

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA – BOTUCATU**

**EXPRESSÃO DE FATORES DE TRANSCRIÇÃO DA VIA
DE SINALIZAÇÃO LIF/JAK/STAT NO
DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO INICIAL EM
BOVINOS**

TATIANA DA SILVA RASCADO

Botucatu – SP

2013

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA - BOTUCATU**

**EXPRESSÃO DE FATORES DE TRANSCRIÇÃO DA VIA
DE SINALIZAÇÃO LIF/JAK/STAT NO
DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO INICIAL EM
BOVINOS**

TATIANA DA SILVA RASCADO

**Tese apresentada junto ao programa
de Pós Graduação em Medicina
Veterinária para obtenção do título de
Doutor.**

Orientador: Prof. Dr. Fernanda da Cruz Landim

Coorientador: Prof Dr. João Pessoa Araújo Júnior

Nome da Autora: Tatiana da Silva Rascado

Título: Fatores determinantes de pluripotência em embriões bovinos

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dra. Fernanda da Cruz Landim

Presidente e Orientadora

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária

FMVZ-UNESP-Botucatu

Prof. Dr. Sony Dimas Bicudo

Membro

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária

FMVZ-UNESP-Botucatu

Prof. Dra. Fabiana Ferreira Souza

Membro

Departamento de Reprodução Animal

FMVZ-UNESP-Botucatu

Prof Dr Felipe Perecin

Membro

Departamento de Medicina Veterinária

FZEA - USP

Prof Dra. Cláudia Barbosa Fernandes

Membro

Departamento de Reprodução Animal

FMVZ – USP

Data: 19 de julho de 2013.

DEDICATÓRIA

Dedico esta tese aos meus pais, José Cepa Rascado e Ahlai Rosa da Silva Rascado pelo amor, carinho e incentivo constante que permitiram que eu realizasse mais esse ideal.

AGRADECIMENTOS

A DEUS, por tudo.

À minha orientadora, professora Fernanda da Cruz Landim, pelo apoio durante a execução do projeto e elaboração da tese.

Ao meu coorientador, professor João Pessoa Araújo Júnior, pela ajuda fundamental na execução deste trabalho.

Ao Ricardo Seiti Yamatogi pela ajuda com o PCR em tempo real no início do experimento.

Aos amigos do laboratório de Virologia pelo bom convívio.

Aos amigos do laboratório de Reprodução Avançada e Terapia Celular (LANÇA).

Ao meu namorado, Leandro Totta, por entender minha ausência neste último mês.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro com a bolsa de doutorado (Processo Fapesp 2010/17250-1) e auxílio (Processo Fapesp 2010/00065-7).

Muito obrigada!!

LISTA DE TABELAS

Capítulo II

TABELA 1. Sequência de primers utilizados na qPCR.....pág 25

Capítulo III

TABELA 1. Sequência de primers utilizados na qPCR.....pág 42

LISTA DE FIGURAS

Capítulo II

Fig 1. Análise quantitativa por PCR em tempo real do nível relativo da expressão de mRNA de SOX 2 em blastocistos BI (E7), MCI (E7), blastocistos eclodidos Be (E10) e epiblasto (E10). Letras diferentes acima das barras verticais diferem estatisticamente ($p < 0,05$)pág 27

Fig 2. Análise quantitativa por PCR em tempo real do nível relativo da expressão de mRNA de Stat 3 em blastocistos BI (E7), MCI (E7), blastocistos eclodidos Be (E10) e epiblasto (E10). Letras diferentes acima das barras verticais diferem estatisticamente ($p < 0,05$)pág 28

Capítulo III

Fig 1. Análise quantitativa por PCR em tempo real do nível relativo da expressão de mRNA de GBX 2 em blastocistos BI (E7), MCI (E7), blastocistos eclodidos Be (E10) e epiblasto (E10). Letras diferentes acima das barras verticais diferem estatisticamente ($p < 0,05$).....pág 44

SUMÁRIO

	pág
Resumo.....	x
Abstract.....	xi
Capítulo I	12
1. Introdução.....	12
2. Revisão de Literatura.....	13
2.1 Marcadores moleculares das linhagens celulares em embriões.....	13
2.2 Pluripotência em células tronco embrionárias.....	15
2.3 Vias de sinalização que regulam a pluripotência.....	16
2.4 Divergências no padrão de expressão dos marcadores de pluripotência na espécie bovina.....	18
Capítulo II: Análise da expressão de SOX2 e STAT3 em blastocistos e blastocistos eclodidos na espécie bovina	19
Resumo.....	19
1. Introdução.....	20
2. Materiais e métodos.....	22
3. Resultados.....	26
4. Discussão.....	28
5. Conclusão.....	32
Referências.....	32
Capítulo III: GBX2 é um importante marcador de pluripotência em embriões bovinos.....	36

Resumo.....	36
1. Introdução.....	37
2. Material e Métodos	39
3. Resultados.....	43
4. Discussão.....	44
5. Conclusão.....	47
Referências.....	47
Capítulo IV.....	50
Considerações Gerais.....	50
Conclusões.....	50
Referências.....	51

RASCADO, T.S. **EXPRESSÃO DE FATORES DE TRANSCRIÇÃO DA VIA DE SINALIZAÇÃO LIF/JAK/STAT NO DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO INICIAL EM BOVINOS**. Botucatu, 2013 58p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

RESUMO

Este experimento objetivou analisar o padrão de expressão do mRNA de SOX2, STAT3 e GBX2 em embriões bovinos produzidos in vitro nos estádios de blastocisto (E7) e blastocisto eclodido (E10). O RNA foi extraído de embriões em cada fase do desenvolvimento embrionário (n=7) e da massa celular interna (MCI) e epiblasto isolados por imunocirurgia de 20 embriões (n=20). A expressão do mRNA foi obtida por transcriptase reversa seguida da reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-qPCR), quantificada pelo método da curva padrão e normalizada pela média geométrica de GAPDH, YWHAZ e SDHA. Os dados de cinco replicatas foram analisados por ANOVA seguido de comparações, aos pares, pelo teste de Tukey. A expressão relativa do mRNA de SOX2 foi significativamente maior em blastocistos (E7) do que em blastocistos eclodidos (E10) ($P < 0,05$), sendo que a expressão na MCI foi 40X maior do que a obtida no blastocisto inteiro ($P < 0,05$). A expressão relativa do mRNA de STAT3 não diferiu entre blastocistos (E7) e blastocistos eclodidos (E10) ($P > 0,05$). Não houve diferença entre blastocisto eclodido (E10) e epiblasto para SOX2 e STAT3 ($P > 0,05$). Comparando-se o nível relativo de mRNA de GBX2 entre blastocistos (E7) e MCI e blastocisto eclodido (E10) e epiblasto não foi detectada diferença ($P > 0,05$), sendo que MCI e epiblasto corresponderam a aproximadamente 90% da expressão observada nos embriões em suas respectivas fases de desenvolvimento. Portanto, com o desenvolvimento do blastocisto, há a tendência do aumento dos níveis de mRNA de STAT3 e SOX2 nas células pluripotentes do epiblasto; o nível de mRNA de GBX2 se mantém constante em blastocistos, com alta expressão em células pluripotentes.

Palavras chave: pluripotência, embrião bovino, expressão gênica, mRNA

RASCADO, T.S.. **Expression of transcription factors of the LIF/JAK/STAT signaling pathway on early embryonic development in cattle.** Botucatu, 2013 58p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista

ABSTRACT

This experiment aimed to analyze the pattern of expression of the mRNA of SOX2, STAT3 and GBX2 in in vitro produced bovine embryos at stages of blastocyst (E7) and hatched blastocyst (E10). The RNA was extracted from embryos at each stage of embryonic development (n= 7) and from the inner cell mass (ICM) and epiblasts isolated from 20 embryos by immunosurgery. The expression of mRNA was obtained by reverse transcriptase-polymerase chain reaction (real-time qPCR), quantified by the standard curve method and normalized by geometric mean of genes YWHAZ, SDHA and GAPDH. The data from five replicates were analyzed by ANOVA followed by comparisons, in pairs by Tukey test. The relative expression levels of SOX2 mRNA was significantly higher in blastocysts (E7) than in hatched blastocysts (E10) ($P < 0.05$), whereas that the expression in ICM was 40X greater than the expression obtained in blastocyst ($P < 0.05$). The relative expression of STAT3 mRNA did not differ between blastocysts (E7) and hatched blastocysts (E 10) ($p > 0.05$). There was no difference between blastocyst hatched (E10) and epiblasts for SOX2 and STAT3. By Comparing the relative level of GBX2 mRNA between blastocysts (E7) and ICM and blastocyst hatched (E10) and epiblasts no difference was detected ($P > 0.05$), ICM and epiblasts corresponded to approximately 90% of expression observed in embryos in their respective stages of development. Therefore, with the development of the blastocyst, there is a tendency for increased levels of STAT3 and SOX2 mRNA in the pluripotent cells of epiblasts; the level of GBX2 mRNA is constant in blastocysts with high expression in pluripotent cells.

Keywords: pluripotency, bovine embryos, gene expression, mRNA

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO

Em embriões de camundongos e humanos, a expressão de marcadores de pluripotência é geralmente limitada à massa celular interna (MCI), não sendo observada no trofoblasto. Entretanto, existem diferenças consideráveis entre camundongos, humanos e bovinos em relação ao desenvolvimento embrionário inicial. Bovinos apresentam um período extenso de alongação e proliferação do trofoblasto antes da implantação, o que resulta de uma expressão gênica diferenciada, inclusive daqueles genes considerados específicos da MCI (KIRCHHOF et al., 2000; DEGRELLE et al., 2005; BERG et al., 2011).

Outra diferença entre as espécies está relacionada às vias de sinalização e às redes reguladoras da transcrição dos fatores que controlam a diferenciação dos blastômeros totipotentes em linhagens celulares da MCI e do trofoblasto e mais tardiamente do epiblasto e hipoblasto (HARRIS et al., 2013; BERG et al., 2011; OZAWA et al., 2012; DEGRELLE et al., 2005).

Como consequência, em embriões bovinos, o mRNA e a proteína codificada pelo POU5F1 (OCT4) persistem por algum tempo no trofoblasto e no hipoblasto e tendem a se tornar restritas ao epiblasto somente após a eclosão (DEGRELLE et al., 2005; VEJLSTED et al., 2006; KHAN et al., 2009). O NANOG é expresso em poucas células da MCI antes de tornar-se restrito ao epiblasto, entretanto essa expressão é concomitante com a de GATA 6, marcador do hipoblasto, em blastocistos expandidos (KUIJK et al., 2012). Da mesma forma, a expressão do mRNA e proteína de SOX2 se torna restrita a MCI em embriões a partir do oitavo dia de desenvolvimento (KHAN et al., 2012).

Assim sendo, os marcadores convencionais de pluripotência têm se demonstrado inespecíficos tanto na espécie bovina como em outros ungulados (KEEFER et al., 2007; MUÑOZ et al., 2008) e este fato dificulta a caracterização apropriada das células tronco embrionárias nas espécies domésticas (MUÑOZ et al., 2008; KEEFER et al., 2007; GJORRET et al., 2005).

A investigação detalhada de genes relacionados à pluripotência durante as fases de desenvolvimento do blastocisto fornecem informações importantes com

relação ao desenvolvimento embrionário inicial e a derivação de células tronco embrionárias (HE et al., 2006).

Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o padrão de expressão dos genes SOX2, STAT3 e GBX2 em blastocistos e blastocistos eclodidos com sete e dez dias de desenvolvimento *in vitro* e assim analisar se eles podem ser considerados marcadores de pluripotência adequados na espécie bovina.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Marcadores moleculares das linhagens celulares em embriões

Com o desenvolvimento embrionário, as células gradualmente perdem a plasticidade, ou seja, a capacidade de originar outros tipos celulares. O zigoto, oócito fertilizado formado por uma célula e os blastômeros do embrião nos estádios iniciais de clivagem são totipotentes, isto é, podem se transformar em todos os tipos de células somáticas, linhagem germinativa e membranas extra-embrionárias. O primeiro sinal de diferenciação se torna evidente na compactação da mórula, quando as células externas, ou seja, o trofoblasto em desenvolvimento, estão conectadas por junções de adesão e desmossomos circundando a MCI. O trofoblasto é um epitélio completamente diferenciado enquanto que as células da MCI são pluripotentes e conservam a capacidade de se diferenciar em todos os tipos celulares do corpo (MADDOX HYTTEL et al., 2003). Por volta da eclosão do blastocisto, que em bovinos ocorre 8 a 10 dias após a fecundação, a MCI se transforma em um epitélio completamente diferenciado, o hipoblasto (também chamado de endoderme primitiva) e em uma população superior de células pluripotentes, o epiblasto. O hipoblasto forma um revestimento na parte interna do epiblasto e do trofoblasto e estes são gradualmente separados estabelecendo-se assim o disco embrionário (VEJLSTED et al., 2006b). Como próximo passo na diferenciação celular, 15 dias após a fecundação, o epiblasto inicia o processo de gastrulação, por meio do qual os folhetos embrionários, o ectoderma, o mesoderma e o endoderma são

formados juntamente com as células germinativas primordiais. As células dos folhetos embrionários tornam-se progressivamente restritas quanto ao potencial de desenvolvimento e são multipotentes, enquanto as células germinativas primordiais permanecem pluripotentes (MUELLER et al., 1999).

A rede principal que controla a manutenção do estado pluripotente é composta pelo OCT4, NANOG e SOX2. Em camundongos, esses fatores inicialmente são expressos em todos os blastômeros e no blastocisto se restringem à MCI (AVILION et al., 2003; CHAMBERS et al., 2003; MITSUI et al., 2003). Há a indicação de que SALL4, fator de transcrição pertencente à família SPALT, seja ativador do OCT4 e modulador da transcrição de NANOG (WU et al., 2006). Quando células da MCI geneticamente modificadas com deficiência de SALL4 foram cultivadas *in vitro*, expressaram marcadores de linhagem trofoblástica, como o CDX2 (ELLING et al., 2006). Além disso, a introdução de RNA silenciador de SALL4 em zigotos murinos resultou na diminuição da expressão não só de SALL4, mas também, do mRNA de OCT4 e no aumento da expressão de genes específicos do trofoblasto na MCI (ZHANG et al., 2006). Sinergicamente, OCT4 e SOX2 ativam a transcrição de genes importantes para a manutenção da pluripotência, incluindo eles próprios (CHEW et al., 2005), NANOG (AVILLION et al., 2003) e KLF 4. Estudos de deleção gênica têm demonstrado que embriões deficientes para OCT4 e NANOG conseguem se desenvolver até o estágio de blastocisto (MITSUI et al., 2003), entretanto células da MCI silenciadas para OCT4 cultivadas *in vitro* diferenciaram-se apenas na linhagem trofoblástica (NICHOLS et al., 1998). Células da MCI nulas para NANOG se limitaram ou a diferenciação em células do trofoblasto ou a apoptose (SILVA et al., 2009). Os fatores de pluripotência neutralizam os genes envolvidos no programa de diferenciação celular (NIWA et al., 2005); ou seja, OCT4 e SOX2 formam um complexo que inibe a expressão de CDX2 enquanto NANOG suprime a diferenciação da MCI em hipoblasto (MITSUI et al., 2003).

Um dos fatores indispensáveis à manutenção e funcionamento do trofoblasto é o CDX2, cuja expressão é regulada por TEAD4 (NISHIOKA et al., 2009). Embriões murinos geneticamente modificados para esse gene (TEAD4^{-/-}) falharam em expressar CDX2 e formar a blastocele. Acredita-se que TEAD4 controle os genes que especificam o trofoblasto, como EOMES (T-box fator de transcrição Eomesodermin) e o fator de transcrição Ets, Elf5. Em bovinos, CDX2 é

independente do EOMES, uma vez que esse gene não foi detectado no trofoblasto em desenvolvimento (DEGRELLE et al., 2005; BERG et al., 2011).

Relata-se, também, a atuação de KLF 5 (LIN et al., 2010) e a ativação da via de sinalização FGF/ERK (fator de crescimento de fibroblasto/quinase reguladora do sinal extracelular) na formação e manutenção do trofoblasto (LU et al., 2008). Alterações na sinalização desta via, a partir do tratamento de embriões de rato no estágio de oito células com PD98059, inibidor da MEK 1, resultou não somente na inativação de ERK1/ERK2 MAPKs, mas também na baixa expressão de CDX2 nos estádios de mórula e blastocisto. Além disso, o desenvolvimento dos blastocistos ficou atrasado e o crescimento do trofoblasto reduzido (LU et al., 2008).

Dois fatores de transcrição, membros da família GATA, GATA 4 e GATA 6, são importantes na especialização de linhagens do hipoblasto. Embriões de ratos mutantes para GATA 4 ou GATA 6 (GATA 4^{-/-} ou GATA 6^{-/-}) falharam no desenvolvimento da endoderma visceral (KOUTSOURAKIS et al., 1999).

A via de sinalização FGF/ERK também está envolvida na especialização de células do hipoblasto e epiblasto bovinos, uma vez que a administração exógena de FGF2 estimulou a proliferação do hipoblasto em blastocistos e cultivos de MCI. (YANG et al., 2011). Da mesma forma, o FGF4 favoreceu o aumento da expressão de GATA 6, inibindo a transcrição de NANOG e convertendo o epiblasto em hipoblasto (KUIJK et al., 2012).

A expressão do mRNA de NANOG está altamente relacionada com a formação do epiblasto e com a exclusão da transcrição de GATA 6. Através da deleção gênica, foi demonstrado que células nulas para NANOG falharam em gerar o epiblasto (MITSUI et al., 2003).

2.2. Pluripotência em células tronco embrionárias

A pluripotência é um estado transitório *in vivo*, porém linhas de células tronco derivadas de embriões podem ser pluripotentes por período indefinido de cultivo *in vitro* (BOYER et al., 2006).

As células tronco embrionárias são células originadas da MCI e do epiblasto de blastocistos e possuem a capacidade de se multiplicar infinitamente *in vitro*, mantendo o cariótipo estável e normal e são aptas a se diferenciar em

qualquer tipo de célula do organismo originária dos três folhetos embrionários (FRIEL et al, 2005; YU *et al.*, 2006).

Porém, uma das limitações para o estabelecimento de células tronco embrionárias é exatamente a dificuldade em mantê-las em um estado indiferenciado. A pluripotência pode ser mantida pelo cultivo com fator inibidor da leucemia (LIF) em camundongos (SMITH et al., 1992), FGF 2 em humanos (VALLIER et al., 2005) ou por cultivo em camada de fibroblasto embrionário inativado em camundongos e humanos. Em bovinos, o cultivo de colônias de MCI com ou sem FGF2 sob camada de fibroblasto embrionário inativado de camundongo não sustentou a expressão de NANOG e SOX2 (LIM et al., 2011). Combinando camada de fibroblasto embrionário murino, LIF e FGF2, células derivadas da MCI se mantiveram indiferenciadas por dez passagens (GONG et al., 2010), porém a expressão de genes determinante de pluripotência na oitava, nona e décima passagem não foi relatada. Desta forma, as exigências para manutenção da pluripotência *in vitro* variam de acordo com a espécie.

2.3 Vias de sinalização que regulam a pluripotência

Via de Sinalização LIF/JAK/STAT3: O fator inibidor da leucemia (LIF) pertence à família das interleucinas 6 (SMITH et al., 1998) e atua sobre o receptor LIFR que consiste de duas subunidades, a glicoproteína 130 (GP 130) e o LIFR β . A ligação do LIF ao LIFR β resulta na heterodimerização com a GP130 e na ativação da via de sinalização JAK/STAT3. Jak kinase fosforila o STAT3, fator de transcrição responsável pela ativação de genes envolvidos na manutenção da pluripotência como KLF4, SOX2, OCT4 (BOURILLOT et al., 2009; BURDON et al., 1999; MATSUDA et al., 1999) e o GBX2 (TAI e YING, 2013).

Via de Sinalização LIF/MEK/ERK: Paradoxalmente, LIFR β e GP 130 também ativam a via de sinalização MAPKs ERK1/2, induzindo a diferenciação e bloqueando a autorrenovação das células tronco embrionárias. A inibição desta via com a utilização de PD98059 ou U0126, inibidores da MEK 1, aumentou a eficiência na derivação de células tronco embrionárias murinas (YING et al.,

2008). Efeito oposto foi verificado quando inibidores da MEK 1 foram adicionados ao cultivo de células tronco embrionárias humanas, as quais perderam a capacidade de autorrenovação (LI et al., 2007).

Via de Sinalização WNT/ β catenin: Após a ligação de WNT (Wingless Typed) ao receptor *Frizzled* ocorre a ativação do receptor que induz a inativação de GSK 3 (“glycogen synthase kinase 3”) e subsequente acúmulo de β catenina, a qual via TCF (“T-cell specific factors”) estimula a expressão de OCT4, NANOG E REX 1. A função dessa via é controversa, pois há estudos que afirmam e outros que contradizem sua importância para a manutenção do estado indiferenciado das células tronco humanas e murinas (SATO et al., 2004; DRAVID et al., 2005).

Por outro lado, embriões bovinos cultivados em condições quimicamente definidas, baseada na inibição da via FGF/MAPK e estimulação da via Wnt/GSK/ β catenin levou ao desenvolvimento de blastocistos de melhor qualidade com significativo aumento na expressão dos marcadores de pluripotência, principalmente do NANOG (HARRIS et al., 2013; OZAWA et al., 2012).

FGF 2 e via de sinalização TGF β /Activin A/Nodal: FGF2 produzido pelo endométrio, pela MCI ou administrado exogenamente estimula a secreção de ativina A e Nodal, pertencentes aos fatores de crescimento transformante β (TGF β) (GREBER et al., 2007). Ativina A e Nodal, através dos receptores ACVR1B e ACVR2B, induzem os fatores de transcrição SMAD2/3 (JAMES et al., 2005) a se ligarem na região promotora do NANOG e ativarem sua transcrição.

Maruot et al (2012) comprovaram que essa via de sinalização está ativa durante a elongação do blastocisto bovino e no desenvolvimento do epiblasto. Relataram, também, a incapacidade desta via em manter o estado pluripotente durante o cultivo de células do epiblasto, evidenciado pela diferenciação celular após várias passagens.

2.4. Divergências no padrão de expressão dos marcadores de pluripotência na espécie bovina

A expressão do OCT4 foi estudada em blastocistos expandidos produzidos *in vitro* e *in vivo* nas espécies murina, suína e bovina. Em camundongos, a expressão do OCT 4 foi restrita à MCI, enquanto em suínos e bovinos sua expressão foi observada tanto na MCI quanto no trofoblasto, não havendo diferenças entre embriões produzidos *in vitro* e *in vivo* (KIRCHHOF et al., 2000). Esses dados corroboram com os encontrados por He et al. (2006), segundo os quais houve expressão de OCT4 na MCI e trofoblasto de blastocistos caprinos produzidos *in vivo*. Concluiu-se, portanto, que existe marcada diferença na regulação do OCT 4 entre camundongos e animais domésticos (KIRCHHOF et al., 2000; HE et al., 2006).

Por outro lado, Veljsted et al. (2005) relataram a expressão de OCT 4 exclusivamente no epiblasto de embriões bovinos produzidos *in vivo* e *in vitro* 12 dias após a inseminação e em embriões com 14 dias de gestação.

Os antígenos embrionários estágio específicos SSEA1, SSEA3 e SSEA4 têm sido amplamente utilizados para identificar células tronco embrionárias de murinos e humanos, entretanto os dados com relação à expressão desses marcadores de superfície em células tronco embrionárias bovinas são bastante controversos (MUÑOZ et al., 2008).

Em 2001, Militapova et al. relataram forte expressão de SSEA 1, SSEA3 e SSEA4 em células tronco derivadas de embriões bovinos. Esses dados concordaram parcialmente com os encontrados por Saito et al.(2003), os quais observaram expressão de SSEA1, mas não de SSEA 3 e SSEA4 e com os de Muñoz et al. (2008), segundo os quais houve expressão de SSEA4, mas não de SSEA1.

Estudando a expressão desses marcadores de superfície celular em blastocistos produzidos *in vitro*, Muñoz et al. (2008) e Paint e Keefer (2009) relataram expressão negativa para SSEA1 e homogênea para SSEA4, o qual foi identificado tanto na MCI quanto no trofoblasto.

