

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS**  
Centro de Desenvolvimento Tecnológico – CDTEc  
Curso de Graduação em Biotecnologia



Trabalho Acadêmico de Conclusão de Curso

**REPROGRAMAÇÃO CELULAR E PRODUÇÃO DE  
EMBRIÕES POR TRANSFERÊNCIA NUCLEAR**

**Mariana Härter Remião**

Pelotas, 2012

**MARIANA HÄRTER REMIÃO**

**REPROGRAMAÇÃO CELULAR E PRODUÇÃO DE EMBRIÕES  
POR TRANSFERÊNCIA NUCLEAR**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Núcleo de Biotecnologia, do Centro de Desenvolvimento Tecnológico da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador de estágio:  
Prof. Dr. Vilceu Bordignon.

Orientador acadêmico:  
Prof. Dr. Tiago Veiras Collares.

Pelotas, 2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

R387r Remião, Mariana Härter  
Reprogramação celular e produção de embriões por transferência nuclear / Mariana Härter Remião; orientador Vilceu Bordignon; co-orientador Tiago Veiras Collares. - Pelotas, 2012.  
59 f.; il.

Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Biotecnologia) – Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, 2012.

1. Biotecnologia. 2. Reprogramação celular. 3. Clonagem.  
4. Epigenética. 5. Scriptaid. 6. Vitamina C. 7. DZNep. I. Bordignon, Vilceu, orient. II. Collares, Tiago Veiras, co-orient. III. Título.

CDD:575

**Banca examinadora:**

Prof. Dr. João Carlos Deschamps

Prof. Dr. Vinicius Farias Campos

Dr<sup>a</sup>. Priscila Marques Moura de Leon

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, preciso agradecer aos meus pais, Carla e Eduardo Remião, pela oportunidade de estudar em Pelotas, de realizar meu estágio final no Canadá, por apoiarem e confiarem nas minhas decisões, por estarem sempre presentes, pelo amor e pela dedicação. Também à minha irmã Luísa, minha grande parceira, pela amizade e pela companhia.

Ao Tony Silveira, meu namorado e meu melhor amigo. Obrigada pelos conselhos, pela dedicação, pelo altruísmo, pelo amor incontestável. Tudo seria mais difícil se eu não tivesse você sempre ao meu lado!

Agradeço ao Professor Vilceu Bordignon, pela excelente orientação durante meu estágio final, assim como pela hospitalidade, pela prestatividade, dele e de toda a sua família. O estágio fora do Brasil foi uma experiência muito significativa pra mim, e me fez crescer tanto profissionalmente quanto pessoalmente. Muito obrigada também aos demais estudantes que participaram comigo desse processo, em especial à Joana Mezzalira, Lain Ohlweiler, e Rodrigo Bohrer.

Sou muito grata ao meu orientador Tiago Collares, pela oportunidade de ser sua orientada, pela confiança no meu nome em representar o GPO fora do país, além da amizade que construímos nesses quatro anos! Também aos demais professores da graduação, em especial aos professores João Carlos Deschamps, Fabiana Seixas e Fabrício Rochedo Conceição, pelo apoio tanto para a realização deste estágio como também pela orientação em outros momentos da minha graduação.

Obrigada aos meus colegas de graduação: Carolina, Caroline, Fernando, Suélen, Thaís e Victor pelo companheirismo e pela amizade.

À todos pós-graduandos e estagiários do Grupo de Pesquisa em Oncologia e dos outros laboratórios que estagiei, Laboratório de Imunologia Aplicada e Laboratório de Imunodiagnóstico e Imunohistoquímica.

E por fim, quero agradecer a dois pós-graduandos que acompanhei durante minha graduação, que foram muito importantes para o meu aprendizado e para a minha decisão de me formar biotecnóloga: Leonardo Garcia Monte e Eliza Rossi Komninou. Obrigada pela paciência, pela confiança, pela dedicação, e pela amizade!

*“What we know is a drop of water,  
what we ignore is the ocean.”*

Isaac Newton

## RESUMO

REMIÃO, Mariana Härter. **Reprogramação Celular e Produção de Embriões por Transferência Nuclear**. 2012. 59f. Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Este documento tem por objetivo relatar as atividades realizadas para a disciplina de Estágio Supervisionado de Conclusão de Curso, do curso de graduação em Biotecnologia da UFPel. A realização do estágio se deu de março a agosto de 2012 e foi desenvolvido na McGill University, campus McDonald, localizado na cidade de Sainte-Anne-de-Bellevue, Quebec, Canadá. A principal linha de pesquisa acompanhada durante este período compreende a área de reprogramação celular e epigenética. Os experimentos realizados têm como finalidade aumentar a eficiência da técnica de clonagem, através de tratamentos nas células doadoras de núcleo que atuassem no epigenoma dessas células e as reprogramassem a um estágio mais pluripotente, aumentando a possibilidade de dar origem a um embrião normal. Fibroblastos fetais suínos foram expostos à três moléculas descritas por atuarem no epigenoma celular: Scriptaid, DZNep, e Vitamina C. As células foram cultivadas por 12 dias, tendo amostras coletadas para extração de RNA nos dias 3, 6 e 12. Foi construído cDNA para cada tratamento, e avaliada a expressão gênica para os genes de pluripotência Sox2, Nanog e Oct4, e para os genes de senescência celular p53 e p15. Como controle, foi extraído RNA de embriões produzidos pela técnica de ativação partenogenética. Além disso, outras atividades foram acompanhadas durante este período, como a técnica de clonagem por *handmade*, fertilização in vitro de oócitos suínos seguindo de cultivo na presença de DZNep, além de atividades semanais do laboratório como esterilização de materiais, preparação de meios, e coletas de ovários em frigorífico.

**Palavras-chave:** Clonagem. DZNep. Epigenoma. Reprogramação celular. Scriptaid. Vitamina C.

## ABSTRACT

REMIÃO, Mariana Härter. **Reprogramação Celular e Produção de Embriões por Transferência Nuclear**. 2012. 59f. Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

This paper aims to report the activities carried out for the discipline of Supervised Internship of Course Conclusion, of the graduation course in Biotechnology at UFPel. The internship has been accomplished from March to August of 2012 and was developed at McGill University, McDonald Campus, located in Sainte-Anne-de-Bellevue, Quebec, Canada. The main research line in this period comprises the area of cell reprogramming and epigenetics. The experiments intended to increase the efficiency of cloning techniques, through a treatment in the nuclei donor cells. These treatments would be done with molecules previously described to act in epigenome, reprogramming the cells to a pluripotent stage, and so, increasing the possibility of giving rise to a normal embryo. Porcine fetal fibroblasts were exposed to three molecules: Scriptaid, DZNep, and Vitamin C. Cells were cultured for 12 days and samples were collected for RNA extraction on days 3, 6 and 12. The cDNA was constructed for each treatment, and evaluated the gene expression for the pluripotency genes, Sox2, Nanog and Oct4, and genes of cellular senescence p53 and p15. As a control, RNA was extracted from embryos produced by parthenogenetic activation technique. In addition, other activities were accompanied during this period, as the cloning *handmade* technique, the in vitro fertilization of pig oocytes following cultivation in the presence of DZNep, and laboratory weekly activities, as sterilization of materials, preparing of culture mediums and solutions, and collecting ovary in the slaughterhouse.

**Keywords:** Cell reprogramming. Cloning. DZNep. Epigenome. Scriptaid. Vitamin C.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Departamento de Línguas, Literatura, e Cultura da McGill University, Campus Downtown.....	14
Figura 2	Raymond Building.....	14
Figura 3	Punção do ovário suíno com seringa de 10mL e agulha 20G1 ½.....	30
Figura 4	Placa de ativação partenogénica.....	31
Figura 5	Desenho esquemático do experimento com reprogramação celular....	33
Figura 6	Gel de agarose a 1,5%, com amostras amplificadas para o gene da Ciclofilina-A.....	39
Figura 7	Géis de agarose a 2% demonstrando o resultado da técnica de PCR para o gene Oct 4.....	40
Figura 8	Géis de agarose a 2% demonstrando o resultado da técnica de PCR para o gene Nanog.....	41
Figura 9	Géis de agarose a 2% demonstrando o resultado da técnica de PCR para o gene Sox 2.....	42
Figura 10	Géis de agarose a 2% demonstrando o resultado da técnica de PCR para o gene p15.....	44
Figura 11	Géis de agarose a 2% demonstrando o resultado da técnica de PCR para o gene p53.....	45
Figura 12	Desenho esquemático do experimento realizado com clonagem pela técnica de <i>handmade</i> .....	48

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Características gerais dos <i>primers</i> construídos para avaliação de expressão gênica dos FFS e embriões partenogênicos.....	34
Tabela 2	Resultados das quantificações após o processo de extração de RNA.....	37
Tabela 3	Resultado da quantificação na extração de RNA em pools de 100 blastocistos, pelo protocolo de Mini-Trizol, e pelo kit de extração.....	38

## LISTA DE ABREVIATURAS

ADP – 5' difosfato de adenosina

Arg – Arginina

BSA – Albumina de Soro Bovino

BTS – Beltsville Thawing Solution (Solução de Descongelamento Beltsville)

cAMP – adenosina 3',5'-monofosfato cíclico

CH<sub>3</sub>CO – Acetil

CO<sub>2</sub> – Dióxido De Carbono

CpG – Citosina - Fosfato - Guanina

CTPi – Células Tronco Pluripotentes Induzidas

DMEM - Dulbecco's modified Eagle's medium (Meio Dulbecco modificado por Eagle)

DNA – Ácido Desoxiribonucléico

DZNep – 3-deazaneplanocina A

EGF – Fator De Crescimento Epidermal

EZH2 – Enhancer of Zeste homolog 2

FFS – Fibroblastos fetais suínos

FIV – Fertilização *in vitro*

FSH – Hormônio Folículo Estimulante

H3K27me3 – Trimetilação da Lisina 27 na Histona H3

H3K4me3 – Trimetilação da Lisina 4 na Histona H3

H4K20me3 – Trimetilação da Lisina 20 na Histona H4

HATs – Histona acetiltransferases

HDACi – Inibidora de Histona Desacetilase

HDACs – Histona desacetilases

HEPES – 4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazinoetanossulfônico

HMTi – Inibidora da Histona Metiltransferase

LH – Hormônio Luteinizante

Lys – Lisina

NaCl – Cloreto de sódio

NaPy – Piruvato de sódio

NCBI – National Center for Biotechnology Information (Centro Nacional de Informação sobre Biotecnologia)

N-terminal – amino-terminal

OSKM – Oct4, Sox2, KLF4, e c-myc

pb – Pares de base

PCG – Grupo Polycomb

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

PRC2 – Complexo Repressiva Polycomb 2

PZM – Porcine Zygote Medium (Meio de Zigoto Suíno)

Real-Time PCR – Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real

SFB – Soro Fetal Bovino

TCM – Tecidual culture medium (Meio de cultivo tecidual)

Tm – Melting Temperature (Temperatura de Anelamento)

TNCS – Transferência Nuclear De Célula Somática

TSA – Tricostatina A

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	13
1.1 . McGill University.....	13
1.2 . Departamento de Ciência Animal.....	15
1.3 . Experimento com reprogramação celular.....	15
<b>2. REVISÃO DE BIBLIOGRAFIA</b> .....	18
2.1. A técnica de clonagem .....	18
2.2. O suíno como modelo animal .....	19
2.3. Epigenética e sua relação com a eficiência da clonagem .....	20
2.4. Reprogramação celular: alterar o epigenoma de uma célula.....	21
2.5. Estratégias e alternativas à reprogramação celular.....	23
2.5.1. DZNep.....	25
2.5.2. Scriptaid.....	25
2.5.3. Vitamina C.....	26
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	28
3.1 Objetivos Gerais.....	28
3.2 Objetivos Específicos.....	28
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	29
4.1. Produção de partenotos.....	29
4.1.1. Coleta de ovários, punção e maturação dos oócitos.....	29
4.1.2. Ativação partenogenética, cultivo e congelamento dos blastocistos.....	31
4.2. Cultivo celular.....	32
4.2.1. Descongelamento dos fibroblastos e cultivo celular.....	32
4.2.2. Exposição dos fibroblastos fetais suínos aos tratamentos.....	32
4.3. Construção dos primers.....	34
4.4. Extração de RNA, quantificação, e construção do cDNA.....	35
4.5. Reação em cadeia da polimerase.....	35
<b>5. RESULTADOS</b> .....	36
5.1. Crescimento celular.....	36
5.2. Extração de RNA dos blastocistos.....	38
5.3. Reação em cadeia da polimerase e eletroforese.....	38
5.3.1. Ciclofilina-A.....	39
5.3.2. Oct 4.....	40

5.3.3. Nanog.....	41
5.3.4. Sox 2.....	41
5.3.5. p15.....	43
5.3.6. p53.....	44
5.4. Perspectivas futuras.....	45
<b>6. OUTRAS ATIVIDADES ACOMPANHADAS.....</b>	<b>47</b>
6.1. Clonagem por <i>handmade</i> .....	47
6.2. Fertilização <i>in vitro</i> , cultivo dos embriões com DZNep e fixação das estruturas.....	49
6.3. Atividades de manutenção do laboratório.....	50
<b>7. CONCLUSÃO .....</b>	<b>51</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>52</b>

## **1. INTRODUÇÃO**

Este relatório descreve as atividades realizadas durante o período destinado à disciplina de Estágio Supervisionado de Conclusão de Curso, do curso de Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas. O estágio foi realizado no laboratório do professor Vilceu Bordignon, Departamento de Ciência Animal, no MacDonald campus da McGill University localizado na cidade de Sainte-Anne-de-Bellevue, Quebec, Canadá. O início das atividades práticas se deu no dia 26 de março de 2012.

### **1.1. McGill University**

A McGill University é uma instituição fundada em 1821, considerada em 2011 a melhor universidade do Canadá, e a décima sétima melhor do mundo (QS World University Rankings). O campus principal, chamado de Downtown Campus, fica situado na cidade de Montreal, e lá se localizam a maioria dos cursos de graduação e pós-graduação oferecidos pela instituição (Fig.1).



Figura 1. Departamento de Línguas, Literatura, e Cultura da McGill University, Campus Downtown.

Fonte: BAUER, K. 2012.

O segundo campus, chamado MacDonald campus, está localizado na cidade de Sainte-Anne-de-Bellevue, à 30km de Montreal, e lá encontram-se a Faculdade de Ciências Agrárias e Ambientais, a Faculdade de Nutrição Humana, o Instituto de Parasitologia, e a Escola do Meio Ambiente da McGill. Dentro da Faculdade de Ciências Agrárias e Ambientais encontra-se o Departamento de Ciência Animal, local onde foi realizado este estágio (Fig. 2).



Figura 2. Raymond Building. Prédio localizado no campus MacDonald, onde estão instalados os laboratórios do Departamento de Ciência Animal.

