. **Cell Stem Cell**, v.4, n.5, p.381-384, 2009.

ZHU, S.; LI, W.; ZHOU, H. WEI, W.; AMBASUDHAN, R.; LIN, T.; KIM, J.; ZHANG, K.; DING, S. Reprogramming of Human Primary Somatic Cells by OCT4 and Chemical Compounds. **Cell Stem Cell**, v.7, n.6, p.651-655, 2010.

CAPÍTULO 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A reprogramação celular tornou-se um importante campo de investigação científica nas últimas décadas ao demonstrar que, apesar da grande estabilidade do fenótipo das células somáticas, este pode ser experimentalmente revertido a um estado indiferenciado (JAENISCH & YOUNG, 2008; HANNA et al., 2010; STADTFELD & HOCHEDLINGER, 2010). O desenvolvimento da clonagem por transferência nuclear (TN) e da reprogramação por fatores definidos permitiu o aperfeiçoamento e o desenvolvimento de diferentes tecnologias que contribuem para as indústrias agropecuária e farmacêutica (WESTHUSIN et al., 2001; SULLIVAN et al., 2008).

Apesar do crescente interesse no fenômeno e suas aplicações, o limitado progresso no entendimento do mecanismo de reprogramação culmina na persistência da baixa eficiência, independente da metodologia (HOCHEDLINGER & JAENISCH, 2006). A complexidade do processo de reversão do estado epigenético das células e as dificuldades inerentes a investigação do mecanismo representam importantes entraves.

O objetivo do presente trabalho foi desenvolver alternativas para facilitar a análise da reprogramação após a clonagem por TN e indução de pluripotência: a enucleação química dos ovócitos para TN e a indução e/ou compensação da atividade do gene *Oct4* por moléculas, respectivamente. A investigação dos fatores que impedem o desenvolvimento embrionário após a TN com ovócitos enucleados pela actinomicina D e a possibilidade de substituir o *Oct4* exógeno pela indução do receptor nuclear *Nr5a2* foram investigados em detalhe. Os resultados representam importantes evidências que a enucleação pela actinomicina D se tornou a metodologia alternativa de enucleação de ovócitos melhor caracterizada, onde o principal fator limitante foi identificado: a presença do DNA tratado com actinomicina D no ovócito. Estes fatos norteiam as futuras investigações para a identificação de estratégias que contribuam para o aumento das taxas de desenvolvimento embrionário e fetal após a TN com ovócitos enucleados pela actinomicina D.

Apesar dos resultados do uso do fator de transcrição *Nr5a2* na reprogramação por fatores definidos serem preliminares no presente trabalho, relatos na literatura sugerem que o

modelo aqui proposto representa um importante mecanismo para substituição do *Oct4* na produção de células iPS (GUO & SMITH, 2010; HENG et al., 2010). O próximo objetivo será identificar moléculas que estimulem a atividade do *Nr5a2* em níveis suficientes para a conversão das células somáticas em pluripotentes. A compreensão das diferentes formas para indução da pluripotência pode contribuir para as novas abordagens de transdiferenciação, ou seja, a reprogramação de uma célula somática em outro tipo celular diferenciado sem um estado indiferenciado intermediário (ZHOU et al., 2008; GRAF & ENVER, 2009; VIERBUCHEN et al., 2010)

Em conclusão, os resultados apresentados servem como importantes contribuições para o aumento da produção de material biológico para investigação em nível molecular do processo de reprogramação epigenética e a aplicação das tecnologias para fins comerciais, científicos, e terapêuticos.

5.1. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

GRAF, T.; ENVER, T. Forcing cells to change lineages. **Nature**, v.462, n.7273, p.587-594, 2009.

GUO, G.; SMITH, A. A genome-wide screen in EpiSCs identifies Nr5a nuclear receptors as potent inducers of ground state pluripotency. **Development**, v.137, n.19, p.3185-3192, 2010.

HANNA, J.H.; SAHA, K.; JAENISCH, R. Pluripotency and cellular reprogramming: facts, hypotheses, unresolved issues. **Cell**, v.143, n.4, p.508-525, 2010.

HENG, J.C.; FENG, B.; HAN, J.; JIANG, J.; KRAUS, P.; NG, J.H.; ORLOV, Y.L.; HUSS, M.; YANG, L.; LUFKIN, T.; LIM, B.; NG, H.H. The nuclear receptor Nr5a2 can replace Oct4 in the reprogramming of murine somatic cells to pluripotent cells. **Cell Stem Cell**, v.6, n.2, p.167-174, 2010.

HOCHEDLINGER, K.; JAENISCH, R. Nuclear reprogramming and pluripotency. **Nature**, v.441, n.7097, p.1061-1067, 2006.

JAENISCH, R.; YOUNG, R. Stem cells, the molecular circuitry of pluripotency and nuclear reprogramming. **Cell**, v.132, n.4, p.567-582, 2008.

STADTFELD, M.; HOCHEDLINGER, K. Induced pluripotency: history, mechanisms, and applications. **Genes and Development**, v.24, n.20, p.2239-2263, 2010.

SULLIVAN, E.J.; POMMER, J.; ROBL, J.M. Commercialising genetically engineered animal biomedical products. **Reproduction, Fertility, and Development**, v.20, n.1, p.61-66, 2008.

VIERBUCHEN, T.; OSTERMEIER, A.; PANG, Z.P.; KOKUBU, Y.; SUDHOF, T.C.; WERNIG, M. Direct conversion of fibroblasts to functional neurons by defined factors. **Nature**, v.463, n.7284, p.1035-1041, 2010.

WESTHUSIN, M.E.; LONG, C.R.; SHIN, T.; HILL, J.R.; LOONEY, C.R.; PRYOR, J.H.; PIEDRAHITA, J.A. Cloning to reproduce desired genotypes. **Theriogenology**, v.55, n.1, p.35-49, 2001.

ZHOU, Q.; BORWN, J.; KANAREK, A.; RAJAGOPAL, J; MELTON, D.A. In vivo reprogramming of adult pancreatic exocrine cells to beta-cells. **Nature**, v.455, n.7213, p.627-632, 2008.