He et al. (2006) observaram a expressão de SSEA1 e SSEA4 exclusivamente na MCI de blastocistos caprinos produzidos *in vitro*, entretanto estes foram expressos no trofoblasto de blastocistos gerados *in vivo*.

A atividade da fosfatase alcalina, bastante utilizada para avaliar a indiferenciação de células tronco embrionárias tem sido controversa em bovinos. No estudo realizado por Vejlsted et al. (2005) as células do epiblasto não apresentaram atividade de fosfatase alcalina, a qual foi detectada unicamente em células do trofoblasto por Edwards et al. (2003). Maddox-Hyttel et al. (2003) analisando a atividade de fosfatase alcalina, também, por imunistoquímica, em embriões com 14 dias de gestação, observaram que não houve detecção no epiblasto, mas sim no trofoblasto e no hipoblasto.

Assim sendo, os marcadores convencionais de pluripotência têm se demonstrado inespecíficos tanto na espécie bovina como em outros ungulados (KEEFER et al., 2007; MUÑOZ et al., 2008).

CAPÍTULO II

“Trabalho será enviado para a revista *Theriogenology*”

Análise da expressão de SOX2 e STAT3 em blastocistos e blastocistos eclodidos na espécie bovina

Resumo

Os marcadores convencionais de pluripotência têm se demonstrado inespecíficos tanto na espécie bovina como em outros ungulados e este fato dificulta a caracterização apropriada das células tronco embrionárias em animais domésticos. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o padrão de expressão dos genes SOX2 e STAT3 em blastocistos e blastocistos eclodidos com sete e dez dias de desenvolvimento *in vitro*. O RNA foi extraído de embriões

em cada fase do desenvolvimento embrionário (n=7) e da massa celular interna (MCI) e epiblasto isolados de 20 embriões por imunocirurgia. A expressão do mRNA foi obtida por transcriptase reversa seguida da reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-qPCR), quantificada pelo método da curva padrão e normalizada pela média geométrica de GAPDH, YWHAZ e SDHA. A expressão relativa do mRNA de SOX2 foi significativamente maior em blastocistos (E7) do que em blastocistos eclodidos (E10) ($P < 0,05$), sendo que a expressão na MCI foi 40 vezes menor do que a obtida em blastocistos ($P < 0,05$). A expressão relativa do mRNA de STAT3 não diferiu entre blastocistos (E7) e blastocistos eclodidos (E10) ($P > 0,05$). Não houve diferença no nível relativo de mRNA entre blastocisto eclodido (E10) e epiblasto para SOX2 e STAT3. Portanto, com o desenvolvimento do blastocisto, há a tendência do aumento dos níveis de mRNA de STAT3 e SOX2 nas células pluripotentes do epiblasto.

Palavras chave: expressão gênica, mRNA, embriões bovinos, qPCR

1. Introdução

Em embriões de camundongos e humanos, a expressão de marcadores de pluripotência é geralmente limitada à massa celular interna (MCI), não sendo observada no trofoblasto. Entretanto, existem diferenças consideráveis entre camundongos, humanos e bovinos em relação ao desenvolvimento embrionário inicial. Bovinos apresentam um período extenso de alongação e proliferação do trofoblasto antes da implantação, o que resulta de uma expressão gênica diferenciada, inclusive daqueles genes considerados específicos da MCI [1-3].

Outra diferença entre as espécies está relacionada às vias de sinalização e às redes reguladoras da transcrição dos fatores que controlam a diferenciação dos blastômeros totipotentes em linhagens celulares da MCI e do trofoblasto e mais tardiamente do epiblasto e do hipoblasto [2-5].

Como consequência, em embriões bovinos, o mRNA e a proteína codificada pelo POU5F1 (OCT4) persistem por algum tempo no trofoblasto e no hipoblasto e tendem a se tornar restritas ao epiblasto somente após a eclosão [2,6,7]. O NANOG é expresso em poucas células da MCI antes de tornar-se restrito ao epiblasto, entretanto essa expressão é concomitante com a de GATA 6, marcador do hipoblasto, em blastocisto expandido [8]. Da mesma forma, a expressão do mRNA e proteína de SOX2 se torna restrita a MCI em embriões a partir do oitavo dia de desenvolvimento [7].

Assim sendo, os marcadores convencionais de pluripotência têm se demonstrado inespecíficos tanto na espécie bovina como em outros ungulados [9,10] e este fato dificulta a caracterização apropriada das células tronco embrionárias nas espécies domésticas [9-11]. A investigação detalhada de genes relacionados à pluripotência durante as fases de desenvolvimento do blastocisto fornece informações importantes com relação ao desenvolvimento embrionário inicial e a derivação de células tronco embrionárias [12].

Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o padrão de expressão dos genes SOX2 e STAT3 em blastocistos e blastocistos eclodidos com sete e dez dias de desenvolvimento *in vitro* e assim analisar se eles podem ser considerados marcadores de pluripotência adequados na espécie bovina.

2. Material e Métodos

Todos os reagentes foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, USA) a não ser que outra fonte seja citada.

2.1 Produção de embriões *in vitro*

Os folículos foram aspirados de ovários de abatedouro e os COCs maturados por 24 horas em TCM 199 (GIBCO, Grand Island, NY, USA) acrescido de 10% SFB (GIBCO), 0,2 mM de piruvato de sódio, 5µg/mL de FSH (Folltropin®, Bioniche Animal Health, Belleville, Ont, Canada), 50 µg/mL de LH (Lutropin-V®, Bioniche Animal Health, Belleville, Ont, Canada), 100 µg/mL de estreptomicina e 100 UI/mL de penicilina (GIBCO) a temperatura de 38,5°C e atmosfera de 5% de CO₂ em ar.

Após a descongelação, os espermatozoides foram selecionados por gradiente de percoll de 45% e 90% e a concentração foi ajustada para 2x10⁶ espermatozoides/mL. Os gametas foram cultivados em meio HTF (Irvine Scientific, Santa Ana, USA) acrescido de 5mg/mL de BSA; 0,2mM de piruvato, 30µg/mL de heparina, 18µM de penicilamina, 10µM de hipotaurina, 1,8µM de epinefrina, 100mg/mL de estreptomicina e 100UI/mL de penicilina, sendo cultivados nas mesmas condições da maturação *in vitro*.

Os possíveis zigotos foram desnudados e cultivados em meio SOFaaci acrescido de 2,7 mM de mio-inositol, 1 mM de piruvato de sódio, 2 mM de glutamina, 5% de SFB, 5 mg/mL deBSA e penicilina/estreptomicina em atmosfera de 5% de CO₂, 5% O₂ e 90% N₂. Uma parte dos embriões foi cultivada por sete dias e outra parte por dez dias, com substituição do meio no sétimo dia.

2.2 Isolamento da MCI e do epiblasto

A zona pelúcida foi removida com 4mg/mL de pronase. Em embriões eclodidos, essa etapa não foi executada. Os embriões foram lavados e incubados por 40 minutos a 38,5⁰C com anticorpo anti-albumina bovina (Sigma, B1520) diluído 1:20 em meio SOFaaci. Após serem lavados, a lise do trofoblasto foi induzida, incubando-os com complemento de coelho (Sigma, S7764) diluído 1:20 em SOFaaci a 38,5⁰C por 40 minutos. Em seguida, os embriões foram lavados e a MCI liberada das células lisadas do trofoblasto pela passagem pelo lúmen estreito de pipeta de vidro.

2.3 Extração de RNA

As extrações de RNA foram realizadas em grupos de blastocistos E7 e blastocistos eclodidos E10 (n=7) e em grupos de células da MCI e do epiblasto isolados de 20 embriões por imunocirurgia. Foi utilizado o RNeasy Micro Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA), seguindo as instruções do fabricante. O RNA foi tratado com DNase para remover o DNA contaminante antes de ser realizada a transcriptase reversa.

2.4. Transcriptase reversa e reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT - qPCR)

A transcriptase reversa Superscript III (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) foi utilizada para sintetizar o DNA complementar (cDNA) utilizando *primers random* como iniciadores e seguindo as instruções do fabricante. A reação para a PCR

em tempo real foi composta de 5µL de água milli-Q livre de nucleases; 10 µL de Go taq qPCR Master Mix (Promega, MA, USA); 0,2µM de *primer sense*; 0,2µM de primer antisense (Tabela 1); 0,2 µL de *reference dye* (Promega) e 4µL de amostra de cDNA, que correspondeu a sete blastocistos (E7), sete blastocistos eclodidos (E10), MCI isoladas de 20 blastocistos (E7) e epiblastos isolados de 20 blastocistos eclodidos (E10). Os genes transcritos foram expressos por PCR em tempo real usando um 7300 Real Time PCR System (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA). Como controle endógeno, foram utilizados os genes YWHAZ, SDHA e GAPDH conforme Goosens et al. [13], e, como controle negativo, foi adicionado água livre de nucleases.

As reações de quantificação de cada gene alvo e controles endógenos foram realizadas em duplicata para cada amostra de cDNA , sendo repetidas cinco vezes. Os *slopes* da curva padrão variaram de -3,4 a -3,5, o que corresponde a uma eficiência de 93 a 96%; o coeficiente de correlação (R^2) foi de 0,99. A quantificação relativa da expressão gênica foi realizada pelo método da curva padrão [14] e o fator de normalização foi obtido pela média geométrica dos genes YWHAZ, SDHA e GAPDH [13]. A especificidade da amplificação gênica foi confirmada para os seis pares de primers (Tabela 1) por meio da análise da curva de *Melting* e da eletroforese. As reações de todos os pares de *primers* apresentaram curva de *Melting* com pico único e apenas uma banda de tamanho esperado no gel de agarose, confirmando a ausência de dímeros de *primers*.

O gene específico da linhagem trofoblástica, CDX2, foi utilizado para avaliar se as células da MCI e epiblasto foram contaminadas com células do trofoblasto.

TABELA 1. Sequência de primers utilizados na qPCR.

GENE	SEQUÊNCIA DO PRIMER	TAMANHO DO PRODUTO
SOX2	F: 5'CAAAACCATCTCCGTGGTCT3' R: 5'TACCAACGATGTCAACCTGC3'	109 pb
STAT3	F: 5'ACTGAGATCAGGGGATGTGG3' R: 5'CAGGAGGCACTTGACTCACA3'	129 pb
GAPDH	F: 5'-TTCAACGGCACAGTCAAGG-3' R: 5'-ACATACTCAGCACCAGCATCAC-3'	119 pb
SDHA	F: 5'-GCAGAACCTGATGCTTTGTG-3' R: 5'CGTAGGAGAGCGTGTGCTT-3'	180 pb
YWHAZ	F: 5'-GCATCCCACAGACTATTTCC-3' R: 5'-GCAAAGACAATGACAGACCA-3'	120 pb
CDX2	F: 5'CTCCTGGACAAGGACGTGAG3' R: 5'GGGCTGACGAAGTTCTGC3'	110 pb

2.5 Delineamento Experimental

Os genes alvo, SOX2 e STAT3, os três genes referência e o CDX2 foram expressos em 4 grupos:

- Blastocistos com sete dias de desenvolvimento *in vitro*
- Células da MCI de blastocistos com sete dias de desenvolvimento *in vitro*
- Blastocistos com dez dias de desenvolvimento *in vitro*
- Células do epiblasto de blastocistos com dez dias de desenvolvimento *in vitro*

Durante o experimento foram realizadas cinco replicatas. Em cada replicata, os genes alvo, referência e o CDX2 foram expressos a partir da mesma amostra de cDNA obtida de cada grupo estudado.

2.6 Análise estatística

Os dados de 5 replicatas foram analisados por Análise de Variância (ANOVA) seguido de múltiplas comparações, aos pares, pelo teste de Tukey. O programa estatístico utilizado foi o Sigmastat 3.5 e o nível de significância foi de 5%.