## **1.2. Departamento de Ciência Animal**

Localizado no campus MacDonald da McGill University, o Departamento de Ciência Animal conta com 12 professores pesquisadores que atuam nas áreas de Reprodução Animal, Genética Animal, Nutrição Animal, e Biologia Molecular. As pesquisas vão de pequenos a grandes animais, pois além deste departamento possuir um biotério para abrigar camundongos e ratos, e ainda possui a fazenda da universidade, que se encontra dentro do campus MacDonald. Esta fazenda abriga tanto animais para ensino e pesquisa, quando disponibiliza lotes de terras para este mesmo fim, para os estudantes do Departamento de Ciência Vegetal. Este é um grande diferencial da universidade, pois as pesquisas vão desde o laboratório até a sua aplicação a campo.

## **1.3. Experimento com Reprogramação Celular**

A principal atividade desenvolvida durante o período de estágio foi um experimento que testou diferentes moléculas adicionadas no meio de cultivo de fibroblastos fetais suínos (FFS) em diferentes tempos. O objetivo desse experimento é de que estas moléculas atuem no epigenoma celular e ajudem no processo de reprogramação celular, quando realizada a técnica de clonagem por transferência nuclear de célula somática (TNCS) utilizando as células tratadas como doadoras de núcleo.

A técnica de clonagem abriu novos caminhos para a ciência não só quanto à produção de um número ilimitado de animais de alto mérito genético, mas também animais com alterações genéticas introduzidas no genoma (HOUDEBINE, 2000), animais em extinção (OH et. al. 2008; PIÑA-AGUILAR et. al., 2009), animais utilizados como modelos biológicos (NIEMANN; RATH; WRENZYCKI, 2003), cultivo de células-tronco para terapias e engenharia tecidual (KOH; ATALA, 2004). Além disso a clonagem é uma ferramenta de extremo valor científico utilizada em estudos de genômica, biomedicina, biotecnologia, embriologia, dentre outros. Esta técnica já vem sendo estudada e aplicada desde o início do século XX, porém a transferência nuclear de célula somática (TNCS) só foi consolidada em 1997, através do trabalho inovador do pesquisador Wilmut com clonagem da ovelha Dolly. Wilmut (1997)

provou para a comunidade científica que era possível gerar um indivíduo a partir de uma célula somática de um indivíduo adulto.

Apesar do grande interesse e da concentração de esforços para tornar a técnica de TNCS mais eficaz e reprodutiva, muitos problemas ainda são relatados a cerca da clonagem. Com certeza dentre todos os problemas o que gera mais preocupação são devido às anormalidades que os clones apresentam: desde problemas com a manutenção da prenhez, do desenvolvimento embrionário e placentário, até defeitos funcionais pós-natais. Acredita-se que essas anormalidades ocorram devido uma reprogramação ineficiente das marcas epigenéticas da célula somática doadora de núcleo durante o desenvolvimento embrionário (PERECIN, 2007; BUI et. al., 2011).

Muitas estratégias têm sido buscadas para tentar melhorar a reprogramação celular do embrião clonado, como a sincronia entre o estágio do ciclo celular das células doadoras e dos oócitos recipientes (DU, TIAN, YANG; 2002); e o uso de células somáticas de várias origens teciduais (WELLS et. al. 2003), passagens (LIU et. al. 2001), condições de cultivos (ZAKHARTCHENKO et. al., 1999), e de doadores de diferentes idades (XUE et. a., 2003). Porém nos últimos anos investiu-se em novas estratégias, como a tentativa de reverter uma célula somática a um estágio mais pluripotente, já que se acredita que uma célula doadora de núcleo com menos marcas epigenéticas seja mais eficiente para a clonagem do que uma célula diferenciada. Para isso tem sido utilizadas células-tronco para a TNCS, ou então drogas e infecções vetoriais para promover modificações epigenéticas na célula doadora (TIAN et. al., 2003, NISHISHITA et. al. 2012).

Algumas moléculas já foram descritas por atuarem no epigenoma celular e aumentar a eficiência da clonagem, como as inibidoras de deacetilase (HDACi) tricostatina A (TSA), o ácido suberoilânilide hidroxâmico e a oxamflatin (ONO et. al., 2010; KISHIGAMI et. al., 2006; RYBOUCHKIN; KATO; TSUNODA, 2006). Para este estudo escolhemos outras três moléculas que estão sendo bastante descritas por otimizarem o processo de reprogramação: o Scriptaid, o DZNep, e a Vitamina C.

O Scriptaid é outra HDACi, que além de ser menos tóxica a célula comparada ao TSA, possui ainda certa atividade de histona acetilase. Em suínos, a adição de Scriptaid no meio de cultivo dos embriões foi relacionada a um aumento na eficiência de clonagem em mini-pigs de 0 para 1,3% (ZHAO et. al., 2009); enquanto para a linhagem Landrace a eficiência da clonagem passou de 0,4 para 1,6%

utilizando fibroblastos fetais, e de 0 para 3,7% utilizando fibroblastos extraídos da orelha (ZHAO et al., 2010).

A molécula 3-deazaneplanocina A (DZNep) é uma inibidora da histona metiltransferase (HMT), e inibe principalmente a metilação de algumas histonas como H3K27me3, H3K4me3, e H4K20me3 (MIRANDA et. al., 2009; HE et. al., 2012). Estudos recentes em células cancerosas, indicam que esta molécula reprime uma variedade de modificações de histonas através de mecanismos que ainda não são claros (MIRANDA et. al., 2009).

Já a Vitamina C tem sido cogitada nos últimos anos como indutora de células-tronco pluripotentes induzidas (CTPi) em fibroblastos humanos e murinos, induzindo a célula somática a sair do estágio de senescência através da repressão parcial da atividade da proteína p53 (ESTEBAN et. al., 2010). Além disso, sabe-se que a vitamina C atua como cofatora de algumas histonas demetilases (WANG et. al., 2011).

O tratamento em fibroblastos fetais suínos (FFS) doadores de núcleo utilizando moléculas que exercem efeito no epigenoma poderia aumentar o sucesso de clonagem por TNCS. Para isso, essas células devem alcançar um estágio mais pluripotente e expressarem os genes Nanog, Oct4, e Sox2 após o tratamento. Portanto, os FFS foram expostos às moléculas DZNep, Scriptaid e Vitamina C e suas diferentes combinações, em diferentes tempos de cultivo, e avaliadas quanto à sua expressão gênica.

## **2. REVISÃO DE BIBLIOGRAFIA**

### **2.1. A Técnica de Clonagem**

A clonagem é um mecanismo de propagação que ocorre naturalmente em plantas e bactérias. O termo 'clone' foi criado pelo botânico Webber em 1903 que o definiu como uma população de moléculas, células ou organismos originadas de uma matriz comum, sendo estas, idênticas à célula que lhes deu origem (ZATZ, 2004). Esse evento chamou a atenção dos cientistas que com o passar do tempo adaptaram e desenvolveram ferramentas para obterem a clonagem de forma artificial em laboratório. Esse avanço trouxe uma série de alternativas para estudos em biotecnologia, biomedicina, embriologia, genômica, dentre outros.

A clonagem realizada artificialmente foi empregada pela primeira vez em animais pelo pesquisador Hans Driesch no final dos anos 1880, onde este acidentalmente criou um clone quando tentava provar que o material genético não se perdia ao ocorrer a divisão celular. Já no começo do século XX, o pesquisador Hans Spemman, considerado o pai da embriologia experimental, bipartiu blastômeros de embriões de salamandra *Triturus taeniatus*; e em 1924 transferiu células de gástrulas de salamandra em embriões em diferentes estágios de desenvolvimento, o que lhe rendeu o Prêmio Nobel de Fisiologia/Medicina, em 1935 (TAGARELLI et. al., 2004). Baseados nos achados de Spemman, Robert William Briggs e Thomas Joseph King (1952) transferiram núcleos de blástulas de embriões de sapo-leopardo *Rana pipiens* em ovos enucleados. Os clones nascidos apresentaram anormalidades e fizeram os pesquisadores hipotetizarem que não seria possível criar um clone a partir de uma célula somática.

Porém a técnica de transferência nuclear foi sendo aprimorada e Wilmut (1997), com o nascimento da ovelha Dolly, demonstrou pela primeira vez que era possível gerar um embrião a partir de uma célula totalmente diferenciada. Esse trabalho foi um marco na história da clonagem, pois demonstrou que genes inativados durante a diferenciação celular poderiam ser completamente reativados pelo processo chamado reprogramação nuclear, e um núcleo diferenciado poderia ser revertido para o estado de totipotência (TIAN et. al., 2003). Foi estabelecida então a técnica de transferência nuclear de célula somática (TNCS), a qual o núcleo de uma célula adulta é transferido a um oócito enucleado no estágio de metáfase II do ciclo celular, gerando um novo indivíduo geneticamente idêntico ao doador da célula.

A clonagem a partir de células somáticas - principalmente em mamíferos - abriu portas para uma série de possibilidades: a recuperação de espécies em perigo de extinção (OH et. al. 2008; PIÑA-AGUILAR et. al., 2009); a multiplicação de animais de mérito genético superior; e a multiplicação de animais transgênicos, principalmente os produtores de proteínas heterólogas com propriedades farmacêuticas, os utilizados para experimentação animal, e os utilizados para xenotransplantes (HOUEBINE, 2000; NIEMANN; RATH; WRENZYCKI, 2003). Em humanos essa técnica ainda não está legalizada para fins reprodutivos, e muito ainda precisaria ser feito para que ela fosse estabelecida, devido às anormalidades funcionais e fisiológicas que muitos clones animais apresentam, além da questão ética que o assunto aborda. Porém, é bastante interessante estudar e aprimorar a técnica para uso humano a fim de aplicá-la à terapia celular e regenerativa. Além disso, a técnica de clonagem em animais tem demonstrado ser uma eficiente ferramenta para o estudo de função de genes, *imprinting* genômico, reprogramação genômica, doenças genéticas, terapia gênica, podendo estas serem estendidas à compreensão de doenças, disfunções e terapias voltadas a humanos (RIDEOUT III; EGGAN; JAENISCH, 2001; TIAN et. al., 2003).

## **2.2. O Suíno como Modelo Animal**

Na escolha de um modelo animal muitos critérios são levados em conta, como a praticidade de manutenção e manejo do animal (por exemplo, alimentação, requisitos de habitação, custos, características físicas e comportamentais do

animal); a similaridade do animal em relação ao humano para estudos de doenças (por exemplo, semelhanças fisiológicas, anatômicas, patológicas); e quanto às questões éticas, às leis de governo e às restrições associadas ao modelo animal. Os roedores, por terem um tamanho pequeno, baixo custo, reprodução rápida e tempo de vida curto, têm sido historicamente os modelos animais mais utilizados em pesquisas, porém estes não possuem grande semelhança fisiológica aos humanos. Como alternativa, buscaram-se novos modelos animais como primatas e caninos, mas estes tem sido cada vez menos utilizados devido às questões éticas e os altos custos associados à suas utilizações e manutenções (SWANSON et. al., 2004).

Portanto, o suíno tem sido um modelo animal bastante requisitado em pesquisas científicas. Além de ser um animal domesticado, dócil, e de custo de manutenção relativamente baixo, ele tem se mostrado o melhor modelo para humano (PUY et. al. 2011). A insulina produzida pelo suíno foi por anos utilizada para tratar diabetes humana; as válvulas do coração de suínos têm sido transplantadas para humanos a mais de 50 anos; a pele suína tem sido transplantada a vítimas de queimaduras a mais de 30 anos (SCHUURMAN; PIERSON III, 2008); e ele tem sido um modelo muito utilizado em pesquisas cirúrgicas. Tudo isso porque os suínos são fisiologicamente muito parecidos aos humanos, como no sistema cardiovascular, renal e gastrointestinal; além do tamanho e da anatomia.

O suíno também tem sido bastante reportado em pesquisas na área da saúde humana com obesidade, nutrição, e doenças transmissíveis (ZHAO; WHYTE; PRATHER, 2010; KUSMUK; SCHOOK, 2011). Além disso, ele também está sendo muito estudado e geneticamente aprimorado para utilização em xenotransplantes, técnica que tem a finalidade de utilizar órgãos de animais para transplantes em humanos. Estudos utilizando células-tronco embrionárias suínas também têm crescido como alternativa às células-tronco embrionárias humanas, já que o estabelecimento desta última tem sido considerado imoral e antiético (HALL, 2011).

### **2.3. Epigenética e sua Relação com a Eficiência da Clonagem**

A técnica de clonagem por TNCS, principalmente em mamíferos, traz uma série de alternativas e benefícios para as mais diversas áreas da ciência, porém a expansão dessa tecnologia ainda se encontra limitada devido esta apresentar uma

série de problemas. Clones de mamíferos gerados por transferência nuclear possuem uma baixa taxa de sobrevivência devido à alta incidência de perdas gestacionais, morte neonatal, anormalidades no desenvolvimento, e defeitos pós-natais (SHEN et. al., 2011; TIAN et. al., 2003). Muitas espécies mamíferas já foram clonadas com sucesso, porém a reprodutibilidade e a eficiência desta técnica ainda se encontram limitadas.

Tem sido proposto que as anormalidades encontradas em clones de animais seriam atribuídas às modificações epigenéticas presentes no genoma da célula doadora, que teriam sido reprogramadas de forma irregular após a técnica de TNCS (BUI et. al., 2011). Já foi relatado que as anormalidades observadas em animais clonados não são transmitidas para as progênes, indicando que a causa dessas deficiências não são devido às alterações cromossômicas ou mutações do DNA, mas sim às falhas de reprogramação das características epigenéticas das células somáticas doadoras, causando alterações na expressão gênica global e nos genes *imprinted* (SHIMOZAWA et. al, 2002). Portanto, é fundamental entender o processo de diferenciação e reprogramação celular a fim de otimizar e melhorar o sucesso da clonagem a partir de uma célula já diferenciada.

#### **2.4. Reprogramação Celular: Alterar o Epigenoma de uma Célula**

Programar uma célula somática a se tornar novamente uma célula indiferenciada tem sido o objetivo de muitos grupos de pesquisa por todo o mundo. Pela diferenciação ser geralmente irreversível sob contextos fisiológicos, muitos métodos tem sido desenvolvidos para reprogramar células adultas, com o objetivo de revertê-las a um estágio menos diferenciado ou um estágio de célula-tronco (FENG et. al., 2009). Estudos em genética já demonstraram que além da fita primária de DNA, a identidade celular pode ser influenciada por outro tipo de informação, chamada de epigenética (PERECIN, 2007). Mudanças epigenéticas como a metilação de DNA e as modificações em histonas, alteram padrões da expressão gênica, regulando a diferenciação celular e fazendo com que cada célula desempenhe seu papel no organismo. Essas marcas epigenéticas devem ser muito bem reguladas durante o desenvolvimento embrionário para permitir as transições próprias dos diferentes tipos celulares (ONO et. al., 2010).