3. Resultados

3.1. Expressão de SOX2 em blastocistos e blastocistos eclodidos

Conforme apresentado na Fig 1, o nível relativo de mRNA de SOX2 em blastocistos com sete dias de desenvolvimento *in vitro* (E7) foi significativamente maior do que o nível obtido em blastocistos eclodidos com 10 dias de desenvolvimento (E10) ($P < 0,05$). Comparando-se a expressão relativa de SOX2 em blastocistos (E7) com a expressão apenas na MCI (MCI E7), foi observado que a expressão nas células da MCI foi 40 vezes mais baixa do que a expressão obtida no blastocisto ($P < 0,05$). Com dez dias de desenvolvimento embrionário, os níveis relativos de mRNA de SOX2 não diferiram entre blastocisto eclodido e epiblasto, sendo que o epiblasto representou, aproximadamente, 58% da expressão obtida no embrião ($P > 0,05$).

O mRNA de CDX2 esteve abaixo dos limites de detecção na MCI e epiblasto, confirmando que não houve contaminação com células do trofoblasto.

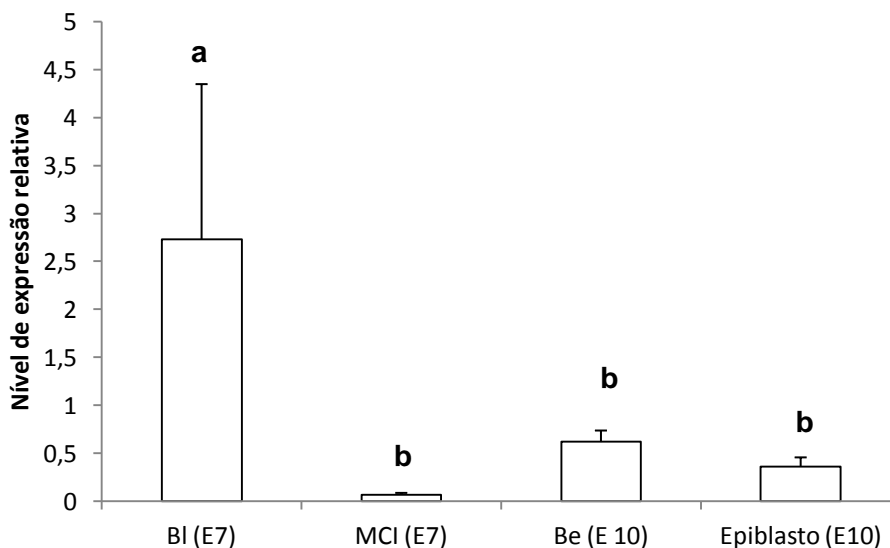


Fig. 1. Análise quantitativa por PCR em tempo real do nível relativo da expressão de mRNA de SOX 2 em blastocistos BI (E7), MCI (E7), blastocistos eclodidos Be (E10) e epiblasto (E10). Letras diferentes acima das barras verticais diferem estatisticamente ($P < 0,05$).

3.2. Expressão de STAT3 em blastocistos e blastocistos eclodidos

Não foi observada diferença entre blastocisto (E7) e blastocisto eclodido (E10) com relação ao nível de expressão relativa de mRNA de STAT3 ($P > 0,05$). Comparando-se o nível relativo de mRNA de STAT3 entre blastocistos (E7) e MCI, observou-se expressão 10 vezes mais baixa nas células da MCI ($P < 0,05$). Os níveis relativos de mRNA de STAT3 não diferiram entre blastocistos eclodidos e epiblasto ($P > 0,05$), sendo que o epiblasto representou, aproximadamente, 94% da expressão observada no embrião (Fig 2).

O mRNA de CDX2 esteve abaixo dos limites de detecção na MCI e epiblasto, confirmando que não houve contaminação com células do trofoblasto.

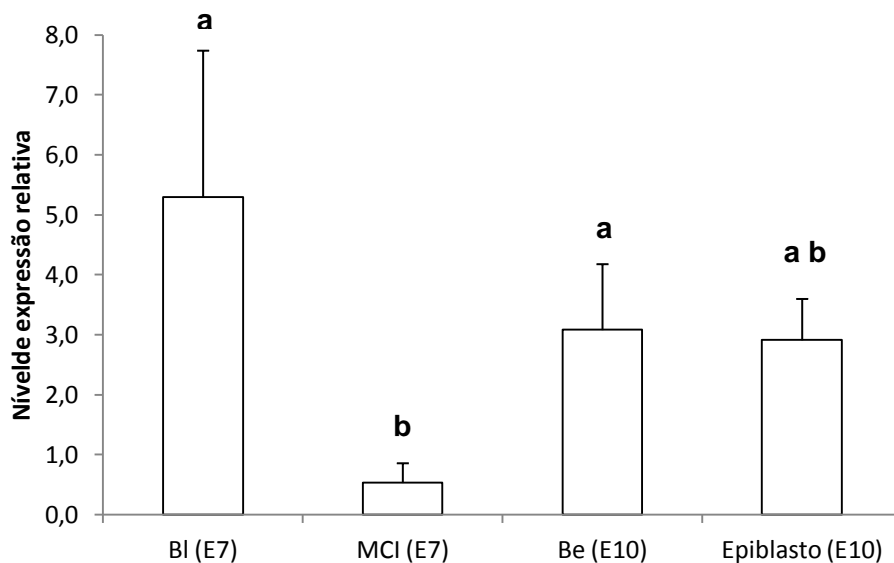


Fig 2. . Análise quantitativa por PCR em tempo real do nível relativo da expressão de mRNA de STAT 3 em blastocistos BI (E7), MCI (E7), blastocistos eclodidos Be (E10) e epiblasto (E10). Letras diferentes acima das barras verticais diferem estatisticamente ($P < 0,05$).

4. Discussão

Assim como relatado para outros marcadores de pluripotência, neste estudo, SOX2 e STAT3 foram expressos nas células da MCI e do trofoblasto de blastocistos e blastocistos eclodidos produzidos *in vitro*. Com o desenvolvimento embrionário e consequente eclosão, houve uma tendência à restrição do mRNA dos genes estudados ao epiblasto.

Dados similares foram relatados para o gene OCT4, cuja expressão foi concomitante na MCI e trofoblasto de embriões bovinos com oito dias de desenvolvimento, apresentando restrição ao epiblasto a partir do nono dia [3,7].

Da mesma forma, Degrelle et al. [2] relataram expressão constante de NANOG e OCT4 em células da MCI e trofoblasto de embriões esféricos (E7) e ovóides (E12). Pant e Keefer [15] observaram que a expressão das proteínas NANOG e OCT4 não foi restrita à MCI em embriões com sete dias de desenvolvimento *in vitro*.

Assim como demonstrado neste estudo, Khan et al. [7], Maruot et al. [16] e Harris et al. [4], observaram que a expressão de SOX2 foi restrita a células pluripotentes a partir do oitavo, nono dia do desenvolvimento embrionário, concordando, portanto, com nossas observações.

Contrariando os resultados obtidos neste trabalho, em que foi observado fraca expressão de SOX2 em células da MCI de blastocistos (E7), Degrelle et al [2] e Khan et al. [4] referiram forte expressão de SOX2 em células da MCI de embriões no mesmo estágio de desenvolvimento. Entretanto, as técnicas de avaliação foram diferentes, sendo a PCR em tempo real mais indicada do que a hibridização *in situ* para avaliar níveis de mRNA.

Além disso, foi comprovado que SOX2 é importante na formação do trofoblasto de embriões murinos pré-implantação, pois não foi detectada expressão alterada de OCT4 e NANOG em embriões deficientes para SOX2 (SOX2^{-/-}), mas sim dos genes que regulam a formação do trofoblasto como EOMES e CDX2 [17].

Associado a este fato, transcritos de SOX2 foram detectados desde as fases iniciais de clivagem do embrião bovino até o estágio de blastocisto, sendo que o nível mais elevado foi mensurado no estágio de mórula [4].

Desta forma, podemos inferir que logo após a diferenciação dos blastômeros em células da MCI e do trofoblasto, a transcrição de mRNA de SOX2

seja elevada em muitas células do trofoblasto até que se restrinjam apenas às células do epiblasto.

Os trabalhos existentes na literatura, relacionados ao padrão de expressão do gene SOX2 em bovinos não compararam o nível de expressão de mRNA entre diferentes fases de blastocisto, porém Puy et al.[18], realizaram estudo similar a este em embriões suínos e observaram que o mRNA de SOX2 esteve ausente em embriões de 6,5 a 8,5 dias de desenvolvimento, sendo detectado apenas em blastocistos a partir de 9,5 dias. Esse resultado difere do encontrado para bovinos, pois o nível de mRNA de SOX2 foi significativamente mais alto em embriões aos sete dias de desenvolvimento quando comparado aos de 10 dias, revelando, uma diferença na regulação gênica entre as espécies.

Diversas vias de sinalização estão relacionadas com o caráter pluripotente de embriões e células tronco embrionárias [19,20]. A via Jak-STAT é estimulada pelo LIF, que induz a ativação dos fatores de transcrição STAT3 e STAT1, responsáveis por manter a autorrenovação nas células tronco [21]. Palmqvist et al. [26], relataram que os níveis de STAT3 diminuíram significativamente quando células tronco embrionárias murinas foram induzidas à diferenciação por meio da retirada do LIF do meio de cultivo.

Embora embriões bovinos produzidos *in vitro* expressem transcritos do receptor de LIF (LIFR) e GP 130 em todos os estádios do desenvolvimento pré-implantação [22], a importância desta via na manutenção da pluripotência é discutível, uma vez que estudos realizados por Rodrigues et al. [23] e Vejlsted et al. [24] demonstraram um efeito deletério da adição de LIF ao cultivo de embriões e células tronco embrionárias em bovinos.

Neste estudo, foi observada alta expressão de mRNA de STAT3 em células do epiblasto, concordando com Saito et al. (2013) que relataram a expressão deste gene em cultivo de células semelhantes a células tronco embrionárias bovinas, estes dados contribuem para a afirmação da importância da via LIF/JAK/STAT na manutenção da pluripotência na espécie bovina.

De acordo com os dados apresentados podemos inferir que a expressão de fatores relacionados à pluripotência apresenta uma restrição tardia a células da MCI quando comparado à espécie murina, o que pode estar relacionado a diferenças marcantes entre a embriologia inicial de camundongos e bovinos. Embriões de camundongos implantam um dia após a formação do blastocisto, então há proliferação do trofoblasto e diferenciação em células gigantes, cone ectoplacental e ectoderma extra embrionário. Por outro lado, o trofoblasto de embriões bovinos proliferam intensamente antes da implantação, a qual ocorre duas semanas após a descida do blastocisto para o útero [27]. Assim sendo, para a espécie bovina não é necessário que as células do trofoblasto se especializem tão cedo como ocorre nos murinos.

Devido a este fato, na espécie bovina, os marcadores de pluripotência se restringem à MCI numa fase de desenvolvimento em que já houve o início da diferenciação em hipoblasto e epiblasto [28].

Sabe-se que o estágio de desenvolvimento embrionário é importante na derivação de células tronco embrionárias, linhas de células troncos de humanos e murinos são derivadas mais eficientemente de blastocistos na fase inicial de desenvolvimento [29,30], o que condiz com marcadores de pluripotência restritos à MCI. Nossos dados, juntamente com os obtidos na literatura, nos levam a inferir

que a derivação de células tronco embrionária bovinas seja mais eficiente a partir de embriões com nove, dez dias de desenvolvimento, levando em consideração as características moleculares do epiblasto.

5. Conclusão

Conclui-se que, com o desenvolvimento do blastocisto, há a tendência do aumento dos níveis de mRNA de STAT3 e SOX2 nas células pluripotentes do epiblasto.

Agradecimentos

Este trabalho foi financiado pela Fapesp (processos 2010/17250-1 e 2010/00065-7).

Referências

- [1] Kirchoff N, Arnwath JW, Lemme E, Anastassiadis K, Scholer H, Niemann H. Expression pattern of Oct-4 in preimplantation embryos of different species. *Biol Reprod* 2000; 63:1698-705.
- [2] Degrelle SA, Champion E, Cabau C, Piumi F, Reinaud P, Richard C, Renard J, Hue I. Molecular evidence for a critical in mural trophoblast development in bovine blastocysts. *Dev Bio* 2005; 288:448-60.
- [3] Berg DK, Smith CS, Pearton DJ, Wells DN, Broadhurts R, Donnison M. Trophectoderm lineage determination in cattle. *Cell* 2011; 20:244-55.