Nas células eucarióticas, o DNA genômico está arranjado em uma estrutura compacta conhecida como cromatina. A unidade fundamental da cromatina é o nucleossomo, que é composto de duas cópias de cada histona, envoltas por em torno de 146 pb de DNA. São quatro as histonas que compõem um nucleossomo: H2A, H2B, H3 e H4 (GARCIA; SHABANOWITZ; HUNT; et. al., 2007). Os nucleossomos, por sua vez, estão ligados entre si por comprimentos variáveis de DNA e histona *linker* H1. As caudas N-terminal das histonas podem ser submetidas a várias modificações pós-traducionais tais como acetilação, metilação, fosforilação, ubiquitinação, e ADP-ribosilação (LI, 2002). Estas modificações de histonas são as responsáveis pela remodelação da cromatina: elas controlam a sua compactação estrutural regulado a transcrição do gene, alterando o posicionamento e o espaçamento dos nucleossomas, e mediando os contatos entre histonas e DNA (GAN et. al., 2007).

A acetilação de histonas é a mais estudada das modificações de histonas. Várias histona acetiltransferases (HATs) já foram descritas como catalizadoras da adição de um grupo acetil ( $\text{CH}_3\text{CO}$ ) a resíduos lisina das cadeias laterais dos octâmeros de histonas. Quando ocorre a acetilação das caudas de histonas, as aminas são convertidas a amidas, neutralizando a carga positiva que havia anteriormente. Com a carga neutra, a interação entre as histonas e os grupos fosfato é dificultada, promovendo conseqüentemente o desdobramento da cromatina compactada e a exposição da fita de DNA para os fatores de transcrição (GAN et. al., 2007). Assim como ocorre a acetilação das histonas, existem enzimas que podem as desacetilar: as histona desacetilases (HDACs). Estas realizam função oposta as HATs, removendo os grupos acetila, devolvendo a carga positiva à cauda da histona. Com isso haverá o aumento da interação entre a histona e o DNA, causando uma repressão do processo de transcrição (ZHU et. al, 2001). A metilação de histonas é promovida por algumas metiltransferases que tem como alvo determinados resíduos de arginina e lisina nas histonas. Metilação de arginina em histonas H3 (Arg2, 17, 26) e H4 (Arg3) tem sido relacionadas à ativação da transcrição; enquanto a metilação da lisina pode estar relacionada tanto à ativação transcricional (H3 Lys4, 36, 79) quanto ao silenciamento gênico (H3 Lys9, 27, H4 Lys20) (LI, 2002; HE et. al., 2011). As cadeias laterais de lisina podem ser mono-, di- ou tri-metiladas, enquanto que a cadeia lateral de arginina pode ser mono-metilada ou di-metilada (simétrica ou assimetricamente) (GARCIA; SHABANOWITZ; HUNT;

et. al., 2007). É possível que a metilação induza a alterações na arquitetura da cromatina, no entanto um grupo metil é relativamente pequeno e sua adição aos resíduos de lisina ou arginina não neutralizam a sua carga. Por esse motivo é improvável que a metilação sozinha irá afetar significativamente a estrutura da cromatina, e sim que ela crie locais de ligação para as proteínas reguladoras que contêm domínios de ligação especializados (BANNISTER; KOUZARIDES, 2005).

A metilação do DNA é outra marca epigenética e consiste na adição de um grupo metil à citosina. É uma das mais estáveis modificações epigenéticas conhecidas e a principal candidata a coordenar a herança epigenética entre as gerações (PERECIN, 2007). As enzimas metiltransferases do DNA são as responsáveis por adicionarem o grupo metil ao carbono 5 da citosina, gerando a 5-metilcitosina. Esse fenômeno ocorre quase que exclusivamente nas repetições de C (citosina) ao lado de G (guanina), exceto nas chamadas ilhas CpG (CEDAR; BERGMAN, 2009). Em embriões clonados, os defeitos de metilação do DNA são provavelmente muitas vezes causados pela expressão anormal de metiltransferases de DNA (XING et. al., 2009). Durante o desenvolvimento embrionário a metilação do DNA é controlada por um processo de 'ligamento' e 'desligamento'. Esse evento epigenético tem sido bastante estudado em relação ao desenvolvimento embrionário de roedores, porém em grandes mamíferos, existe ainda pouca informação (GAO; HYTTEL; HALL, 2011).

## **2.5. Estratégias e Alternativas à Reprogramação Celular**

Células somáticas podem ser reprogramadas apenas pela transferência de seu conteúdo nuclear em oócitos, ou seja, por TNCS; ou pela fusão da célula diferenciada a uma célula-tronco. Isso indica que oócitos infertilizados e células-tronco contêm fatores que conferem totipotência e pluripotência a células somáticas (COWAN et. al., 2009; WILMUT et. al., 1997). Provavelmente esses fatores capazes de causar a reprogramação da célula somática, também desenvolvam um papel importante na manutenção da identidade da célula-tronco, e possuam também importância na indução da pluripotência em uma célula que já se encontra diferenciada (TAKAHASHI; YAMANAKA, 2006).

Várias estratégias têm sido empregadas para aumentar a eficiência do procedimento de transferência nuclear e fazer com que o processo de

reprogramação ocorra de forma mais regular. A maioria dos esforços tem se voltado para as células doadoras de núcleo. Isso inclui a sincronia do estágio do ciclo celular das células doadoras e dos oócitos recipientes (DU, TIAN, YANG; 2002); uso de células somáticas de várias origens teciduais (WELLS et. al. 2003), passagens (LIU et. al. 2001), condições de cultivos (ZAKHARTCHENKO et. al., 1999), doadores de diferentes idades (XUE et. a., 2003); uso de células-tronco com baixos níveis de marcadores epigenéticos (NISHISHITA et. al. 2012); e uso de drogas para promover modificações de marcadores epigenéticos da célula doadora (SHI et. al. 2008).

Até hoje, a técnica mais citada e utilizada para reprogramar e induzir pluripotência em células somáticas tem sido a proposta por Yamanaka e Takahashi (2006). A técnica é baseada na transcrição direta de quatro fatores - Oct4, Sox2, KLF4, e c-myc (OSKM) - utilizando infecção retroviral. Porém, a indução de pluripotência por retrovírus ou lentivírus apresenta algumas limitações como a indução de tumorigênese por mutação insercional, e o risco de reativação do transgênese durante a diferenciação das células tronco pluripotentes induzidas (CTPi), que poderia afetar a identidade da linhagem celular e o funcionamento das células derivadas destas (YU et. al., 2011).

Como alternativa às técnicas que utilizam vetores virais, algumas moléculas já foram sugeridas por influenciarem na reprogramação epigenética das células somáticas, e então otimizarem o processo de reprogramação celular. A molécula tricostatina A (TSA), é um dos exemplos: é uma inibidora de histona desacetilase (HDACi), que já foi relatada por aumentar a eficiência na clonagem por TNCS de embriões de camundongo (KISHIGAMI et. al., 2006; RYBOUCHKIN; KATO; TSUNODA, 2006). Outras moléculas HDACi, como o ácido suberoilânilide hidroxâmico e a oxamflatin, tiveram como resultado no tratamento de embriões, a redução significativa na taxa de apoptose em blastocistos, aumentando a taxa de desenvolvimento de clones de camundongos, e aumentando o estabelecimento de linhagens de células-tronco embrionárias derivadas de transferência nuclear sem apresentar anormalidades (ONO et. al., 2010).

Novas moléculas têm sido propostas por atuarem no epigenoma e na reprogramação celular, dentre elas, as moléculas que utilizamos neste trabalho e serão descrita a seguir:

### 2.5.1. DZNep

A molécula 3-deazaneplanocina A (DZNep) é uma inibidora da histona metiltransferase (HMTi), enzima esta que catalisa a transferência de grupos metil à resíduos de proteínas histonas. O DZNep foi identificado por inibir principalmente a metilação de histonas como H3K27me3, H3K4me3, e H4K20me3 (HE et. al., 2012). A metilação das histonas é uma forma de regulação epigenética onde ocorrem modificações em resíduos lisina e arginina pela adição de um, dois ou três grupos metil (mono, di e trimetilação, respectivamente). Esse fenômeno epigenético está normalmente associado com a repressão transcricional, porém a metilação de alguns resíduos de lisina e arginina de histonas podem resultar em ativação transcricional (CHAO, 2012).

Proteínas do grupo Polycomb (PCG) desempenham um papel chave no silenciamento de genes de diferenciação em células estaminais embrionárias. Elas mantêm a regulação gênica por meio de modificações de histonas, e portanto estão bastante envolvidas na regulação celular. A enzima EZH2 (Enhancer of Zeste homolog 2), é uma histona metiltransferase que faz parte do Complexo Repressiva Polycomb 2 (PRC2), e trimetila a histona H3 na lisina 27 (H3K27me3) (MOMPARLER et. al. 2012). DZNep foi originalmente identificado por reduzir os níveis celulares de EZH2 e, conseqüentemente, remover H3K27me3 do genoma (PEREZ et. al., 2012). Estudos recentes em células cancerosas, indicam que DZNep tem um efeito global sobre a cromatina, reprimindo uma variedade de modificações de histonas, tanto ativas quanto repressivas, através de mecanismos que ainda não são claros. Além disso alguns estudos sugerem que o DZNep atue de outra forma, não somente no epigenoma (MIRANDA et. al., 2009; XIE et. al., 2011).

### 2.5.2. Scriptaid

Scriptaid é uma molécula descoberta recentemente, inibidora de histona desacetilase (HDACi), com certa atividade de histona acetilase e baixa toxicidade celular em comparação à TSA (SU et. al, 2000). Ao inibir a HDAC, permite com que a acetilação das caudas de histonas sejam mantidas, e estas permaneçam com a carga neutra. Neutralizadas, as caudas são impossibilitadas de interagir com a fita

de DNA, que acaba se mantendo exposta, facilitando a transcrição (ZHU et. al., 2001; GAN et. al., 2007).

Van Thuan (2009) relatou um aumento no desenvolvimento *in vitro* e *in vivo* de embriões clones de camundongo utilizando um tratamento com Scriptaid adicionado no meio de ativação e no meio de cultivo. Em bovinos, o tratamento com Scriptaid aumentou a taxa de clivagem e de blastocistos, em comparação ao grupo controle (WANG et. al, 2011). Em suínos, a adição da molécula também foi relacionada a um aumento na eficiência de clonagem em mini-pigs de 0 para 1,3%, que significou o aumento no número de leitões vivos de 0 para 14 (ZHAO et. al., 2009); enquanto para a linhagem Landrace a eficiência da clonagem passou de 0,4 para 1,6% utilizando fibroblastos fetais para a clonagem, e de 0 para 3,7% utilizando fibroblastos extraídos da orelha para a clonagem (ZHAO et al., 2010). Esses resultados aumentam mais a hipótese de que o aumento da acetilação e a inibição da desacetilação das histonas pelo Scriptaid ajudam em um remodelamento e uma reprogramação mais adequada após a técnica de TNCS.

### 2.5.3. Vitamina C

A Vitamina C é um nutriente essencial na regulação do metabolismo e na prevenção do estresse oxidativo no organismo de muitos seres vivos (PADAYATTY et. al, 2003). Essa molécula também participa de muitas reações enzimáticas, tendo papel essencial em reações na síntese de colágeno (VAN ROBERTSON; SCHWARTZ, 1953). Também tem sido reportada em estudos, atribuindo papel na prevenção e no tratamento do câncer (GANN, 2009; FUKUMURA et. al, 2012), do Alzheimer (HARRISON et. al., 2009; PARACHIKOVA et. al., 2010), entre outros.

Nos últimos anos, a vitamina C tem sido cogitada como indutora de células-tronco pluripotentes induzidas (CTPi) em fibroblastos humanos e murinos. Apesar da atividade antioxidante da vitamina C ser bastante importante para o processo, já que existe o aumento de espécies reativas de oxigênio durante a reprogramação celular, não é esta a principal atuação em reprogramação, já que outros antioxidantes como vitamina E, N-acetilcisteína, ácido lipóico, já foram testados e não apresentaram outro efeito em células a não ser a redução de radicais livres (ESTEBAN et. al., 2010; WANG et. al., 2011).

A senescência celular já foi atribuída como um obstáculo à reprogramação celular, aumentando o interesse científico por encontrar compostos que revertam esse estágio celular sem aumentar o risco de mutação (BANITO et. al., 2009). Esteban (2010) demonstrou em fibroblastos humanos e murinos, que a vitamina C melhora a eficiência da reprogramação, pois esta faz com que a célula somática saia do estágio de senescência, através da repressão parcial da atividade da proteína p53. A atividade totalmente reprimida da proteína p53 tem sido atribuída a mutações e geração de tumores, portanto a sua atividade parcialmente reprimida tem sido considerada uma alternativa segura para a reprogramação (HUANG et. al., 2011).

Já Wang (2011) mostrou que a vitamina C aumentou a geração de CTPi murinas por facilitar a atividade de duas proteínas histona demetilase, a Jhdm1a e a Jhdm1b. Foi relatada a diminuição de H3K36me2/3 nos dias 5 e 7 após o tratamento com a vitamina.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivos gerais**

Otimizar a técnica de transferência nuclear de célula somática, tratando as células doadoras de núcleo com drogas previamente descritas por serem modeladores epigenéticos.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- Avaliar expressão de genes de pluripotência em fibroblastos fetais suínos tratados com as moléculas DZNep, Vitamina C, e Scriptaid;
- Produzir embriões pela técnica de ativação partenogenética, a fim de utilizá-los como controle na avaliação da expressão;
- Produzir clones pela técnica de *'handmade cloning'*, utilizando oócitos suínos, bovinos, ou os dois juntos, a fim de avaliar migração mitocondrial;
- Produzir e fixar em paraformaldeído, embriões suínos fertilizados tratados com DZNep durante o cultivo, a fim de avaliar por imunohistoquímica o desenvolvimento embrionário.

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1. Produção de Partenotos**

#### **4.1.1. Coleta de Ovários, Punção e Maturação dos Oócitos**

Ovários suínos foram obtidos de frigorífico localizado na cidade de Saint Esprit, à 80km do campus MacDonald da Universidade McGill. Os ovários conforme eram coletados, foram mantidos em garrafa térmica junto de 200mL de Solução Salina (NaCl) 0,9% adicionado antibiótico Gentamicina 1mg/L à 37°C. O transporte foi feito em caixa térmica.

A temperatura foi aferida após a chegada ao laboratório, e os ovários foram imediatamente lavados com Solução Salina 0,9% adicionado antibiótico Gentamicina 1mg/L, previamente mantido à 32°C. Após lavados, os ovários foram mantidos em banho-maria à 32°C durante a punção.

A punção dos folículos foi realizada utilizando seringa de 10mL e agulha 20G1 ½ (Fig. 3). Somente os folículos entre 3 e 6mm foram puncionados, e o líquido folicular foi sendo armazenado em tubos falcon de 50mL. Após a punção de todos os ovários, o líquido folicular foi centrifugado por 3 min a 300 x g. O sobrenadante foi aliquotado e congelado para utilização na preparação posterior de meios. O pellet foi lavado adicionando 20mL de Meio de Manipulação (TCM-199 Invitrogen; 25mM de HEPES; 26,19mM Bicarbonato de Sódio; 0,5% Gentamicina; e 1% Líquido folicular) seguindo de centrifugação, nas mesmas condições anteriores, por mais duas vezes.