- [4] Harris D, Huang B, Oback B. Inhibition of MAP2K and GSK3 signaling promotes bovine blastocyst development and epiblast associated expression of pluripotency factor. [Epub ahead of print]; DOI: 10.1095/Bio Reprod 2013. 112.103390.
- [5] Ozawa M, Sakatani M, Hankowski KE, Terada N, Dobbs KB, Hansen PJ. Importance of culture conditions during the morula to blastocysts period on capacity of inner cell mass cells of bovine blastocysts for establishment of self renewing pluripotent cells. *Theriogenology* 2012; 78:1243-51.
- [6] Vejlsted M, Offenberg H, Thorup F, Maddox-Hyttel P. Confinement and clearance of Oct-4 in the porcine embryo at stereomicroscopically defined stages around gastrulation. *Mol Reprod Dev* 2006; 73:709-18.
- [7] KhanDR, Dube D, Gall L, Peynot N, Ruffini S, Laffont L, Bourhis D, Degrelle S, Jouneau A, Duranthon V. Expression of pluripotency master regulators during two key developmental transitions: EGA and early lineage specification in the bovine embryo. *Plos One* 2012; 7:e 34110, 2012.
- [8] Kuij, EW, Van Tol LT, Van de Velde H, Wubbolts R, Welling M, Geijsen N, Roelen BA. The roles of FGF and MAP Kinase signaling in the segregation of the epiblast and hypoblast cell lineages in bovine and human embryos. *Development* 2012; 139:871-82.
- [9] Keefer CL, Pant D, Blomberg NC, Talbot NC. Challenges and prospects for the establishment of embryonic stem cell lines of domesticated ungulates. *Anim Reprod Sci* 2007; 98:147-68.
- [10] Muñoz M, Rodríguez C, De Frutos C, Caamaño JN, Díez C, Facal N, Gómez E. Conventional pluripotency markers are unspecific for bovine embryonic-derived cell-lines. *Theriogenology* 2008; 69:1159-64.

- [11] Gjorret JO, Maddox-Hyttel P. Attempts towards derivation and establishment of bovine embryonic stem cell-like cultures. *Reprod Fert Dev* 2005; 17:113-24.
- [12] He S, Pant D, Schiffmacher A, Bischoff S, Melican D, Gavin W, Keefer C. Developmental expression of pluripotency determining factors in caprine embryos: novel pattern of nanog protein localization in the nucleolus. *Mol Reprod Dev* 2006; 73:1512-22.
- [13] Goossens K, Pouche MV, Soom AN, Vandesomepele, AZ, Peelman LJ. Selection of reference genes for quantitative real-time PCR in bovine preimplantation embryos. *BMC Dev Biol* 2005; 5:27.
- [14] Larianov A, Krause A, Miller W. A standard curve based method for relative real time PCR data processing. *BMC Bioinformatics* 2005; 6:62.
- [15] Pant D, Keefer CL. Expression of Pluripotency-Related Genes during Bovine Inner Cell Mass Explant Culture. *Cloning and Stem Cells* 2009; 11: 355–65.
- [16] Maruotti J, Muñoz M, Degrelle S, Gómez H, Louet C, Monforte CD, Longchamp PH, Brochard V, Hue I, Caamaño JN, Jouneau A. Efficient derivation of bovine embryonic stem cells needs more than active core pluripotency factors. *Mol Reprod Dev* 2012; 79:461-77.
- [17] Keramari M, Razavi J, Ingman KA, Patsch C, Edenhofer F, Ward CM, Kimber SJ. Sox 2 is essential for formation of trophectoderm in the preimplantation embryos. *Plos One* 2010; 5:e 13952.
- [18] Puy L, Chuva de Souza Lopes SM, Haagsman PH, Roelen, BAJ. Analysis of co-expression of OCT4, NANOG and SOX2 in pluripotent cells of the porcine embryo, *in vivo* and *in vitro*. *Theriogenology* 2011; 75:513-26.

- [19] Dravid G, Ye Z, Hammond H, Chen G, Pyle A, Donovan P, Yu X, Cheng L. Defining the role of Wnt/beta-catenin signaling in the survival proliferation and self renew of human embryonic stem cell. *Stem Cells* 2005; 23:1489-501.
- [20] Sato N, Meijer L, Skaltsounis L, Greengard P, Brivanlou AH. Maintenance of pluripotency in human and mouse embryonic stem cells through activation of Wnt signaling by a pharmacological GSK-3-specific inhibitor. *Nat Med* 2004; 10:55-63.
- [21] Matsuda T, Nakamura T, Nakao K, Arai T, Katsuki M, Heike T, Yokota T. STAT 3 activation is sufficient to maintain na undifferentiated state of mouse embryonic stem cells. *J.Europ Mol Biol Org* 1999; 18:4261-269.
- [22] Eckert J, Niemann H. mRNA expression of leukaemia inhibitory factor (LIF) and its receptor subunits glycoprotein 130 and LIF receptor-beta in bovine embryos derived in vitro or in vivo. *Mol Hum Reprod* 1998; 4:957–65.
- [23] Rodríguez A, De Frutos C, Díez C, Caamaño JN, Facal N, Duque P, García-Ochoa C, Gomés E. Effects human versus mouse leukemia inhibitory factor on the in vitro development of bovine embryos. *Theriogenology* 2007; 67:1092-95.
- [24] Veljsted M, Avery B, Gjørret, JO, Maddox-Hyttel P. Effect of leukemia inhibitory factor (LIF) on in vitro produced bovine embryos and their outgrowth colonies. *Mol Reprod Dev* 2005; 70:445-54.
- [25] Saito S, Sawai K, Ugai H, Moriyasu S, Minamihashi A, Yanamoto Y, Hirayama H, Kageyama S. Generation of cloned calves and transgenic chimeric embryos from bovine embryonic stem-like cells. *Bioch Bioph Res Comm* 2003; 309:104-13.
- [26] Palmqvist L, Glover CH, Hsu L, Lu M, Bossen B, Piret JM, Humphries RK; Helgason CD. Correlation of murine embryonic stem cell gene expression profiles with functional measures of pluripotency. *Stem cells* 2005; 23:663-680.

[27] Berg DK, Van Leeuwen J, Beaumont S, Berg M, Pfeffer PL. Embryo loss in cattle between 7 and 16 of pregnancy. *Theriogenology* 2010; 73:250-60.

[28] Maddox-Hyttel P, Alexopoulos NI, Vatja G, Lewis I, Rogers P, Cann L; Callesen H, Tveden-Nyborg P, Trounson A. Immunohistochemical and ultrastructural characterization of the initial post-hatching development of bovine embryos. *Reproduction* 2003; 125:607-23.

[29] Chen LR, Shiue YL, Bertolini L, Medrano JF, Bon Durant RH, Anderson GB. Establishment of pluripotent cell lines from porcine preimplantation embryos. *Theriogenology* 1999; 52:195-212.

[30] Brons IG, Smithers LE, Trotter MW, Rugg-Gunn P, Sun B, Chuva de Sousa Lopes SM, Howlett SK, Clarkson A, Ahrlund-Richter L, Pederson RA, Vallier L. Derivation of pluripotent epiblasto stem cells from mammalian embryos. *Nature* 2007; 448:191-95.

CAPÍTULO III

“Trabalho será enviado para a revista *Animal Reproduction Science*”

GBX2 é um importante marcador de pluripotência em embriões bovinos

Resumo

Pluripotência é a capacidade que as células da MCI, epiblasto e células tronco embrionárias têm de originar tecidos derivados da endoderme, mesoderme e ectoderme. Nos animais domésticos, os mecanismos moleculares que regulam a pluripotência não estão completamente definidos e os marcadores de

pluripotência das espécies humana e murina não são indicadores confiáveis em bovinos por serem expressos também no trofoblasto. Assim sendo, o objetivo deste trabalho foi avaliar o padrão de expressão do GBX2, gene pouco estudado e sem relatos na espécie bovina, com o intuito de avaliar se esse marcador é expresso unicamente em células pluripotentes. O RNA foi extraído de embriões em cada fase do desenvolvimento embrionário (n=7) e da massa celular interna (MCI) e epiblasto isolados de 20 embriões por imunocirurgia. A expressão do mRNA foi obtida por transcriptase reversa seguida da reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-qPCR), quantificada pelo método da curva padrão e normalizada pela média geométrica de GAPDH, YWHAZ e SDHA. Não foi observado diferença significativa na expressão relativa de mRNA de GBX2 entre blastocistos (E7) e blastocistos eclodidos (E10) ($P>0,05$). Comparando-se o nível relativo de mRNA de GBX2 entre blastocistos (E7) e MCI e blastocisto eclodido (E10) e epiblasto não foi detectada diferença ($P>0,05$), sendo que MCI e epiblasto corresponderam a aproximadamente 90% da expressão observada nos embriões em suas respectivas fases de desenvolvimento. Conclui-se que o nível de mRNA de GBX2 se mantém constante em blastocistos bovinos produzidos *in vitro*, com expressão elevada em células pluripotentes.

Palavras chave: expressão gênica, mRNA, embriões bovinos, qPCR

1. Introdução

Pluripotência é um estado transitório durante o desenvolvimento embrionário em que as células permanecem indiferenciadas com potencial para originar tecidos derivados da endoderme, mesoderme e ectoderme (Friel et al.,

2005; Yu et al., 2006). Em blastocistos, essas células estão presentes na MCI e no epiblasto (Maddox Hyttel et al., 2003, Degrelle et al., 2005; Berg et al., 2011). A pluripotência pode ser perpetuada *in vitro*, desde que condições de cultivo adequadas impeçam a diferenciação celular (Boyer et al., 2006).

Diferenças marcantes têm sido relatadas com relação à expressão dos fatores determinantes de pluripotência entre animais domésticos e camundongos. OCT4, NANOG e SOX2, principais reguladores de células pluripotentes murinas, são expressos na MCI, epiblasto e trofoblasto de embriões bovinos (Degrelle et al., 2005, Khan et al., 2012). Este padrão de expressão gênica divergente está relacionado a diferenças no desenvolvimento embrionário inicial. Bovinos apresentam um período extenso de alongação e proliferação do trofoblasto antes da implantação, o que resulta de uma expressão gênica diferenciada, inclusive daqueles genes considerados específicos da MCI (Kirchoff et al., 2000, Degrelle et al., 2005; Berg et al., 2011).

Pesquisas com o objetivo de identificar genes expressos unicamente em células pluripotentes bovinas é importante para que as células tronco embrionárias sejam caracterizadas corretamente, sendo este um dos entraves para o estabelecimento desta linhagem celular na espécie bovina. Como as células tronco embrionárias são derivadas da MCI e do epiblasto, o ideal seria que os marcadores de pluripotência fossem estudados primeiramente em embriões pré-implantação (Keefer et al., 2007).

Com os avanços na biologia de células tronco embrionárias humanas e murinas, novos marcadores de pluripotência foram identificados (Tanaka et al., 2002, Palmqvist et al.). O GBX2 (“gastrulation brain homeobox 2”), fator de

transcrição presente na MCI de blastocistos murinos e no desenvolvimento do sistema nervoso (Champman et al., 1999) foi um dos genes estudado por Palmqvist et al. (2005) e considerado um adequado marcador de pluripotência em camundongos

Como, na espécie bovina, esse gene ainda não foi estudado, o objetivo deste trabalho foi avaliar o padrão de expressão do GBX2 em embriões bovinos pré-implantação produzidos *in vitro*, com o intuito de avaliar se esse marcador é expresso unicamente em células pluripotentes.

2. Material e Métodos

Todos os reagentes foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, USA) a não ser que outra fonte seja citada.

2.1 Produção de embriões *in vitro*

Os folículos foram aspirados de ovários de abatedouro e os COCs maturados por 24 horas em TCM 199 (GIBCO, Grand Island, NY, USA) acrescido de 10% SFB (GIBCO), 0,2 mM de piruvato de sódio, 5µg/mL de FSH (Folltropin®, Bioniche Animal Health, Belleville, Ont, Canada), 50 µg/mL de LH (Lutropin-V®, Bioniche Animal Health, Belleville, Ont, Canada), 100 µg/mL de estreptomicina e 100 UI/mL de penicilina (GIBCO) a temperatura de 38,5 ° C e atmosfera de 5% de CO₂ em ar.