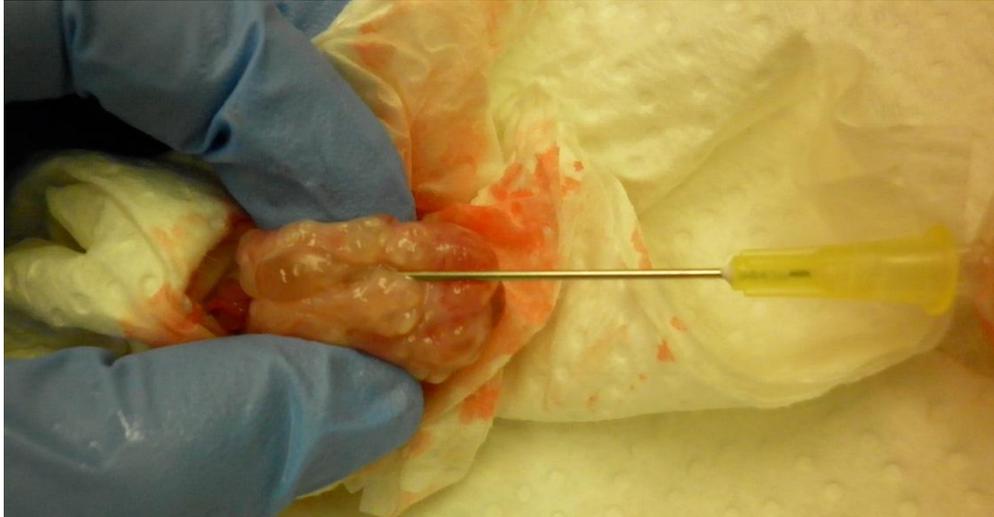


Figura 3. Punção do ovário suíno com seringa de 10mL e agulha 20G1 ½.

Após a lavagem dos oócitos do líquido folicular, estes foram ressuspensos com Meio de Manipulação e colocados em Placa de Petri para ser feita a busca dos oócitos. A busca foi feita através de seleção dos oócitos viáveis utilizando lupa estereomicroscópica e aspirador de oócitos bucal (modelo segundo De Ben). Os oócitos selecionados eram lavados em placa de 35mm de diâmetro, contendo Meio de Maturação I sem cAMP (TCM-199 Invitrogen; 100µg/mL Cisteína; 0,9mM NaPy; 3,05mM D-Glucose; 0,5mg/mL FSH; 0,5mg/mL LH; 100ng/mL EGF; 50µg/mL Gentamicina; 20% Líquido Folicular), e posteriormente passados para o Meio de Maturação I (TCM-199 Invitrogen; 100µg/mL Cisteína; 0,9mM NaPy; 3,05mM D-Glucose; 0,5mg/mL FSH; 0,5mg/mL LH; 100ng/mL EGF; 50µg/mL Gentamicina; 20% Líquido Folicular; 1mM cAMP), em gotas de 100µL cobertas pro óleo mineral. Foram distribuídos em torno de 20 a 25 oócitos por gota, e posteriormente mantidos em estufa à 38,5°C e 5% de CO<sub>2</sub>.

Passadas 22 a 26 horas, os oócitos foram lavados em Meio de Maturação II (TCM-199 Invitrogen; 100µg/mL Cisteína; 0,9mM NaPy; 3,05mM D-Glucose; 100ng/mL EGF; 50µg/mL Gentamicina; 20% Líquido Folicular;) em placa de 35mm. Os oócitos foram novamente selecionados quanto à maturação, viabilidade, e homogeneidade do citoplasma, para serem incubados em gotas de 100µL de Meio de Maturação II, por 22 a 26 horas em estufa à 38,5°C e 5% de CO<sub>2</sub>.

#### 4.1.2. Ativação Partenogenética, Cultivo e Congelamento dos Blastocistos

Os oócitos maturados (no total de 48 horas) foram passados para uma cavidade de placa NUNC, contendo 400µL de Meio de Manipulação com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB), para serem desnudados. O processo de desnudamento se deu através de pipetagens consecutivas utilizando de micropipeta de 200µL. A ativação partenogenética se deu de acordo com o protocolo descrito por Che et. al. 2007. Os oócitos desnudos foram expostos por 5 minutos à TCM 199 adicionado 15µM de ionomicina e 2mg/mL de albumina de soro bovino (BSA), seguido de lavagem no mesmo meio sem ionomicina e 3mg/mL de BSA. Os oócitos foram transferidos para PZM-3 (YOSHIOKA et. al. 2002) sem cálcio, adicionados 10mM de cloreto de estrôncio ( $\text{SrCl}_2$ ), 7,5µg/mL de citocalasina B (CtB), e 10µg/mL de cicloheximida por 4 horas (Fig. 4).

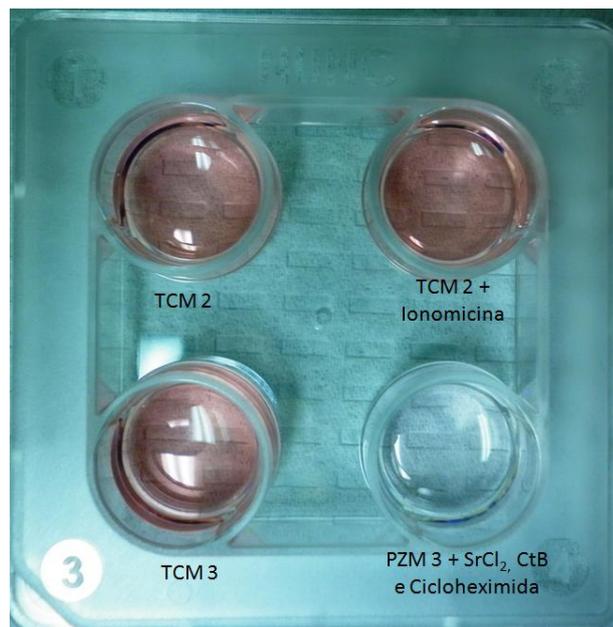


Figura 4. Placa de ativação partenogenética. No primeiro poço somente meio TCM 2; no segundo TCM 2 adicionado ionomicina; no terceiro TCM 3; e no quarto PZM-3 adicionado cloreto de estrôncio, citocalasina B e cicloheximida.

Após as 4 horas, os presumíveis zigotos foram lavados em cavidades de placa NUNC com 400µL de PZM-3 (YOSHIOKA et. al. 2002), e posteriormente passadas para placa de cultivo contendo gotas de 100µL de PZM-3, cobertas por óleo mineral. Os presumíveis zigotos foram mantidos em cultivo em estufa a 38,5°C e 5%  $\text{CO}_2$  por seis dias, havendo um *feeding* em torno de 96 horas após os o cultivo.

O *feeding* foi feito retirando 50µL de meio da gota onde estão os embriões e adicionando 50µL de meio PZM-3 com 20% SFB, para que a gota tivesse no final 10% de SFB.

No dia 7 após o cultivo, os blastocistos foram selecionados e congelados em tubo contendo 5µL de água RNase e DNase *free* para posterior extração de RNA.

## **4.2. Cultivo Celular**

### **4.2.1 Descongelamento dos Fibroblastos e Cultivo Celular**

Foram descongelados fibroblastos fetais suínos (FFS) - passagem 3 no primeiro experimento e passagem 2 no segundo experimento - previamente aliquotados em criotubos e estocados em nitrogênio líquido no laboratório do professor Vilceu Bordignon no Departamento de Ciência Animal da McGill University. O criotubo foi incubado à 37°C até descongelar, e posteriormente foi adicionado 1mL de meio DMEM (Gibco®). As células foram transferidas à um falcon de 15mL, completando até o volume máximo do falcon com meio DMEM segundo de centrifugação por 5 minutos a 1700xG. O sobrenadante foi retirado e o pellet ressuspendido em 2mL de meio DMEM, que foram distribuídos igualmente entre as placas de cultivo de 35mm de diâmetro no primeiro experimento, e de 60mm no segundo experimento, previamente identificadas. Cada placa de cultivo teve o conteúdo de meio DMEM completado para 2mL para as placas 35mm e 4mL para as de 60mm, e foram incubadas em estufa à 38,5°C e 5% de CO<sub>2</sub> até as células atingirem 50% de confluência.

### **4.2.2. Exposição dos Fibroblastos Fetais Suínos aos Tratamentos**

Após as células atingirem 50% de confluência, elas foram expostas aos tratamentos: Vitamina C à 50µg/mL (HUANG et. al., 2011); Scriptaid à 500nM (ZHAO et. al., 2010); e DZNep à 5µM (TAN et. al., 2007). Ao mesmo tempo, células do grupo controle foram cultivadas utilizando somente o meio DMEM. Todos os grupos tinham o meio trocado no máximo a cada 72 horas.

No primeiro experimento as células foram expostas às moléculas durante os 12 dias, tendo amostras coletadas para extração de RNA nos dias 3, 6 e 12 após o começo do tratamento, assim como o grupo controle. Na repetição 1 do primeiro experimento, foram cultivadas três placas de cada tratamento para ser congelada a -

80°C com 250µL de Trizol nos dias 3, 6 e 12. Já na repetição 2, as células foram tripsinizadas por cerca de 3 minutos, centrifugadas junto de cerca de 12 mL de DMEM em falcon por 5 minutos a 1700xG. O pellet era ressuspendido em 1mL de DMEM, onde 500µL voltavam a serem cultivados, e os outros 500µL eram centrifugados novamente, e este segundo pellet era ressuspendido em Trizol e congelado a -80°C (Fig. 5).

No segundo experimento as células foram cultivadas combinando as moléculas da seguinte forma: a) Vitamina C + Scriptaid; b) Scriptaid + DZNep; c) DZNep + Vitamina C; d) Vitamina C + Scriptaid + DZNep; e) Controle. Nesse experimento as células foram expostas às combinações das moléculas pelos primeiros 3 dias, e posteriormente mantidas apenas com o meio DMEM. Foram coletadas amostras para a extração de RNA nos dias 3, 6 e 12 após o começo dos tratamentos, da mesma forma feita na repetição 2 do primeiro experimento (Fig. 5).

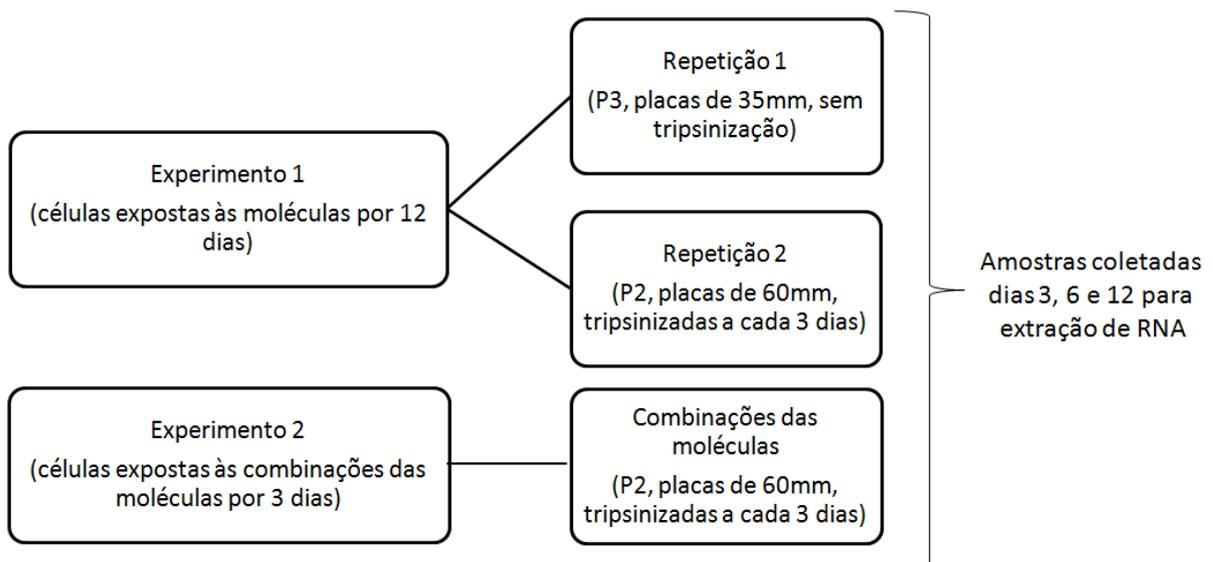


Figura 5. Desenho esquemático do experimento com reprogramação celular. No experimento 1, as células ficaram 12 dias em contato com as moléculas separadamente, e foram feitas duas repetições. Na repetição 1 as placas de 35mm eram congeladas no dia de coletar a amostra para extração de RNA, e na repetição 2, a placa era tripsinizada e somente metade das células eram congeladas, enquanto a outra metade voltava para o cultivo. No experimento 2 foi feita somente uma repetição com a combinação das moléculas em contato com as células somente por 3 dias. Até o dia 12 elas foram cultivadas apenas com DMEM, mas tendo as células tripsinizadas nos dias 3, 6 e 12 para coleta das amostras.

### 4.3. Construção dos *Primers*

Foram construídos *primers* para os genes: Nanog, Oct4, e Sox2, genes usados para avaliar pluripotência, já que estes são expressos somente neste tipo de célula (GAN et. al., 2007); e para os genes das proteínas p15 e p53, já que estas estão envolvidas com o processo de senescência celular (ESTEBAN et. al. 2010, WANG et. al., 2011).

Utilizou-se o software Primer3 para a construção, a partir das sequências nucleotídicas depositadas no GeneBank apresentadas na Tabela 1.

Como controle positivo da reação de construção dos cDNAs, foram utilizados *primers* que já haviam no laboratório para amplificar o gene *housekeeping*, Ciclofilina-A.

Todos os *primers* tiveram as sequências testadas no programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), demonstrando homologia com os respectivos genes.

Tabela 1 – Características gerais dos *primers* construídos para avaliação de expressão gênica dos FFS e embriões partenogênicos.

Gene	Referência no GeneBank	Tm	Tamanho fragmento	Sequência
<b>Nanog</b>	NM_001129971.1	60°C	116pb	F: TTCCTTCCTCCATGGATCTG R: TGGGACCTTTTCCTCCTTCT
<b>Oct4</b>	NM_001113060.1	60°C	80pb	F: GCAGTGACTATTCGCAACGA R: CGCCAGAGGAAAGGATACTG
<b>Sox2</b>	NM_001123197.1	60°C	108pb	F: ATGGGCTCAGTGGTCAAGTC R: GCTGATCATGTCCCCTAGGT
<b>p15</b>	NC_010443.4	61°C	88pb	F: AGGCTTTAAGCGCCTCTGTC R: TGGTCAAGATGCTGGTAGGG
<b>p53</b>	NM_213824.3	59°C	83pb	F: TCAGGAACAGGTTACCACCA R: TCAGGGAAAGGCACTCTTCT
<b>Ciclofilina-A</b>	NM_214353.1	58°C	230pb	F: ATTCCAGGATTTATGTGCCAG R: TTCACCTTTGCCAAAGACCAC

#### 4.4. Extração de RNA, Quantificação, e Construção do cDNA

Para a extração de RNA das células tratadas, utilizou-se o protocolo de extração Mini-Trizol segundo as instruções do fabricante. Para extração de RNA dos blastocistos foram feitos dois pools com 100 blastocistos: em um utilizou-se o kit RNAspim Mini (GE Healthcare<sup>®</sup>), e o outro foi extraído com o método de Mini-Trizol. O RNA extraído de cada grupo foi quantificado utilizando o equipamento NanoDrop 2000, com a pureza mensurada através da relação 280/260 nm. Cada amostra, de acordo com a sua quantificação foi diluída em água para que todos atingissem a mesma concentração, de 500ng/amostra. Posteriormente todas as amostras foram tratadas com DNase, seguindo as instruções do kit DNase I, Amplification Grade (Invitrogen<sup>®</sup>).

Foi construído o cDNA das amostras utilizando o Kit Omniscript RT (Invitrogen<sup>®</sup>).

#### 4.5. Reação em Cadeia da Polimerase e Eletroforese

A reação em cadeia da polimerase (PCR) foi realizada utilizando Tampão 10x (Sigma<sup>®</sup>) na concentração final de 1x, 0,05unidades/ $\mu$ L Taq DNA Polimerase (Sigma<sup>®</sup>), 0,2 mM de cada dNTP, 0,2mM de cada primer, e 1 $\mu$ L de cDNA, em reações de 50 $\mu$ L. Utilizou-se o termociclador Eppendorf 5345, operando nas seguintes temperaturas: 95°C por 30 segundos; 40 ciclos de 95°C por 30 segundos, a temperatura de anelamento de cada primer (Tabela 1) por 30 segundos, e 72°C por 40 segundos; e por fim 72°C por 5 minutos.

Os produtos das reações foram corridos por eletroforese, em géis de agarose de concentrações entre 1,5% a 2%, e 6% de Brometo de Etídio. Durante a eletroforese, as amostras foram corridas acompanhados de Marcador 100bp (BioLabs<sup>®</sup>). Os géis foram expostos em luz ultravioleta para visualização das bandas e captura da imagem (AlphaDigiDoc<sup>®</sup> Multimage<sup>®</sup> Light Cabinet).

## **5. RESULTADOS**

### **5.1. Crescimento Celular**

Com exceção do tratamento utilizando somente DZNep no meio de cultivo, todas as células foram possíveis de serem cultivadas juntos das moléculas até o dia 12. As células tratadas com DZNep demonstraram atraso no crescimento após o dia 6, portanto no dia 7 ela passou a ser cultivada com o meio DMEM sem adição da molécula. Enquanto isso o tratamento com a Vitamina C demonstrou em todas as repetições acelerar o crescimento das células, apresentando confluência significativamente maior que os demais tratamentos.

De forma simbólica, é possível perceber esta diferença na quantificação de RNA após a extração (Tabela 2).

Tabela 2 – Resultados das quantificações após o processo de extração de RNA. R1, Repetição 1; R2, Repetição 2; 3d, 3 dias; 6d, 6 dias; 12d, 12 dias; no experimento das combinações: V, vitamina C; D, DZNep; S, Scriptaid.

	<b>Amostra</b>	<b>RNA ng/<math>\mu</math>l</b>	<b>Pureza</b>
<b>Repetição 1</b>	Controle R1 3d	176,50	1,87
	Controle R1 6d	317,90	1,98
	Controle R1 12d	416,30	2,03
	Scriptaid R1 3d	231,10	2,06
	Scriptaid R1 6d	83,00	1,92
	Scriptaid R1 12d	72,30	1,89
	Vitamina C R1 3d	232,40	1,95
	Vitamina C R1 6d	229,80	1,78
	Vitamina C R1 12d	1.070,40	2,00
	DZNep R1 3d	128,40	1,91
	DZNep R1 6d	123,00	1,88
	DZNep R1 12d	21,80	1,83
	<b>Repetição 2</b>	Controle R2 3d	350,20
Controle R2 6d		314,70	1,96
Controle R2 12d		1.654,80	1,99
Scriptaid R2 3d		361,80	1,90
Scriptaid R2 6d		63,60	1,90
Scriptaid R2 12d		124,40	1,95
Vitamina C R2 3d		294,20	1,96
Vitamina C R2 6d		280,90	1,85
Vitamina C R2 12d		1.798,40	1,97
DZNep R2 3d		322,50	1,96
DZNep R2 6d		19,80	1,83
DZNep R2 12d		21,40	1,59
<b>Combinações</b>		Controle 3d	250,10
	Controle 6d	227,20	1,99
	Controle 12d	258,10	1,94
	S+D 3d	194,70	1,92
	S+D 6d	21,30	1,61
	S+D 12d	123,50	1,88
	V+D 3d	173,20	1,84
	V+D 6d	33,80	1,80
	V+D 12d	71,50	1,80
	V+S 3d	336,50	1,85
	V+S 6d	104,20	1,87
	V+S 12d	206,10	1,93
	V+S+D 3d	181,40	1,94
V+S+D 6d	36,40	1,87	
V+S+D 12d	213,00	1,72	

Alguns trabalhos parecem explicar essa redução no crescimento celular quando utilizado o DZNep. Xie e colaboradores (2011) demonstraram que a molécula DZNep possui efeito apoptótico em células de mieloma, porém esse efeito não foi causado pela inibição de EZH2 nem por inibir a trimetilação de H3K27, sugerindo que ela atue de outra forma que não epigeneticamente. Além disso, Zhou

e colaboradores (2011) demonstraram que o DZNep aumenta a produção de espécies reativas de oxigênio em células de leucemia mieloide aguda, mostrando que existe certa toxicidade celular por parte dessa molécula.

Já a vitamina C provavelmente esteja favorecendo o crescimento e multiplicação celular devido o seu efeito antioxidante.

## 5.2. Extração de RNA dos Blastocistos

Os dois métodos de extração utilizados foram eficientes e produziram cDNA capaz de ser utilizado como controle nas reações de PCR. Mesmo apresentando na quantificação uma concentração por microlitro inferior à extração utilizando Trizol, a extração com kit se mostrou mais interessante, pois enquanto no método com Trizol o RNA foi eluído em 10 $\mu$ L, com o kit a eluição foi feita utilizando 40 $\mu$ L (Tabela 3). Além disso, a pureza do produto foi muito maior utilizando o kit, em vista que a coluna é mais eficiente em reter proteínas e soluções, que no método de Trizol dificilmente se consegue com a mesma eficácia.

Tabela 3 – Resultado da quantificação na extração de RNA em pools de 100 blastocistos, pelo protocolo de Mini-Trizol, e pelo kit de extração.

Amostra	RNA ng/ $\mu$ l	Pureza
<b>Embriões (Kit de extração)</b>	5,20	3,40
<b>Embriões (Trizol)</b>	24,10	1,52

## 5.3. Reações em Cadeia da Polimerase

Para o gene da Ciclofilina-A, foram realizadas as reações de PCR para todas as amostras, a fim de confirmar se o cDNA foi construído corretamente. Para os demais genes, as reações foram realizadas apenas para as repetições 1 e 2.

### 5.3.1. Ciclofilina-A

Quase todas as amostras amplificaram para o gene da Ciclofilina-A. As amostras que não demonstraram amplificação foram repetidas em uma nova reação junto de controle positivo, para confirmar que provavelmente o cDNA não havia sido bem construído. As amostras que não amplificaram para Ciclofilina foram Vitamina C + DZNep 12 dias, Vitamina C + Scriptaid + DZNep 12 dias, e DZNep 12 dias Repetição 2 (Fig. 6).

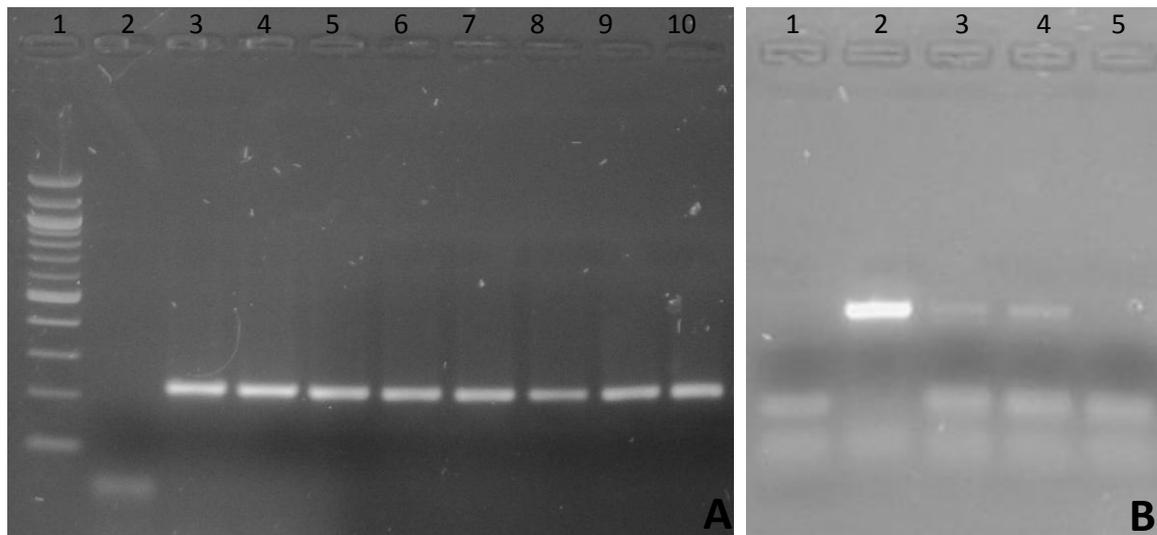


Figura 6. Gel de agarose a 1,5%, com amostras amplificadas para o gene da Ciclofilina-A. A) Amostras amplificadas: 1- Marcador 100pb (Biolabs); 2- Controle negativo; 3- Embriões extraído com Trizol; 4- Embriões extraído com kit; 5- Controle 3 dias R1; 6- Controle 6 dias R1; 7- Controle 12 dias R1; 8- Vitamina C 3 dias R1; 9- Vitamina C 6 dias R1; 10- Vitamina C 3 dias R1. B) Reação com as amostras que não amplificaram. 1- Controle negativo; 2- Embriões; 3- Vitamina C + Scriptaid + DZNep 12 dias; 4- Vitamina C+ DZNep 12 dias; 5- DZNep 12 dias R2.

### 5.3.2. Oct 4

As reações para o primer de Oct4 foram realizadas apenas para as repetições 1 e 2. Não houve amplificação no controle negativo da PCR, mas houve amplificação no controle dos tratamentos nas duas repetições (Fig. 7).

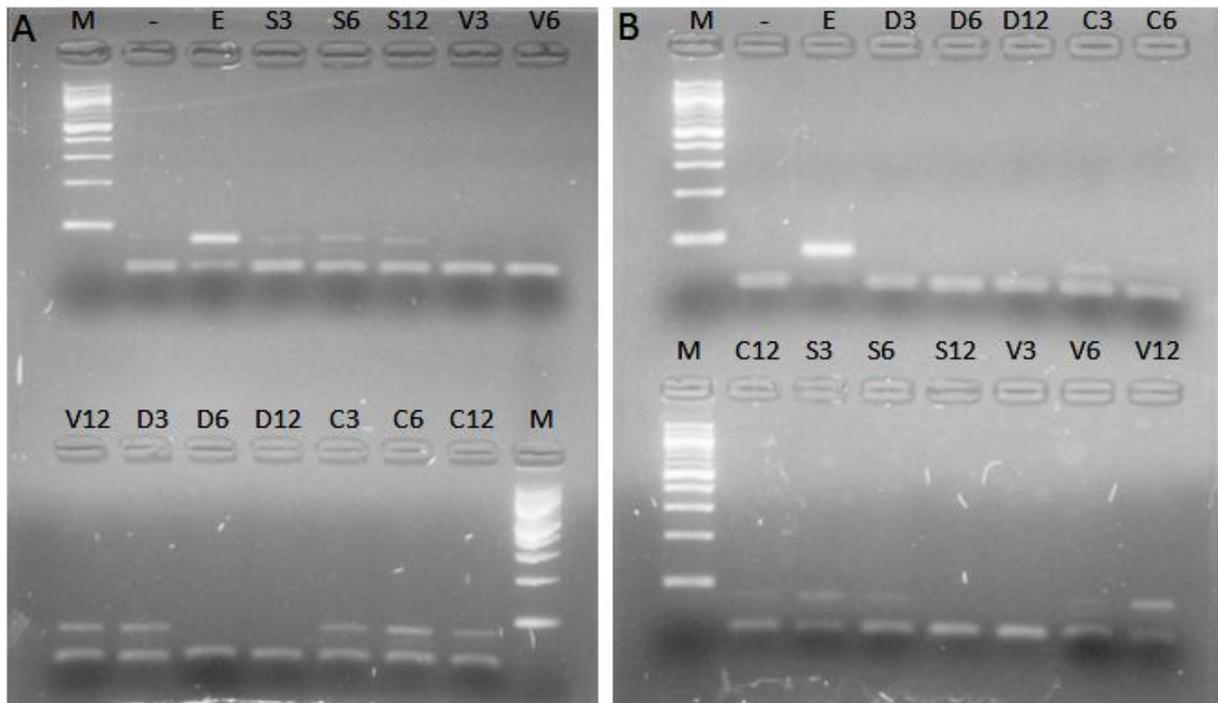


Figura 7. Géis de agarose a 2% demonstrando o resultado da técnica de PCR para o gene Oct 4. No gel A as amostras são para a repetição 1 e no gel B, para a repetição 2. M, Marcador 100pb (Biolabs); -, Controle negativo; E, embriões; S, Scriptaid; V, Vitamina C; D, DZNep; C, Controle; 3, 3 dias; 6, 6 dias; 12, 12 dias.

Em ambas repetições é possível ver uma banda mais forte no tratamento com Vitamina C 12 dias, demonstrando que a Vitamina C pode estar induzindo a expressão de Oct 4 no dia 12. Na repetição 2 existe uma banda no tratamento com Vitamina C 6 dias, demonstrando que talvez a expressão tenha sido acelerada pela tripsinização que acontecia a cada 3 dias na repetição 2, estimulando a divisão celular e replicação do genoma.

O tratamento com Scriptaid também demonstrou estar expressando Oct 4: na repetição 1 podemos ver bandas nos três dias de tratamento, enquanto na repetição 2 podemos ver mais claramente nos dias 3 e 6.

Na repetição 1 houve amplificação no tratamento com DZNep apenas em 3 dias, enquanto na repetição 2 não houve. Na repetição 2, a falta de amplificação na amostra D12 pode ser dada pelo cDNA não ter sido bem construído pois este não amplificou para Ciclofilina-A.

### 5.3.3. Nanog

A técnica de PCR para o gene Nanog foi repetida algumas vezes, e em todas elas não houve uma amplificação eficiente, podendo os primers ou a temperatura estarem inadequados (Fig. 8).