Após a descongelação, os espermatozoides foram selecionados por gradiente de percoll de 45% e 90% e a concentração foi ajustada para 2×10^6 espermatozoides/mL. Os gametas foram cultivados em meio HTF (Irvine Scientific, Santa Ana, USA) acrescido de 5mg/mL de BSA; 0,2mM de piruvato, 30µg/mL de heparina, 18µM de penicilamina, 10µM de hipotaurina, 1,8µM de epinefrina, 100mg/mL de estreptomicina e 100UI/mL de penicilina, sendo cultivados nas mesmas condições da maturação *in vitro*.

Os possíveis zigotos foram desnudados e cultivados em meio SOFaaci acrescido de 2,7 mM de mio-inositol, 1 mM de piruvato de sódio, 2 mM de glutamina, 5% de SFB, 5 mg/mL de BSA e penicilina/estreptomicina em atmosfera de 5% de CO₂, 5% O₂ e 90% N₂. Uma parte dos embriões foi cultivada por sete dias e outra parte por dez dias, com substituição do meio no sétimo dia.

2.2 Isolamento da MCI e do epiblasto

A zona pelúcida foi removida com 4mg/mL de pronase. Em embriões eclodidos, essa etapa não foi executada. Os embriões foram lavados e incubados por 40 minutos a 38,5⁰C com anticorpo anti-albumina bovina (Sigma, B1520) diluído 1:20 em meio SOFaaci . Após serem lavados, a lise do trofoblasto foi induzida, incubando-os com complemento de coelho (Sigma, S7764) diluído 1:20 em SOFaaci a 38,5⁰C por 40 minutos. Em seguida, os embriões foram lavados e a MCI liberada das células lisadas do trofoblasto pela passagem pelo lúmen estreito de pipeta de vidro.

2.3 Extração de RNA

As extrações de RNA foram realizadas em grupos de blastocistos E7 e blastocistos eclodidos E10 (n=7) e em grupos de células da MCI e do epiblasto isolados de 20 embriões por imunocirurgia. Foi utilizado o RNeasy Micro Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA), seguindo as instruções do fabricante. O RNA foi tratado com DNase para remover o DNA contaminante antes de ser realizada a transcriptase reversa.

2.4. Transcriptase reversa e reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-qPCR)

A transcriptase reversa Superscript III (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) foi utilizada para sintetizar o DNA complementar (cDNA) utilizando *primers random* como iniciadores e seguindo as instruções do fabricante. A reação para a PCR em tempo real foi composta de 5µL de água livre de nucleases; 10 µL de Go taq qPCR Master Mix (Promega, MA, USA); 0,2µM de *primer sense*; 0,2µM de *primer antisense* (Tabela 1); 0,2 µL de *reference dye* (Promega) e 4µL de amostra de cDNA que correspondeu a sete blastocistos (E7), sete blastocistos eclodidos (E10), MCI isoladas de 20 blastocistos (E7) e epiblastos isolados de 20 blastocistos eclodidos (E10). Os genes transcritos foram expressos por PCR em tempo real usando um 7300 Real Time PCR System (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA). Como controle endógeno, foram utilizados os genes YWHAZ, SDHA e GAPDH conforme Goosens et al. (2005), e, como controle negativo, foi adicionado água livre de nucleases.

As reações de quantificação de cada gene alvo e controles endógenos foram realizadas em duplicata para cada amostra de cDNA , sendo repetidas cinco vezes. Os *slopes* da curva padrão variaram de -3,4 a -3,5, o que corresponde a uma eficiência de 93 a 96%; o coeficiente de correlação (R^2) foi de 0,99. A quantificação relativa da expressão gênica foi realizada pelo método da curva padrão [14] e o fator de normalização foi obtido pela média geométrica dos genes YWHAZ, SDHA e GAPDH [13]. A especificidade da amplificação gênica foi confirmada para os cinco pares de primers (Tabela 1) por meio da análise da curva de *Melting* e da eletroforese. As reações de todos os pares de *primers* apresentaram curva de *Melting* com pico único e apenas uma banda de tamanho esperado no gel de agarose, confirmando a ausência de dímeros de *primers*.

O gene específico da linhagem trofoblástica, CDX2, foi utilizado para avaliar se as células da MCI e epiblasto foram contaminadas com células do trofoblasto.

TABELA 1. Sequência de primers utilizados na qPCR

GENE	SEQUÊNCIA DO PRIMER	TAMANHO DO PRODUTO
GBX2	F: 5' GCAAGGGAAAGACGAGTCAA3 R: 5'TCAGATTGTCATCCGAGCTG3'	127 pb
GAPDH	F: 5'-TTCAACGGCACAGTCAAGG-3' R: 5'-ACATACTCAGCACCAGCATCAC-3'	119 pb
SDHA	F: 5'-GCAGAACCTGATGCTTTGTG-3' R: 5'CGTAGGAGAGCGTGTGCTT-3'	180 pb
YWHAZ	F: 5'-GCATCCCACAGACTATTTCC-3' R: 5'-GCAAAGACAATGACAGACCA-3'	120 pb
CDX2	F: 5'CTCCTGGACAAGGACGTGAG3' R: 5'GGGCTGACGAAGTTCTG3'	110 pb

2.5 Delineamento Experimental

O gene alvo GBX2, os três genes referência e o CDX2 foram expressos em 4 grupos:

- Blastocistos com sete dias de desenvolvimento *in vitro*
- Células da MCI de blastocistos com sete dias de desenvolvimento *in vitro*
- Blastocistos com dez dias de desenvolvimento *in vitro*
- Células do epiblasto de blastocistos com dez dias de desenvolvimento *in vitro*

Durante o experimento foram realizadas cinco replicatas. Em cada replicata, o gene alvo, os genes referência e o CDX2 foram expressos a partir da mesma amostra de cDNA obtida de cada grupo estudado.

2.6 Análise estatística

Os dados de 5 replicatas foram analisados por Análise de Variância (ANOVA) seguido de múltiplas comparações, aos pares, pelo teste de Tukey. O nível de significância foi de 5%.

3. Resultados

Não foi observado diferença significativa na expressão relativa de mRNA de GBX2 entre blastocistos (E7) e blastocistos eclodidos (E10) ($P > 0,05$). Comparando-se o nível relativo de mRNA de GBX2 entre blastocistos (E7) e MCI e blastocisto eclodido (E10) e epiblasto não foi detectada diferença ($P > 0,05$),

sendo que MCI e epiblasto corresponderam a aproximadamente 90% da expressão observada nos embriões em suas respectivas fases de desenvolvimento (Fig 1).

O mRNA de CDX2 esteve abaixo dos limites de detecção na MCI e epiblasto, confirmando que não houve contaminação com células do trofoblasto.

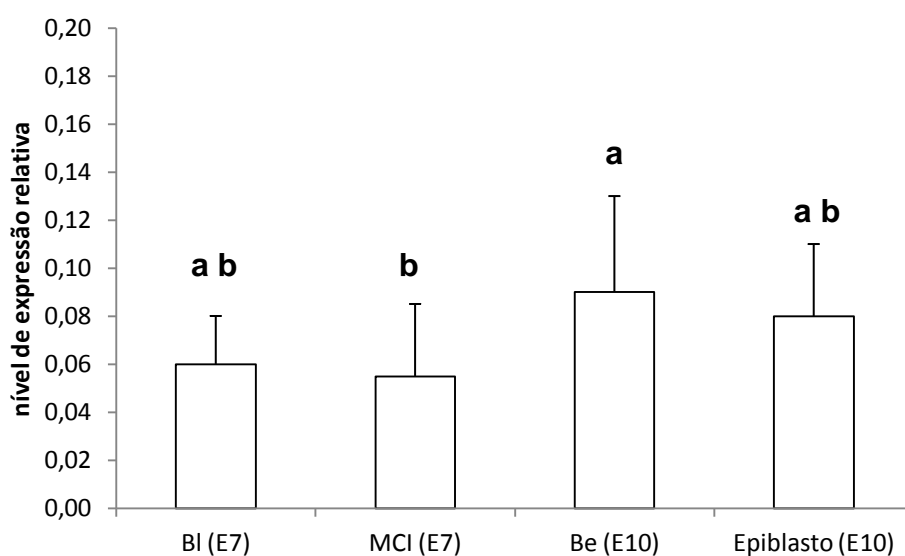


Fig 1. Análise quantitativa por PCR em tempo real do nível relativo da expressão de mRNA de GBX 2 em blastocistos BI (E7), MCI (E7), blastocistos eclodidos Be (E10) e epiblasto (E10). Letras diferentes acima das barras verticais diferem estatisticamente ($p < 0,05$).

4. Discussão

Enquanto a expressão do mRNA e proteína de OCT 4 foi relatada no trofoblasto de ruminantes (bovinos, caprinos) e suínos (Kirchhof et al., 2000; He et al., 2006), Kurosaka et al. (2004) a detectaram apenas na MCI. Degrelle et al.

(2005), relataram transcritos de OCT4 no trofoblasto de embriões bovinos em todas as fases de desenvolvimento avaliadas, esféricos (E7), ovóides (E12), tubular (E15) e filamentar (E17).

A atividade da fosfatase alcalina, bastante utilizada para avaliar a indiferenciação de células tronco embrionárias, apresentou relatos contraditórios em bovinos. Vejlsted et al. (2005) relataram que as células do epiblasto bovino não apresentaram atividade de fosfatase alcalina, a qual foi detectada unicamente em células do trofoblasto por Edwards et al. (2003) e Maddox-Hyttel et al. (2003).

O mesmo foi observado com os antígenos embrionários estágio específico. Militapova et al. (2001) relataram forte expressão de SSEA 1, SSEA3 e SSEA4 em células tronco derivadas de embriões bovinos. Esses dados concordaram parcialmente com os encontrados por Saito et al.(2003), os quais observaram expressão de SSEA1, mas não de SSEA 3 e SSEA4 e com os de Muñoz et al. (2008), segundo os quais houve expressão de SSEA4, mas não de SSEA1.

Estes relatos reforçam a necessidade de estudos sobre outros marcadores, que realmente se expressem apenas em células pluripotentes. Com este estudo, foi comprovado que o mRNA de GBX2 foi restrito à MCI e epiblasto a partir de embriões com sete dias de desenvolvimento *in vitro*.

Champman et al. (1997) relataram uma queda na transcrição do mRNA de GBX2 após a diferenciação *in vitro* de células pluripotentes assim como a expressão na MCI de blastocistos *in vivo*.

Da mesma forma, Palmqvist et al. (2005) relataram que os níveis de mRNA de GBX2 diminuíram significativamente em células tronco embrionárias

murinas induzidas à diferenciação 18 horas após a retirada da LIF do meio de cultivo, sendo considerado bom marcador de pluripotência.

Trabalhos recentes têm demonstrado a tendência dos marcadores de pluripotência se tornarem restritos à MCI apenas em uma fase mais tardia do desenvolvimento do blastocisto (Degrelle et al., 2005, Khan et al., 2012) quando, segundo Maddox Hyttel et al. (2003), a MCI iniciou sua diferenciação em epiblasto e hipoblasto.

Entretanto, o mRNA de GBX2 não compartilhou esse padrão de expressão, uma vez que a expressão foi praticamente restrita à MCI e epiblasto de blastocistos com sete e dez dias de desenvolvimento mantendo o mesmo nível de transcrição relativa.

GBX2 foi identificado como um alvo do STAT3, sendo suficiente para sustentar a autorrenovação de células tronco embrionárias murinas na ausência de LIF (Tai e Ying, 2013).

Em camundongos, a via Jak-STAT é estimulada pelo LIF, que induz a ativação dos fatores de transcrição STAT3 e STAT1, responsáveis por manter a autorrenovação das células tronco (Matsuda et al., 1999; Davey et al., 2007). Além do mais, foi revelado que a ativação insuficiente desta via restringiu a aquisição da pluripotência em células tronco murinas (Yang et al., 2010).