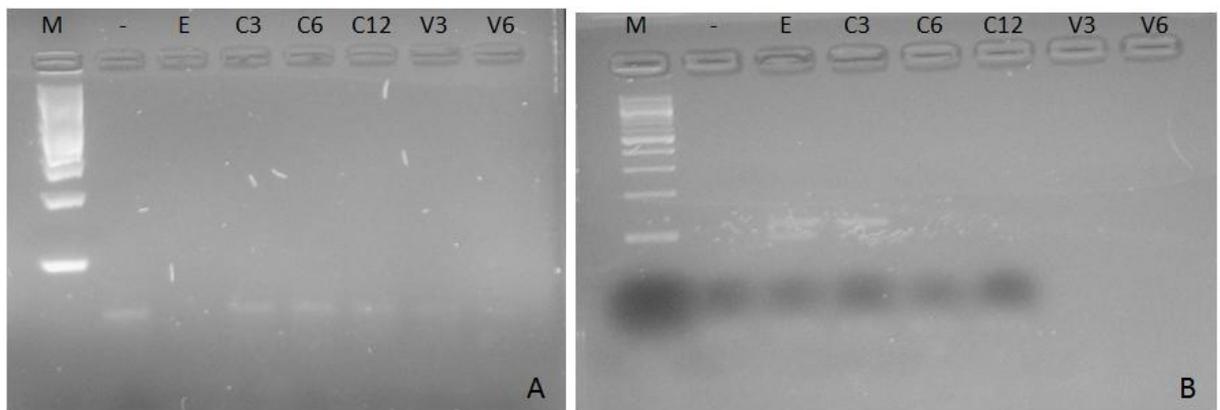


Figura 8. Géis de agarose a 2% demonstrando o resultado da técnica de PCR para o gene Nanog. No gel A as amostras são para a repetição 1 e no gel B, para a repetição 2. M, Marcador 100pb (Biolabs); -, Controle negativo; E, embriões; C, Controle; V, Vitamina C; 3, 3 dias; 6, 6 dias; 12, 12 dias.

### 5.3.4 Sox 2

Nas amostras amplificadas para Sox 2 podemos ver que na repetição 1 todos os tratamentos apresentaram bandas (Fig. 9-A), enquanto na repetição 2 podemos ver apenas no RNA dos embriões, no DZNep 3 dias, no Scriptaid 6 dias, em todos os dias do controle, e na Vitamina C nos dias 6 e 12 (Figura 9-B).

A amplificação do DZNep apenas no dia 3, demonstra que essa molécula possui um efeito imediato de modelamento epigenético, e posteriormente um efeito tóxico para as células. A falta de amplificação na amostra DZNep 12dias pode ser

dada pelo cDNA não ter sido bem construído, pois esta não demonstrou amplificação para o gene da Ciclofilina-A.

A molécula Scriptaid apresentou uma banda no dia 6, demonstrando que ela atua mais lentamente nas células, porém parece ser tóxica a longo prazo.

Já a vitamina C, teve amplificação somente no dia 6, mas esse se estendeu até o dia 12.

A amplificação das bandas no Controle do tratamento não era esperada, e o que acredita-se é que o tratamento com DNase não tenha sido eficiente e os primers tenham sido desenhados para um mesmo éxon, o que nos impede de diferenciar o que é DNA do que é mRNA.

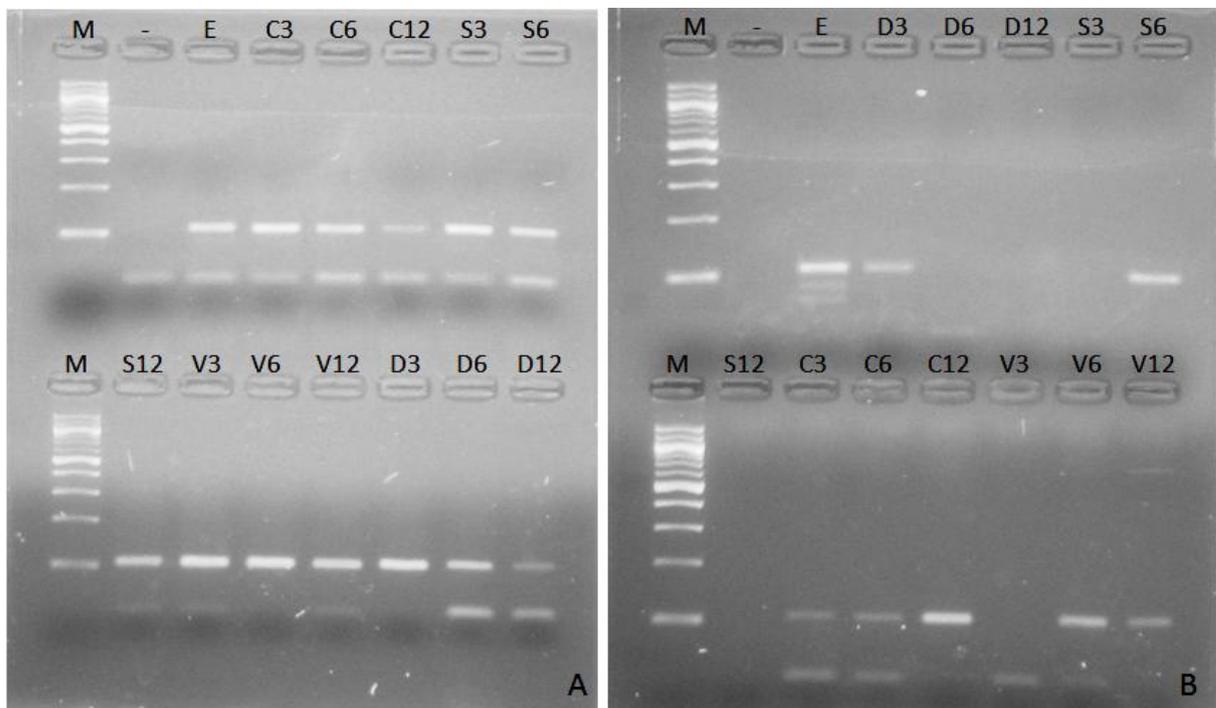


Figura 9. Géis de agarose a 2% demonstrando o resultado da técnica de PCR para o gene Sox 2. No gel A as amostras são para a repetição 1 e no gel B, para a repetição 2. M, Marcador 100pb (Biolabs); -, Controle negativo; E, embriões; C, Controle; V, Vitamina C; S, Scriptaid; D, DZNep; 3, 3 dias; 6, 6 dias; 12, 12 dias.

### 5.3.5. p15

Nas reações de PCR para o gene da proteína p15, tanto na repetição 1 quanto na repetição 2 os embriões tiveram o mesmo padrão de banda, sem amplificação, demonstrando que esta proteína não está expressa em blastocistos (Fig. 10).

Na repetição 1, os tratamentos com DZNep tiveram uma alta expressão nos dias 3 e 6, enquanto no dia 12 houve uma diminuição. Isso concorda com a hipótese de que o DZNep seja uma molécula de ação rápida e de certa toxicidade. A diminuição da expressão no dia 12 pode ser devido a molécula ter sido retirada do meio de cultivo no dia 7 (Figura 10-A). Já na repetição 2 a expressão da p15 parece ter demorado mais para acontecer, tendo uma amplificação apenas no dia 6. A diminuição da amplificação no dia 12 pode ser explicada na repetição 1, pela retirada da molécula do meio de cultivo dos fibroblastos (Fig. 10-A); já na repetição 2, a falta da banda DZNep 12 dias pode ser devido esta não ter o cDNA, pois não amplificou corretamente para Ciclofilina-A.

Na repetição 1 o Controle expressa a proteína apenas nos dias 6 e 12, provavelmente porque nos primeiros dias ela está estimulada ainda a se dividir. Na repetição 1 as células foram cultivadas separadas para serem congeladas na própria placa, cada uma no respectivo dia (Figura 10-A). Já na repetição 2 houve estímulo para que as células se dividissem, pois a cada 3 dias elas eram tripsinizadas, explicando a diminuição da expressão de p15 nos dias 6 e 12 (Fig. 10-B).

O fato de haver a tripsinização na repetição 2 também parece explicar o que acontece no tratamento com a Vitamina C, que demonstra estar expressando o gene da p15 em todos os dias na repetição 1 e apenas no dia 12 para a repetição 2.

Pelo resultado apresentado na repetição 1, a molécula Scriptaid parece ter um efeito tóxico quando exposta às células por muitos dias, enquanto na repetição 2 não houve expressão em nenhum dos dias (Fig. 10).

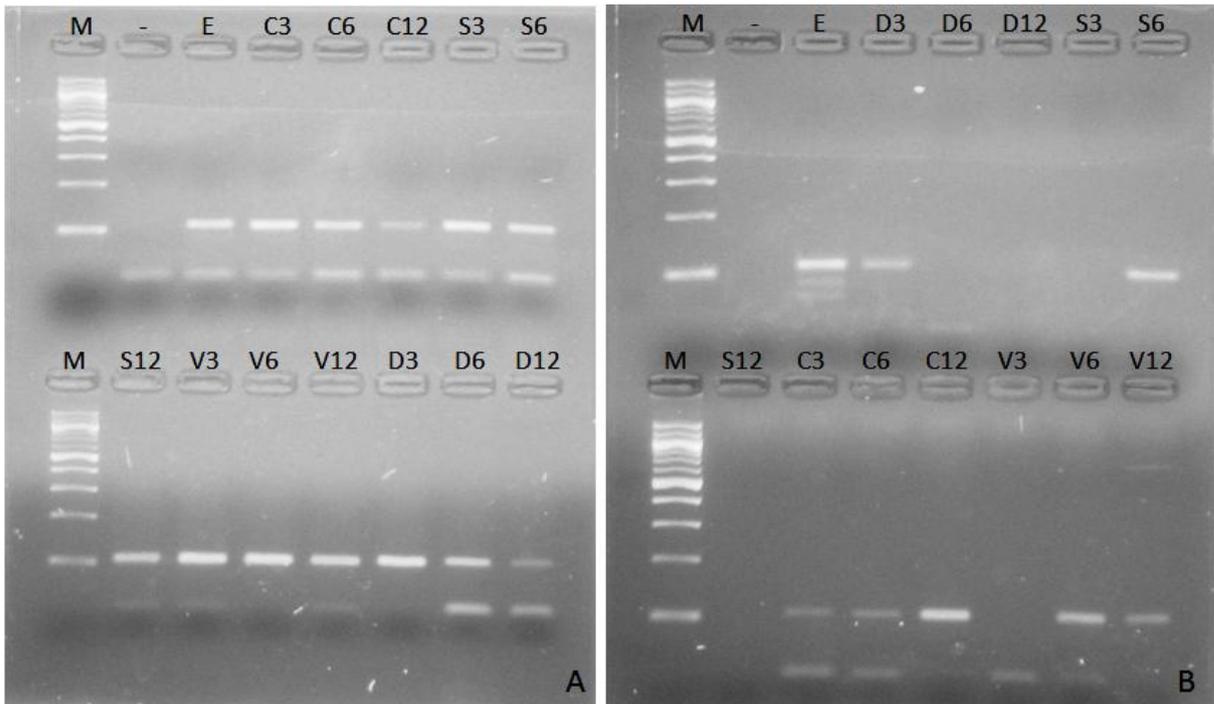


Figura 10. Géis de agarose a 2% demonstrando o resultado da técnica de PCR para o gene p15. No gel A as amostras são para a repetição 1 e no gel B, para a repetição 2. M, Marcador 100pb (Biolabs); -, Controle negativo; E, embriões; C, Controle; V, Vitamina C; S, Scriptaid; D, DZNep; 3, 3 dias; 6, 6 dias; 12, 12 dias.

### 5.3.6. p53

As amostras amplificadas para o gene da p53, tanto para a repetição 1 quanto para a repetição 2, tiveram o mesmo padrão em todos os tratamentos e no controle. Todas expressaram p53, porém com a PCR convencional não é possível quantificar e dizer se algum tratamento está diminuindo ou não a expressão desta proteína (Fig. 11).

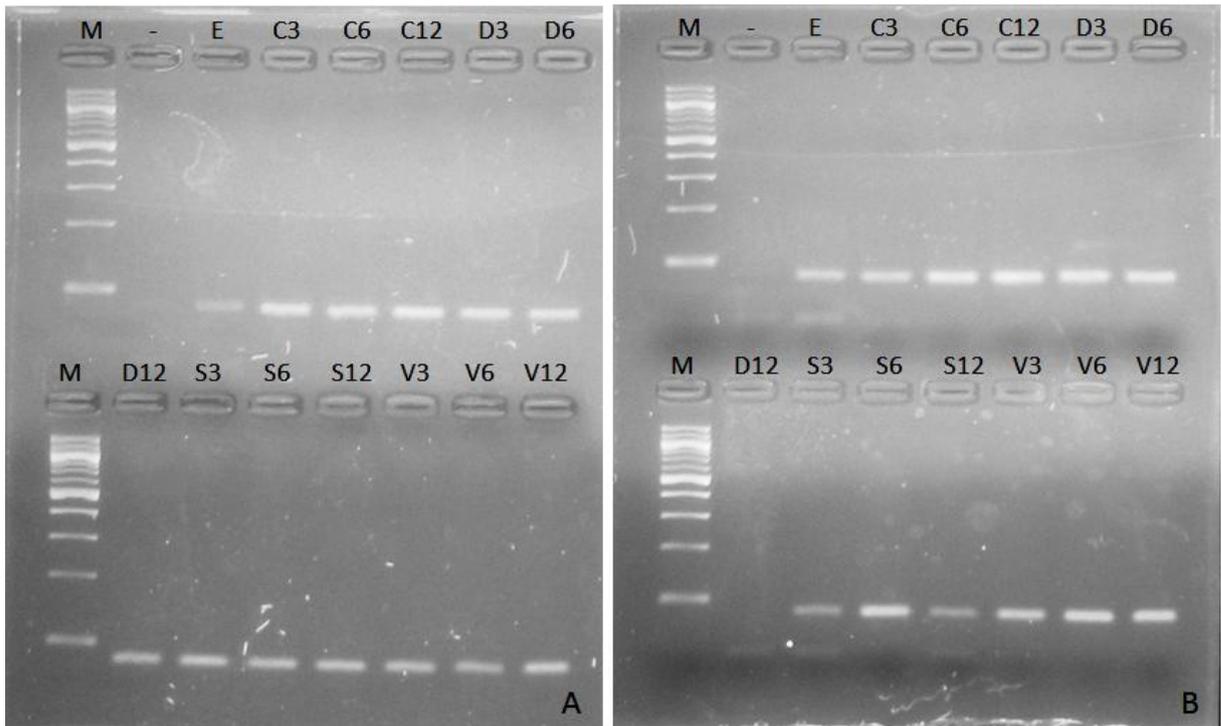


Figura 11. Géis de agarose a 2% demonstrando o resultado da técnica de PCR para o gene p53. No gel A as amostras são para a repetição 1 e no gel B, para a repetição 2. M, Marcador 100pb (Biolabs); -, Controle negativo; E, embriões; C, Controle; V, Vitamina C; S, Scriptaid; D, DZNep; 3, 3 dias; 6, 6 dias; 12, 12 dias.

#### 5.4. Perspectivas Futuras

Estão sendo cultivadas novamente as células tratadas para Vitamina C + Scriptaid + DZNep, DZNep + Vitamina C, e DZNep, para serem congeladas no dia 12 e terem o RNA extraído, já que estas não amplificaram para o gene da Ciclofilina-A.

Novos primers já foram construídos para os genes de pluripotência, Sox 2, Nanog e Oct 4, de forma que cada *primer* esteja em éxons diferentes do gene. As reações serão feitas novamente com os cDNAs dos tratamentos. Caso nas reações com os novos *primers* o controle do tratamento ainda esteja apresentando amplificação, os *primers* serão testados em outras linhagens de células que o laboratório possui, para confirmar se está havendo expressão desses genes nesta linhagem de fibroblastos.

Se os resultados com os novos *primers* forem condizentes, serão feitas as reações para as duas repetições do primeiro experimento e para o experimento das

combinações. Caso exista mesmo expressão dos genes nos tratamentos, será feito um PCR quantitativo, a fim de confirmar que algum tratamento em um certo tempo auxilia na reprogramação celular.

Posteriormente, serão feitos clones por TNCS, utilizando estas células tratadas, mesmo que elas não demonstrem expressão dos genes de pluripotência. No processo de clonagem a reprogramação é feita de forma muito mais intensa pelo oócito e o fato do FFS não expressar os genes de pluripotência anteriormente durante o cultivo e o tratamento não quer dizer que este não otimizará a reprogramação do embrião.

## 6. OUTRAS ATIVIDADES ACOMPANHADAS

### 6.1 Clonagem por *Handmade*

A técnica de clonagem por *handmade* foi estabelecida por Peura, Lewis, e Trounson em 1998, e modificada por Vajta e colaboradores no ano de 2001. Esta técnica é reconhecida por ser mais barata, mais fácil por dispensar habilidades em micro-manipulação, e mais rápida de ser realizada em comparação à transferência nuclear tradicional, pois não requer o uso de micromanipulador.

O experimento acompanhado faz parte da tese de mestrado do aluno Lain Uriel Ohlweiler, que teve por objetivo analisar a migração mitocondrial em zigotos criados por *handmade* nas seguintes combinações de oócitos: suíno/suíno, suíno/bovino e bovino/bovino (Fig. 12). Para isso oócitos suínos foram puncionados, selecionados e maturados assim como descrito no item 4.1.1. Oócitos bovinos foram obtidos de abatedouro local, puncionados os folículos de 2 a 8 mm de diâmetro, selecionados da mesma forma descrita para os oócitos suínos, porém a maturação se deu através de cultivo em Meio de Maturação de bovinos (TCM-199; 25mM Hepes; 26,2mM bicarbonato de sódio; 0,2 mM piruvato de sódio; 0,01 UI/mL FSH; 0.5 µg/mL LH; 10% SFB) por 22 a 26 horas, à 38,5 °C e 5% CO<sub>2</sub>.

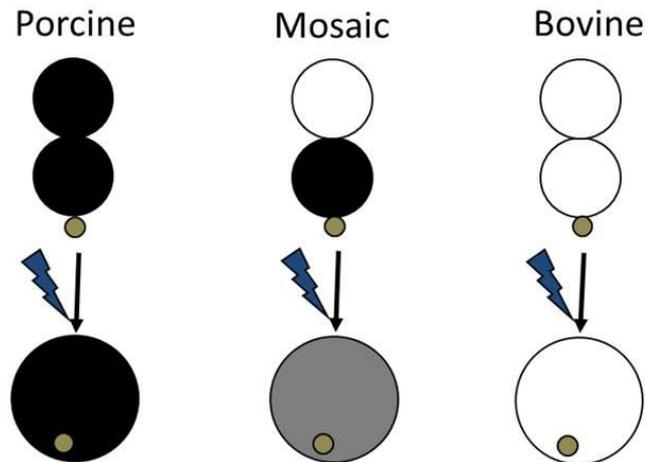


Figura 12. Desenho esquemático do experimento realizado com clonagem pela técnica de *handmade*. Foi testada a fusão entre metades de oócitos suínos, com uma metade de suíno e outra de bovino, e com duas metades de oócitos bovinos.

Após a maturação, os oócitos foram desnudos através de sucessivas pipetagens, e tiveram a zona pelúcida parcialmente removida em Meio de Manipulação com 0,5% de pronase para bovinos, e Meio de Maturação com 25% de SFB e 0,2% de pronase para suínos; seguido de lavagens em Meio de Manipulação adicionado 10% de SFB para bovinos e 20% de SFB para suínos, para inativação da pronase. Para que a pronase seja inibida de forma mais eficiente, em oócitos suínos é feita uma lavagem em soro puro após a primeira lavagem no Meio de Manipulação. Os oócitos sem a zona pelúcida foram então divididos ao meio com a ajuda de uma lâmina especial para biópsia de embriões bovinos (Bioniche). Posteriormente, as metades de oócitos foram corados com Hoescht 33342 a 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , e distribuídos individualmente em gotas de 3  $\mu\text{L}$  de Meio de Manipulação + Hoescht 33342 para visualização em microscópio de fluorescência. As metades de oócitos foram avaliadas quanto à presença de cromatina e viabilidade celular. São utilizados somente as metades que não apresentam fluorescência. Duas metades de oócitos selecionadas são colocadas próximas à célula doadora de núcleo, e estas sofrem choque elétrico por corrente alternada de 15V, duas vezes de corrente contínua a 1,2V por 25 microssegundos, para que aconteça a fusão. Posteriormente o presumível zigoto sofre ativação partenogenética e é cultivado assim como descrito no item 4.1.2.

## 6.2. Fertilização *In Vitro*, Cultivo dos Embriões em DZNEP e Fixação das Estruturas

Para a fertilização *in vitro* (FIV) de oócitos suínos, estes foram puncionados, selecionados e maturados assim como descrito no item 4.1.1, em poços de placa Nunc (de 60 a 80 oócitos por poço). Passado o tempo de maturação I e II, os oócitos foram desnudos através de pipetagens consecutivas.

Enquanto isso o sêmen fresco foi centrifugado por 1700xG por 3 minutos, ressuspendido em BTS (0,2M glicose; 0,02M citrato de sódio; 0,015M NaHCO<sub>3</sub>; 3mM EDTA; 0,01M KCl; pH 7,3) e mantido por 20 minutos entre 15 e 18°C. Passado este tempo, ele foi imerso em banho-maria a 38,5°C por 20 minutos.

Posteriormente, o sêmen foi selecionado pelo método Gradiente de Percoll segundo Machado e colaboradores (2009). Esta técnica funciona como uma ferramenta de separação por densidade, em que apenas os espermatozoides mais viáveis, com maior motilidade e vigor é que vão ao fundo do tubo na centrifugação.

Posteriormente o pellet formado no tubo foi colocado em 500µL de TBM-BSA (2,5 mL TBM + 15mg de BSA), centrifugado por 45 segundos a 9,0xG, tendo o sobrenadante removido e o pellet ressuspendido em torno de 30µL de TBM-BSA. Para estimar a concentração de espermatozoides, 5µL do pellet é colocado em 95µL de água, e as células são contadas em Câmara de Neubauer. Com o número obtido na contagem é feito o cálculo para estimar concentração e ajustado para que fique na concentração de 100.000 espermatozoides móveis por mililitros.

Após o processamento do sêmen, os oócitos desnudos (de 50 a 80 oócitos) são passados para poços de placas Nunc contendo 500µL de TBM - BSA/Cafeína (2,5 mL de TBM com 15mg de BSA e 0,9mg de cafeína), para então ser adicionada a quantidade de sêmen calculada para que seja obtida a concentração de 50.000 espermatozoides móveis por poço. Os oócitos são mantidos em torno de 3 a 6 horas em contato com os espermatozoides, em estufa à 38,5°C e 5% CO<sub>2</sub>. Passado este tempo, os oócitos foram vigorosamente pipetados para retirar os espermatozoides aderidos, e colocados em meio de cultivo (PZM-3) em placas Nunc de quatro poços. Os presumíveis zigotos foram divididos em três grupos: PZM-3 + DZNep com *feeding* dias 2 e 4; PZM-3 + DZNep com *feeding* somente no dia 4; e Grupo Controle sem DZNep. A concentração de DZNep se manteve em 5µM.

No dia 8 após a FIV, foram coletadas todas as estruturas e fixadas em Paraformaldeído a 4% para posterior imunohistoquímica. As estruturas fixadas foram estocadas a 4°C até o processo de montagem das lâminas.

### **6.3. Atividades de Manutenção do Laboratório**

Além de todas as atividades de pesquisa, a aluna também participou de atividades de manutenção do laboratório, como lavagem de vidrarias, autoclavagem e esterilização de materiais, preparo de meios e soluções e idas ao frigorífico.

## 7. CONCLUSÃO

O experimento utilizando moléculas para atuar no epigenoma de fibroblastos fetais suínos doadores de núcleo foi iniciado e padronizado. Para um melhor rendimento, os próximos pools de blastocistos deverão conter mais de 100 oócitos, seu RNA extraído por kit comercial, e eluído em menos do que 40µL.

Quanto ao tratamento, pouco pode ser concluído apenas com a análise feita por PCR convencional e com primers construídos para amplificar os genes dentro do mesmo éxon. Sabe-se que as células necessitam ser estimuladas a dividirem-se pela tripsinização e portanto o método utilizado na repetição 2 seria o mais recomendado para as próximas repetições.

Esse período de estágio foi de grande aprendizado para mim que nunca havia trabalhado com expressão gênica, epigenética, reprogramação celular, partenogênese, e ainda mais com a espécie suína. Cada dia que passou aqui contribuiu enormemente para a minha formação: nos momentos em que tudo saiu como planejado, e mais ainda, nos momentos em que problemas ocorreram e tivemos que procurar pela solução. Fui muito privilegiada em poder contar nesses momentos com a ajuda de estudantes e profissionais extremamente competentes. Posso dizer que hoje sou uma pessoa mais crítica, mais experiente, e que sei lidar melhor com novas situações. Além disso, hoje tenho mais certo para mim que quero seguir na área da Reprodução e da Embriologia Molecular.

## REFERÊNCIAS

BANITO, A.; RASHID, S. T.; ACOSTA, J. C.; LI, S.; PEREIRA, C. F.; GETI, I.; PINHO, S.; SILVA, J. C.; AZUARA, V.; WALSH, M.; VALLIER, L.; GIL J. Senescence impairs successful reprogramming to pluripotent stem cells. **Genes Dev.** v. 23, p. 2134-2139, 2009.

BANNISTER, A. J.; KOUZARIDES, T. Reversing histone methylation. **Nature.** v. 436, p. 1103-1106, 2005.

BAUER, K. Faculty Lecturer position at McGill. Disponível em: <<http://www.cautg.org/?p=275587>>. Acesso em: 25 de julho de 2012.

BRIGGS, R.; KING, T. J. Transplantation of living nuclei from blastula cells into enucleated frogs' eggs. **Proceedings of The National Academy of Sciences of The United States of America.** v. 38, p. 455-463, 1952.

BUI, H.; SEO, H.; PARK, M.; PARK, J.; THUAN, N. V.; WAKAYAMA, T.; KIM, J. Histone Deacetylase Inhibition Improves Activation of Ribosomal RNA Genes and Embryonic Nucleolar Reprogramming in Cloned Mouse Embryos. **Biology of Reproduction.** v. 85, p. 1048–1056, 2011.

CEDAR, H.; BERGMAN, Y. Linking DNA methylation and histone modification: patterns and paradigms. **Nature Reviews.** v. 10, p. 295-304, 2009.

CHAO, N. Control of GVHD: it's in our DNA! **Blood.** v.119, p. 1102-1103, 2012.

CHE, L.; LALONDE, A.; BORDIGNON, V. Chemical activation of parthenogenetic and nuclear transfer porcine oocytes using ionomycin and strontium chloride. **Theriogenology.** v. 67, p. 1297–1304, 2007.

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, p. 1369 – 1379, 2005.

DU, F.; SUNG, L. Y.; TIAN, X. C.; YANG, X. Differential Cytoplasm Requirement For Embryonic And Somatic Cell Nuclear Transfer In Cattle. **Mol. Reprod. Dev.** v. 63, p. 183-191, 2002.

ESTEBAN, M.A.; WANG, T.; QIN, B.; YANG, J.; QIN, D.; CAI, J.; LI, W.; WENG, Z.; CHEN, J.; NI, S.; CHEN, K.; LI, Y.; LIU, X.; XU, J.; ZHANG, S.; LI, F.; HE, W.; LABUDA, K.; SONG, Y.; PETERBAUER, A.; WOLBANK, S.; REDL, H.; ZHONG, M.; CAI, D.; ZENG, L.; PEI, D. Vitamin C Enhances the Generation of Mouse and Human Induced Pluripotent Stem Cells. **Cell Stem Cell.** v. 6, p. 71–79, 2010.

FENG, B.; NG, J.; HENG, J. D.; NG, H. Molecules that Promote or Enhance Reprogramming of Somatic Cells to Induced Pluripotent Stem Cells. **Cell Stem Cell.** v. 4, p. 301-312, 2009.

FUKUMURA, H.; SATO, M.; KEZUKA, K.; SATO, I.; FENG, X.; OKUMURA, S.; FUJITA, T.; YOKOYAMA, U.; EGUCHI, H.; ISHIKAWA, Y.; SAITO, T. Effect of ascorbic acid on reactive oxygen species production in chemotherapy and hyperthermia in prostate cancer cells. **J Physiol Sci.** v. 62, p.251–257, 2012.

GAN, Q.; YOSHIDA, T.; MCDONALD, O. G.; OWENS, G. K. Concise Review: Epigenetic Mechanisms Contribute to Pluripotency and Cell Lineage Determination of Embryonic Stem Cells. **Stem Cells.** v.25, p. 2–9, 2007.

GANN, P.H. Randomized Trials of Antioxidant Supplementation for Cancer Prevention. **JAMA.** v. 301, p. 102-103, 2009.

GAO, Y.; HYTTEL, P.; HALL, V. J. Dynamic Changes in Epigenetic Marks and Gene Expression During Porcine Epiblast Specification. **Cellular Reprogramming.** v. 13, p. 345-360, 2011.

GARCIA, B. A.; SHABANOWITZ, J.; HUNT D. Characterization of histones and their post-translational modifications by mass spectrometry. **Current Opinion in Chemical Biology.** v. 11, p. 66–73. 2007

HALL, V. Porcine Embryonic Stem Cells: A Possible Source for Cell Replacement Therapy. **Stem Cell Rev.** v. 4, p.275–282, 2008.

HARRISON, F. E.; HOSSEINI, A. H.; MCDONALD, M. P.; MAY, J. M. Vitamin C reduces spatial learning deficits in middle-aged and very old APP/PSEN1 transgenic and wild-type mice. **Pharmacol Biochem Behav.** v.93, p. 443–450, 2009.

HE, S.; WANG, J.; KATO, K.; XIE, F.; VARAMBALLY,S.; MINEISHI, S.; KUICK, R.; MOCHIZUKI, K.; LIU, Y.; NIEVES, E.; MANI, R.; CHINNAIYAN, A. M.; MARQUEZ, V. E.; ZHANG, Y. Inhibition of histone methylation arrests ongoing graft-versus-host disease in mice by selectively inducing apoptosis of alloreactive effector T cells. **Blood.** v.119, p.1274-1282, 2012.