Ativação fraca de STAT3 e ausência de resposta a LIF são características compartilhadas por células tronco derivadas de embriões humanos e de embriões murinos pós-implantação (Tesar et al., 2007). Da mesma forma, a importância desta via na manutenção da pluripotência em bovinos é discutível, uma vez que estudos realizados por Keefer et al. (2007) demonstraram que células da MCI de

blastocistos bovinos apresentavam receptores para LIF e Vejlsted et al. (2005) demonstraram um efeito deletério da adição de LIF ao cultivo de CTE em bovinos.

Entretanto, associando os resultados de Tai e Ying (2013) aos apresentados neste trabalho, pode-se inferir que essa via parece estar ativa em embriões bovinos pré-implantação uma vez que GBX2, alvo de STAT3, apresentou transcrição constante e praticamente restrita às células pluripotentes.

5. Conclusão

Com este trabalho, conclui-se que o nível de mRNA de GBX2 se mantém constante em blastocistos bovinos produzidos *in vitro*, com alta expressão em células pluripotentes.

Agradecimentos

Este trabalho foi financiado pela Fapesp.(Processos 2010/17250-1 e 2010/00065-7

Referências

BERG, D. K.; SMITH, C. S.; PEARTON,D.J.; WELLS, D. N.; BROADHURTS, R.; DONNISON, M. Trophectoderm lineage determination in cattle. Cell, v. 20, p. 244-255, 2011

CHAMPMAN, G.; REMISZEWSKI, G.C.; WEBB,G.C.; SCHULZ, T.C.; BOTTEMA, C.D.K.; RATHJEN, P.D. The mouse homeobox gene, GBX2: Genomic Organization and expression in pluripotent cells in vitro and in vivo.

- DEGRELLE, S.A.; CAMPION, E.; CABAU, C.; PIUMI, F.; REINAUD, P. RICHARD, C.; RENARD, J.; HUE, I. Molecular evidence for a critical in mural trophoblast development in bovine blastocysts. *Developmental Biology*, v.288, p. 448-460, 2005.
- EDWARDS, J. L.; POWELL, A. M.; REXROAD, C.E. Alkaline phosphatase activity in bovine oocytes and preimplantation embryos as affected by removal of the zona pellucida and culture medium constituents. *Reproduction, Fertility and Development*, v. 15, p. 285-292, 2003.
- HE, S.; PANT, D.; SCHIFFMACHER, A.; BISCHOFF, S.; MELICAN, D.; GAVIN, W.; KEEFER, C. Developmental expression of pluripotency determining factors in caprine embryos: novel pattern of nanog protein localization in the nucleolus *Molecular Reproduction Development*, v. 73, p. 1512-1522, 2006.
- GOOSSENS, K.; POUCHE, M. V.; SOOM, A,N,; VANDESOMPELE, A. Z.; PEELMAN, L. J. Selection of reference genes for quantitative real-time PCR in bovine preimplantation embryos. *BMC Developmental Biology*, v. 5:27, p. 1-9, 2005.
- KEEFER, C.L.; PANT, D.; BLOMBERG, N.C.; TALBOT, N.C. Challenges and prospects for the establishment of embryonic stem cell lines of domesticated ungulates. *Animal Reproduction Science*, v. 98, p. 147-168, 2007.
- KHAN, D. R.; DUBE, D.; GALL, L.; PEYNOT, N.; RUFFINI, S.; LAFFONT, L.; LE, BOURHIS, D.; DEGRELLE, S.; JOUNEAU, A.; DURANTHON, V. Expression of pluripotency master regulators during two key developmental transitions: EGA and early lineage specification in the bovine embryo. *Plos One*, v. 7, e 34110, 2012.
- KIRCHOFF, N.; CARNWATH, J. W.; LEMME, E.; ANASTASSIADIS, K.; SCHOLER, H.; NIEMANN, H. Expression patern of Oct-4 in preimplantation embryos of different species. *Biology Reproduction*, v. 63, p. 1698-1705, 2000.
- KUROSAKA,S.; ECKARDT,S.; MCLAUGHLIN, K. J. Pluripotent lineage definition in bovine embyos by OCT4 transcript localization. *Biology Reproduction*, v. 71,p. 1578-1582, 2004.
- LARIANOV, A.; KRAUSE, A.; MILLER, W. A standard curve based method for relative real time PCR data processing. *BMC Bioinformatics*, v. 6:62, . p. 1-16, 2005.
- MADDOX-HYTTEL, P.; ALEXOPOULOS, N.I.; VATJA, G.; LEWIS, I.; ROGERS, P.; CANN, L.; CALLESEN, H.; TVEDEN-NYBORG, P.; TROUNSON, A.

- Immunohistochemical and ultrastructural characterization of the initial post-hatching development of bovine embryos. *Reproduction*, v. 125, p. 607-623, 2003.
- MATSUDA, T.; NAKAMURA, T.; NAKAO, K.; ARAI, T.; KATSUKI, M.; HEIKE, T.; YOKOTA, T. STAT 3 activation is sufficient to maintain an undifferentiated state of mouse embryonic stem cells. *European Molecular Biology Organization Journal*, v. 18, p. 4261-4269, 1999.
- MITALIPOVA, N.; BEYHAN, Z.; FIRST, N. L. Pluripotency of bovine embryonic cell line derived from precompacting embryos. *Cloning*, v. 3, p. 59-67, 2001.
- MUÑOZ, M.; RODRÍGUEZ, C.; DE FRUTOS, C.; CAAMAÑO, J.N.; DÍEZ, C.; FACAL, N.; GÓMEZ, E. Conventional pluripotency markers are unspecific for bovine embryonic-derived cell-lines. *Theriogenology*, v. 69, p. 1159-1164, 2008.
- PALMQVIST, L.; GLOVER, C. H.; HSU, L.; LU, M.; BOSSEN, B.; PIRET, J.M.; HUMPHRIES, R. K.; HELGASON, C. D. Correlation of murine embryonic stem cell gene expression profiles with functional measures of pluripotency. *Stem cells*, v. 23, p. 663-680.
- SAITO, S.; SAWAI, K.; UGAI, H.; MORIYASU, S.; MINAMIHASHI, A.; YANAMOTO, Y.; HIRAYAMA, H.; KAGEYAMA, S. Generation of cloned calves and transgenic chimeric embryos from bovine embryonic stem-like cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 309, p. 104-113, 2003.
- TAI, C.; YING, Q. Gbx2, a LIF/STAT3 target, promotes reprogramming to and retention of the pluripotent ground state. *Journal of Cell Science*, v. 126, p. 1093-1098, 2013.
- TANAKA, T. S.; KUNATH, T.; KIMBER, W. L.; JARADAT, S. A.; STAGG, C. A.; USUDA, M.; YOKOTA, T.; NIWA, H.; ROSSANT, J.; KO, M. S. H. *Genome Research*, v. 12, p. 1921-1928, 2002.
- TESAR, P. J.; CHENOWETH, J. G.; BROOK, F. A.; DAVIES, T. J.; EVANS, E. P.; MACK, D. L.; GARDNER, R. L.; MCKAY, R.D. New cell lines from mouse epiblast share defining features with human embryonic stem cells. *Nature*, v. 448, p. 196-199, 2007.
- VELJSTED, M.; AVERY, B.; GJORRET, J.O.; MADDOX-HYTTEL, P. Effect of leukemia inhibitory factor (LIF) on in vitro produced bovine embryos and their outgrowth colonies. *Molecular Reproduction Development*, v. 70, p. 445-454, 2005.

YANG, J.; VAN OOSTEN, A. L.; THEUNISSEN, T. W.; GUO, G.; SILVA, J. C.; SMITH, A. Stat3 activation is limiting for reprogramming to ground state pluripotency. *Cell Stem Cell*, v. 7, p. 319-328, 2010.

CAPÍTULO IV

CONSIDERAÇÕES GERAIS

1. Os genes SOX2 e STAT3 apresentam padrão de expressão similar nas células da MCI e do epiblasto de blastocistos (E7) e blastocistos eclodidos (E10).
2. O gene GBX2 demonstra um padrão de expressão divergente quando comparado ao de SOX2 e STAT3, pois o nível do mRNA se mantém constante durante o desenvolvimento do blastocisto.
3. Levando em consideração as características moleculares do epiblasto, a derivação de células tronco embrionária bovinas é mais eficiente a partir de embriões com dez dias de desenvolvimento *in vitro*.

CONCLUSÃO

- Com o desenvolvimento do blastocisto, há a tendência do aumento dos níveis de mRNA de STAT3 e SOX2 nas células pluripotentes do epiblasto.
- O nível de mRNA de GBX2 se mantém constante em blastocistos bovinos produzidos *in vitro*, com alta expressão em células pluripotentes.

REFERÊNCIAS

AVVILION, A.A.; NICOLIS, S.K.; PEVNY, L.H.; PEREZ, L.; VIVIAN, N. LOVELL-BADGE, R. Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX 2 function. **Genes Development**, v. 17, p. 126-140, 2003.

BERG, D. K.; SMITH, C. S.; PEARTON, D.J.; WELLS, D. N.; BROADHURTS, R.; DONNISON, M. Trophectoderm lineage determination in cattle. **Cell**, v. 20, p. 244-255, 2011

BERG, D. K.; VAN LEEUWEN, J.; BEAUMONT, S.; BERG, M.; PFEFFER, P. L. Embryo loss in cattle between 7 and 16 of pregnancy. **Theriogenology**, v. 73, p. 250-260, 2010.

BOURILLOT, P.Y.; AKSOY, I.; SCHREIBER, V.; WIANNY, F.; SCHULZ, H.; HUMMEL, O.; HUBNER, N; SAVATIER, P. Novel STAT3 target genes exert distinct roles in the inhibition of mesoderm and endoderm differentiation in cooperation with Nanog. **Stem Cells**, v. 27, p. 1760-1771.

BOYER, L.A.; MATHUR, D.; JAENISCH, R. Molecular control of pluripotency. **Current opinion in genetics & development**, v. 16, p. 455-462, 2006

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

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

CHAMPMAN, G.; REMISZEWSKI, G.C.; WEBB, G.C.; SCHULZ, T.C.; BOTTEMA, C.D.K.; RATHJEN, P.D. The mouse homeobox gene, GBX2: Genomic Organization and expression in pluripotent cells in vitro and in vivo. **Genomics**, v. 46, p. 223-233, 1997.

CHEN, L. R.; SHIUE, Y. L.; BERTOLINI, L.; MEDRANO, J. F.; BON DURANT, R. H.; ANDERSON, G.B. Establishment of pluripotent cell lines from porcine preimplantation embryos. **Theriogenology**, v. 52, p. 195-212, 1999.

CHEW, J.L.; LOH, Y.H.; ZHANG, W.; CHEN, X.; TAM, W.L.; YEAP, L.S.; LI, P.; ANG, Y.S.; LIM, B.; ROBSON, P.; NG, H.H. Reciprocal transcriptional regulation of Pou5f1 and Sox2 via the Oct4/Sox2 complex in embryonic stem cells. **Molecular Cell Biology**, v.25, p. 6031-6046.

DEGRELLE, S.A.; CAMPION, E.; CABAU, C.; PIUMI, F.; REINAUD, P. RICHARD, C.; RENARD, J.; HUE, I. Molecular evidence for a critical in mural trophoblast development in bovine blastocysts. **Developmental Biology**, v.288, p. 448-460, 2005.

DRAVID, G., YE, Z.; HAMMOND, H.; CHEN, G.; PYLE, A.; DONOVAN, P.; YU, X.; CHENG, L. Defining the role of Wnt/beta-catenin signaling in the survival proliferation and self renew of human embryonic stem cell. **Stem Cells**, v. 23, p. 1489-1501, 2005.

ECKERT, J.; NIEMANN, H. mRNA expression of leukaemia inhibitory factor (LIF) and its receptor subunits glycoprotein 130 and LIFreceptor-beta in bovine embryos derived in vitro or in vivo. **Molecular Human Reproduction**, v.4, p957-65, 1998.

EDWARDS, J. L.; POWELL, A. M.; REXROAD, C.E. Alkaline phosphatase activity in bovine oocytes and preimplantation embryos as affected by removal of the zona pellucida and culture medium constituents. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 15, p. 285-292, 2003.

ELLING, U.; KLASSEN, C.; EISENBERGER, T.; ANLAG, K.; TREIER, M. Murine inner cell mass-derived lineages depend on Sall4 function. **Proceedings of the National Academy Sciences**, v. 103, p. 16319-16324, 2006.