HOUDEBINE, L. M.; Transgenic animal bioreactors. **Transgenic Research.** v. 9, p. 305–320, 2000.

HUANG 1, Y.; TANG, X.; XIE, W.; ZHOU, Y.; LI, D.; ZHOU, Y.; ZHU, J.; YUAN, T.; LAI, L.; PANG, D.; OUYANG, H. Vitamin C enhances in vitro and in vivo development of porcine somatic cell nuclear transfer embryos. **Biochemical and Biophysical Research Communications.** v. 411, p. 397–401, 2011.

KISHIGAMI, S.; MIZUTANI, E.; OHTA, H.; HIKICHI, T.; VAN THUAN, N.; WAKAYAMA, S.; BUI, H.; WAKAYAMA, T. Significant improvement of mouse cloning technique by treatment with trichostatin A after somatic nuclear transfer. **Biochemical and Biophysical Research Communications.** v. 340, p.183–189, 2006.

KOH, C. J.; ATALA, A. Tissue Engineering, Stem Cells, and Cloning: Opportunities for Regenerative Medicine. **J. Am. Soc. Nephrol.** v. 15, p. 1113–1125, 2004.

KUZMUK, Kristy N.; SCHOOK, Lawrence B. **The Genetics of the Pig**. In: Pigs as a Model for Biomedical Sciences. Wallingford, CAB International, 2011. p. 426-444.

LI, E. Chromatin Modification And Epigenetic Reprogramming In Mammalian Development. **Nature**. v. 3, p. 662-673, 2002.

LIU, L.; SHIN, T.; PRYOR, J. H.; KRAEMER, D.; WESTHUSIN, M. Regenerated bovine fetal fibroblasts support high blastocyst development following nuclear transfer. **Cloning**. v. 3, p. 51-58, 2001.

MACHADO, G. M.; CARVALHO, J. O.; SIQUEIRA FILHO, E.; CAIXETA, E. S.; FRANCO, M. M.; RUMPF, R.; DODE, M. A. N. Effect of Percoll volume, duration and force of centrifugation, on in vitro production and sex ratio of bovine embryos. **Theriogenology**. v. 71, p. 1289-1297, 2009.

MIRANDA, T. B.; CORTEZ, C. C.; YOO, C. B.; LIANG, G.; ABE, M.; KELLY, T. K.; MARQUEZ, V. E.; JONES, P. A. DZNep is a global histone methylation inhibitor that reactivates developmental genes not silenced by DNA methylation. **Mol Cancer Ther**. v. 8, p. 1579-1588, 2009.

MOMPARLER, R. L.; IDAGHDOUR, Y.; MARQUEZ, V. E.; MOMPARLER, L. F. Synergistic antileukemic action of a combination of inhibitors of DNA methylation and histone methylation. **Leukemia Research**. v. 36, p. 1049-1054, 2012.

NIEMANN, H.; RATH, D.; WRENZYCKI, C. Advances in Biotechnology: New Tools in Future Pig Production for Agriculture and Biomedicine. **Reprod Dom Anim**. v. 38, p. 82-89, 2003.

NISHISHITA, N.; SHIKAMURA, M.; TAKENAKA, C.; TAKADA, N.; FUSAK, N.; KAWAMATA, S. Generation of Virus-Free Induced Pluripotent Stem Cell Clones on a Synthetic Matrix via a Single Cell Subcloning in the Naïve State. **PLoS One**. v. 7, e38389, 2012.

OH, H. J.; KIM, M. K.; JANG, G.; KIM, H. J.; HONG, S. G.; PARK, J. E.; PARK, K.; PARK, C.; SOHN, S. H.; KIM, D. Y.; SHIN, N. S.; LEE, B. C. Cloning endangered gray wolves (*Canis lupus*) from somatic cells collected postmortem. **Theriogenology**. v. 70, p. 638-647, 2008.

ONO, T.; LI, C.; MIZUTANI, E.; TERASHITA, Y.; YAMAGATA, K.; WAKAYAMA, T. Inhibition of Class IIb Histone Deacetylase Significantly Improves Cloning Efficiency in Mice. **Biology of reproduction**. v. 83, p. 929-937, 2010.

PADAYATTY, S. J.; KATZ, A.; WANG, Y.; ECK, P.; KWON, O.; LEE, J.; CHEN, S.; CORPE, C.; DUTTA, A.; DUTTA, S. K.; LEVINE, M. Vitamin C as an Antioxidant: Evaluation of Its Role in Disease Prevention. **Journal of the American College of Nutrition**. v. 22, p. 18-35, 2003.

PARACHIKOVA, A.; GREEN, K. N.; HENDRIX, C.; LAFERLA, F. M. Formulation of a Medical Food Cocktail for Alzheimer's Disease: Beneficial Effects on Cognition and Neuropathology in a Mouse Model of the Disease. **PLoS One**. v. 5, e14015, 2010.

PERECIN, Felipe. **Epigenética do desenvolvimento em bovinos: DNA metiltransferases e genes “imprinted” em embriões, fetos e placentas**. 2007. 83f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária)- Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio De Mesquita Filho”, Jaboticabal.

PEREZ, S. V. D.; KIM, R.; LI, Z.; MARQUEZ, V. E.; PATEL, S.; PLATH, K.; CLARK, A.T. Derivation of new human embryonic stem cell lines reveals rapid epigenetic progression in vitro that can be prevented by chemical modification of chromatin. **Human Molecular Genetics**. v. 21, p. 751–764, 2012.

PEURA, T. T.; LEWIS, I. M.; TROUNSON, A. O. The effect of recipient oocyte volume on nuclear transfer in cattle. **Molecular Reproduction and Development**. V. 50, p. 185-191, 1998.

PIÑA-AGUILAR, R. E.; LOPEZ-SAUCEDO, J.; SHEFFIELD, R.; RUIZ-GALAZ, L. I.; PADILLA J. B.; GUTIÉRREZ-GUTIÉRREZ A. Revival of Extinct Species Using Nuclear Transfer: Hope for the Mammoth, True for the Pyrenean Ibex, But Is It Time for “Conservation Cloning”? **Cloning and stem cells**. v. 11, p. 341-347, 2009.

QS World University Rankings. Disponível em: <<http://www.topuniversities.com/university-rankings/world-university-rankings/2011>>. Acesso em: 25 de julho de 2012.

RIDEOUT III, W. M.; EGGAN, K.; JAENISCH, R. Nuclear Cloning and Epigenetic Reprogramming of the Genome. **Science**. v. 293, p. 1093-1098, 2001.

RYBOUCHKIN, A.; KATO, Y.; TSUNODA, Y. Role of Histone Acetylation in Reprogramming of Somatic Nuclei Following Nuclear Transfer. **Biology of Reproduction** v. 74, p. 1083–1089, 2006.

SCHUURMAN H.; PIERSON III, R. N. Progress towards clinical xenotransplantation. **Frontiers in Bioscience**. v. 13, p. 204-220, 2008.

SHEN, C.; CHENG, W. T. K.; WU, S.; CHEN, H.; TSAI, T.; YANG, S.; CHEN, C. Differential Differences in Methylation Status of Putative Imprinted Genes among Cloned Swine Genomes. **PLoS One**. v. 7, e32812, 2012.

SHI, Y.; DESPONTS, C.; DO, J. T.; HAHM, H. S.; SCHOLER, 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, p. 568–574, 2008.

SHIMOZAWA, N.; ONO, Y.; KIMOTO, S.; HIOKI, K.; ARAKI, Y.; SHINKAI, Y.; KONO, T.; ITO, M. Abnormalities in Cloned Mice Are Not Transmitted to the Progeny. **Genesis**. v. 34, p. 203–207, 2002.

SU, G. H.; SOHN, T. A.; RYU, B.; KERN, S. E. A Novel Histone Deacetylase Inhibitor Identified by High-Throughput Transcriptional Screening of a Compound Library. **Cancer Research**. v. 60, p. 3137–3142, 2000.

SWANSON, K. S.; MAZUR, M. J.; VASHISHT K.; RUND, L. A.; BEEVER, J.E.; COUNTER, C. M.; SCHOOK, L. B. Genomics and Clinical Medicine: Rationale for Creating and Effectively Evaluating Animal Models. **Experimental Biology and Medicine**. v. 229, p.866-875, 2004.

TAGARELLI, A.; PIRO, A.; LAGONIA, P.; TAGARELLI, G. Hans Spemann. One Hundred Years Before the Birth of Experimental Embryology. **Anat. Histol. Embryol**. v. 33, 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, p. 663–676, 2006.

TAN, j.; YANG, X.; ZHUANG, L.; JIANG, X.; CHEN, W.; LENG LEE, P.; KARUTURI, R. K. M.; TAN, P. B. O.; LIU, E. T.; YU, Q. Pharmacologic disruption of Polycomb-repressive complex 2-mediated gene repression selectively induces apoptosis in cancer cells. **Genes & Development**. v. 21, p. 1050–1063, 2007.

TIAN, X. C.; KUBOTA, C.; ENRIGHT, B; YANG, X. Cloning animals by somatic cell nuclear transfer – biological factors. **Reproductive Biology and Endocrinology**. v. 1, p. 98-105, 2003.

VAJTA, G.; LEWIS, I. M.; TROUNSON, A. O.; PURUP, S.; MADDOX-HYTTEL, P.; SCHMIDT, M.; PEDERSEN, H. G.; GREVE, T.; CALLESEN, H. *Handmade* somatic cell cloning in cattle: analysis of factors contributing to high efficiency in vitro. **Biol. Reprod**. v.68, p. 571-578, 2003.

VAN ROBERTSON, W. B.; SCHWARTZ, B. Ascorbic acid and the formation of collagen. **J. Biol. Chem**. v. 201, p. 689–696, 1953.

VAN THUAN, N.; BUI, H.; KIM, J.; HIKICHI, T.; WAKAYAMA, S.; KISHIGAMI, S.; MIZUTANI, E.; WAKAYAMA, T. The histone deacetylase inhibitor scriptaid enhances nascent mRNA production and rescues full-term development in cloned inbred mice. **Reproduction**. v. 138, p. 309–317, 2009.

WANG, L.; ZHANG, H.; WANG, Y.; XU, W.; XIONG, X.; LI, Y.; SU, J.; HUA, S.; ZHANG, Y. Scriptaid Improves In Vitro Development and Nuclear Reprogramming of Somatic Cell Nuclear Transfer Bovine Embryos. **Cellular Reprogramming**. v. 13, p. 431-439, 2011.

WANG, T.; CHEN,K.; ZENG, X.; YANG, J.; WU, Y.; SHI, X.; QIN, B.; ZENG, L.; ESTEBAN, M. A.; PAN, G.; PEI, D. The Histone Demethylases Jhdm1a/1b Enhance Somatic Cell Reprogramming in a Vitamin-C-Dependent Manner. **Cell Stem Cell**. v. 9, p. 575–587, 2012.

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

WILMUT, I.; SCHNIEKE, A. E.; MCWHIR, J.; KIND, A. J.; CAMPBELL, K. H. S. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. **Nature**. v. 385, p. 810-813, 1997.

XIE, Z.; BI, C.; CHEONG, L. L.; LIU, S. C.; HUANG, G.; ZHOU, J.; YU, Q.; CHEN, C. S.; CHNG, W. J. Determinants of Sensitivity to DZNep Induced Apoptosis in Multiple Myeloma Cells. **PLoS One**. v. 6, e21583, 2011.

XING, X.; MAGNANI, L.; LEE, K.; WANG, C.; CABOT, R. A.; MACHATY, Z. Gene Expression and Development of Early Pig Embryos Produced by Serial Nuclear Transfer. **Mol Reprod Dev**. v. 76, p. 555–563, 2009.

XUE, F.; TIAN, X. C.; KUBOTA, C.; DU, F.; TANEJA, M.; DINNYES, A.; DAI, Y.; LEVINE, H.; PEREIRA, L. V.; YANG, X. Aberrant X-Chromosome inactivation in deceased cattle derived from somatic cloning. **Nat Genet**. v. 31, p. 216-220, 2002.

YOSHIOKA, K.; SUZUKI, C.; TANAKA, A.; ANAS, I. M.; IWAMURA, S. Birth of Piglets Derived from Porcine Zygotes Cultured in a Chemically Defined Medium. **Biology of reproduction**. v. 66, p. 112–119, 2002.

YU, J.; CHAU, K. F.; VODYANIK, M. A.; JIANG, J.; JIANG, Y. Efficient Feeder-Free Episomal Reprogramming with Small Molecules. **PLoS One**. v. 6, e17557, 2011.

ZAKHARTCHENKO, V.; ALBERIO, R.; STOJKOVIC, M.; PRELLE, K.; SCHERNTHANER, W.; STOJKOVIC, P.; WENIGERKIND, H.; WANKE, R.; DUCHLER, M.; STEINBORN, R.; MUELLER, M.; BREM, G. E. Adult cloning in cattle: potential of nuclei from a permanent cell line and from primary cultures. **Mol Reprod Dev**. v. 54, p. 264-272, 1999.

ZATZ, M. Clonagem e células tronco. **Estudos Avançados**. v. 51, p. 247-256, 2004

ZHAO, J.; ROSS, J. W.; HAO, Y.; SPATE, L. D.; WALTERS, E. M.; SAMUEL, M. S.; RIEKE, A.; MURPHY, C. N.; PRATHER, R. S. Significant Improvement in Cloning Efficiency of an Inbred Miniature Pig by Histone Deacetylase Inhibitor Treatment after Somatic Cell Nuclear Transfer. **Biology of Reproduction**. v. 81, p. 525–530, 2009.

ZHAO, J.; WHYTE, J.; PRATHER, R. S. Effect of epigenetic regulation during swine embryogenesis and on cloning by nuclear transfer. **Cell Tissue Res**. v. 341, p.13–21, 2010.

ZHAO, J.; HAO, Y.; ROSS, J. W.; SPATE, L. D.; WALTERS, E. M.; SAMUEL, M. S.; RIEKE, A.; MURPHY, C. N.; PRATHER, R. S. Histone Deacetylase Inhibitors Improve In Vitro and In Vivo Developmental Competence of Somatic Cell Nuclear Transfer Porcine Embryos. **Cellular Reprogramming**. v. 12, p. 75-83, 2010.

ZHOU, J.; BI, C.; CHEONG, L. L.; MAHARA, S.; LIU, S. C.; TAY, K. G.; KOH, T. L.; YU, Q.; CHNG, W. J. The histone methyltransferase inhibitor, DZNep, up-regulates TXNIP, increases ROS production, and targets leukemia cells in AML. **Blood**. v. 118, p. 2830-2839, 2011.

ZHU, W.; LAKSHMANAN, R. R.; BEAL, M. D.; OTTERSON, G. A. DNA Methyltransferase Inhibition Enhances Apoptosis Induced by Histone Deacetylase Inhibitors. **Cancer Research** . v. 61, p. 1327–1333, 2001.