FRIEL, E.; SAR, S.; MEE, J.P. Embryonic stem cells: understanding their history, cell biology and signalling. **Advanced Drug Delivered Reviews**, v 57, p. 1894-1903, 2005.

GINIS, I.; LUO, Y.; MIURA, T.; THIES, S.; BRANDENBERGER, R.; GERECHT-NIR, S.; AMIT, M.; RAOS, M. S. Differences between human and mouse embryonic stem cells. **Developmental Biology**, v. 269, p. 360-380, 2004.

GJORRET, J. O.; MADDOX-HYTTEL, P. Attempts towards derivation and establishment of bovine embryonic stem cell-like cultures. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 17, p. 113-124, 2005.

GONG, G.; ROACH, M. L.; JIANG, L.; YANG, X.; TIAN, X. C. Culture conditions and enzymatic passaging of bovine esc-like cells. **Cellular Reprogramming**, v. 12, p. 1-10, 2010.

GOOSSENS, K.; POUCHE, M. V.; SOOM, A,N,; VANDESOMPELE, A. Z.; PEELMAN, L. J. Selection of reference genes for quantitative real-time PCR in bovine preimplantation embryos. **BMC Developmental Biology**, v. 5:27, p. 1-9, 2005.

HARRIS, D.; HUANG, B.; OBACK, B. Inhibition of MAP2K and GSK3 signaling promotes bovine blastocyst development and epiblast associated expression of pluripotency factor. [Epub ahead of print]; DOI: 10.1095/**Biology Reproduction**. 112.103390, 2013.

HATANO, S.; TADA, M.; KIMURA, H.; YAMAGUCHI, S.; KONO, T.; NAKANO, T.; SUEMORI, H.; NAKATSUJI, N.; TADA, T. Pluripotential competence of cells associated with Nanog activity. **Mechanisms of Development**, v. 122, p. 67-79, 2005.

HE, S.; PANT, D.; SCHIFFMACHER, A.; BISCHOFF, S.; MELICAN, D.; GAVIN, W.; KEEFER, C. Developmental expression of pluripotency determining factors in caprine embryos: novel pattern of nanog protein localization in the nucleolus **Molecular Reproduction Development**, v. 73, p. 1512-1522, 2006.

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

KEEFER, C.L.; PANT, D.; BLOMBERG, N.C.; TALBOT, N.C. Challenges and prospects for the establishment of embryonic stem cell lines of domesticated ungulates. **Animal Reproduction Science**, v. 98, p. 147-168, 2007.

KERAMARI, M.; RAZAVI, J.; INGMAN, K. A.; PATSCH, C.; EDENHOFER, F.; WARD, C. M.; KIMBER, S. J.; Sox 2 is essential for formation of trophectoderm in the preimplantation embryos. **Plos One**, v. 5, e 13952, 2010.

KHAN, D. R.; DUBE, D.; GALL, L.; PEYNOT, N.; RUFFINI, S.; LAFFONT, L.; LE, BOURHIS, D.; DEGRELLE, S.; JOUINEAU, A.; DURANTHON, V. Expression of pluripotency master regulators during two key developmental transitions: EGA and early lineage specification in the bovine embryo. **Plos One**, v. 7, e 34110, 2012.

KIRCHOFF, N.; CARNWATH, J. W.; LEMME, E.; anastassiadis, k.; scholer, h.; niemann, h. Expression pattern of Oct-4 in preimplantation embryos of different species. **Biology Reproduction**, v. 63, p. 1698-1705, 2000.

- KOUTSOURAKIS, M.; LANGEVELD, A.; PATIENT, R.; BEDDINGTON, R. GROSVELD, F. The transcription factor GATA6 is essential for early extraembryonic development. **Development**, v.126, p. 723-732
- KUIJ, E.W.; VAN TOL, L.T.; VAN DE VELDE, H.; WUBBOLTS,R.; WELLING, M.; GEIJSEN, N.; ROELEN, B.A. The roles of FGF and MAP Kinase signaling in the segregation of the epiblast and hypoblast cell lineages in bovine and human embryos. **Development**,v. 139, p. 871-882, 2012.
- KUIJK, E. W.; DU PUY, L.; VAN TOL, H. T. A.; OEI CHY, HAAGSMAN HP. Differences in early lineage segregation between mammals. **Developmental Dynamics** 237: 918–927, 2008.
- KUROSAKA,S.; ECKARDT,S.; MCLAUGHLIN, K. J. Pluripotent lineage definition in bovine embryos by OCT4 transcript localization. **Biology Reproduction**, v. 71,p. 1578-1582, 2004.
- LARIANOV, A.; KRAUSE, A.; MILLER, W. A standard curve based method for relative real time PCR data processing. **BMC Bioinformatics**, v. 6:62, p. 1-16, 2005.
- LI, J.; WANG, G.; ZHAO, Y.; ZHANG, H.; TAN, Z.; SONG, Z.; DING, M.; DENG, H. MEK/ERK signaling contributes to the maintenance of human embryonic stem cell self-renewal. **Differentiation**, v. 75, p. 299-307, 2007.
- LIN, S.C.; WANI,M.A.; WHITSETT, J.A.; WELLS, J.M. Klf5 regulates lineage formation in the pre implantation mouse embryo. **Development**, v. 137, p. 3953-3936, 2010.
- LIM, M. L.; VASSILIEV, I.; RICHINGS, N. M.; FIRSOVA, A. B.; ZHANG, C.; VERMA, P. J. A novel, efficient method to derive bovine and mouse embryonic stem cells with in vivo differentiation potential by treatment with 5-azacytidine. **Theriogenology**, v. 133, p. 133-142, 2011.
- LU, C.; YABUUCHI, A.; CHEN, L.; VISWANATHAN, S.; KIM, K.; DALEY, G.Q. Ras MAPK signaling promotes trophectoderm formation from embryonic stem cells and mouse embryos. **Nature Genetics**, v. 40, p. 921-926, 2008.
- MADDOX-HYTTEL, P.; ALEXOPOULOS, N.I.; VATJA, G.; LEWIS, I.; ROGERS, P.; CANN, L.; CALLESEN, H.; TVEDEN-NYBORG, P.; TROUNSON, A. Immunohistochemical and ultrastructural characterization of the initial post-hatching development of bovine embryos. **Reproduction**, v. 125, p. 607-623, 2003.

MADDOX-HYTTEL, P.; WOLF, X. A.; RASMUSSEN, M. A.; SCHAUSER, K. Embryonic stem cell in pig and cattle: derivation, culture and potential applications. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 34, p. 823-830, 2007.

MARUOTTI, J.; MUÑOZ, M.; DEGRELLE, S.; GÓMEZ, H.; LOUET, C.; MONFORTE, C. D.; LONGCHAMP, P. H.; BROCHARD, V.; HUE, I.; CAAMAÑO, J. N.; JOUNEAU, A. Efficient derivation of bovine embryonic stem cells needs more than active core pluripotency factors. **Molecular Reproduction and Development**, v. 79, p. 461-477, 2012.

MATSUDA, T.; NAKAMURA, T.; NAKAO, K.; ARAI, T.; KATSUKI, M.; HEIKE, T.; YOKOTA, T. STAT 3 activation is sufficient to maintain an undifferentiated state of mouse embryonic stem cells. **European Molecular Biology Organization Journal**, v. 18, p. 4261-4269, 1999.

MITALIPOVA, N.; BEYHAN, Z.; FIRST, N. L. pluripotency of bovine embryonic cell line derived from precompacting embryos. **Cloning**, v. 3, p. 59-67, 2001.

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

MUELLER, S.; PRELLE, K.; RIEGER, N.; PETZNEK, H.; LASSNIG, C.; LUKSCH, U.; AIGNER, B.; BAETSCHER, M.; WOLF, E.; MUELLER, M.; BREM, G. Chimeric pigs following blastocyst injection of transgenic porcine primordial germ cells. **Molecular Reproduction Development**, v. 54, p. 244-254, 1999.

MUÑOZ, M.; RODRÍGUEZ, C.; DE FRUTOS, C.; CAAMAÑO, J.N.; DÍEZ, C.; FACAL, N.; GÓMEZ, E. Conventional pluripotency markers are unspecific for bovine embryonic-derived cell-lines. **Theriogenology**, v. 69, p. 1159-1164, 2008.

NICHOLS, J.; ZEVNIK, B.; ANASTASSIADIS, K.; NIWA, H.; KLEWE-NEBENIUS, D.; CHAMBER, I.; SCHOLER, H.; SMITH, A. Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor OCT4. **Cell**, v. 95, p. 379-391, 1998.

NISHIOKA, N.; INOUE, K.; ADACHI, K.; KIYONARI, H.; OTA, M.; RALSTON, A.; YABUTA, N.; HIRAHARA, S.; STEPHENSON, R.O.; OGONUKI, N.; MAKITA, R.; KURIHARA, H. The Hippo signaling pathway components Lats and Yap pattern Tead4 activity to distinguish mouse trophectoderm from inner cell mass. **Developmental Cell**, v. 16, p. 398-410, 2009.

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

OZAWA, M.; SAKATANI, M.; HANKOWSKI, K.E.; TERADA, N.; DOBBS, K.B.; HANSEN, P.J. Importance of culture conditions during the morula to blastocysts period on capacity of inner cell mass cells of bovine blastocysts for establishment of self-renewing pluripotent cells. **Theriogenology**, v. 78, p. 1243-1251, 2012.

PALMIERI, S.L.; PETER, W.; HESS, H.; SHOLER, H.R. Oct4 transcription factor is differently expressed in the mouse embryo during establishment of the first two extraembryonic cell lineages involved in implantation. **Developmental Biology**, v. 166, p. 259-267, 1994.

PALMQVIST, L.; GLOVER, C. H.; HSU, L.; LU, M.; BOSSEN, B.; PIRET, J.M.; HUMPHRIES, R. K.; HELGASON, C. D. Correlation of murine embryonic stem cell gene expression profiles with functional measures of pluripotency. **Stem cells**, v. 23, p. 663-680, 2005.

PANT D, KEEFER CL. Expression of Pluripotency-Related Genes during Bovine Inner Cell Mass Explant Culture. *Cloning and Stem Cells* 11: 355–365, 2009.

PUY, L.; CHUVA DE SOUZA LOPES, S. M.; HAAGSMAN, P. H.; ROELEN, B. A. J. Analysis of co-expression of OCT4, NANOG and SOX2 in pluripotent cells of the porcine embryo, *in vivo* and *in vitro*. **Theriogenology**, v. 75, p. 513-526, 2011.

RODRIGUÉS, A.; DE FRUTOS, C.; DÍEZ, C.; CAAMAÑO, J. N.; FACAL, N.; DUQUE, P.; GARCÍA-OCHOA, C.; GOMÉS, E. Effects human versus mouse leukemia inhibitory factor on the *in vitro* development of bovine embryos. **Theriogenology**, v. 67, p. 1092-1095, 2007.

SAITO, S.; SAWAI, K.; UGAI, H.; MORIYASU, S.; MINAMIHASHI, A.; YANAMOTO, Y.; HIRAYAMA, H.; KAGEYAMA, S. Generation of cloned calves and transgenic chimeric embryos from bovine embryonic stem-like cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 309, p. 104-113, 2003.

SATO, N.; MEIJER, L.; SKALTSOUNIS, L.; GREENGARD, P.; BRIVANLOU, A. H. Maintenance of pluripotency in human and mouse embryonic stem cells through activation of Wnt signaling by a pharmacological GSK-3-specific inhibitor. **Nature Medicine**, v. 10, p. 55-63, 2004.

SILVA, J.; NICHOLS, J.; THEUNISSEN, T.W.; GUO, G.; VAN OOSTEN, A.L.; BARRANDON, O.; WRAY, J.; YANAMAKA, T. W.; CHAMBERS, I.; SMITH, A. Nanog is the gateway to the pluripotency ground state. **Cell**, v. 138, p. 722-737, 2009.

SMITH, A. G.; NICHOLS, J.; ROBERTSON, M.; RATHJEN, P. D. Differentiation inhibiting activity (DIA/LIF) and mouse development. **Developmental Biology**, v. 151, p. 339-351, 1992.

TAI, C.; YING, Q. Gbx2, a LIF/STAT3 target, promotes reprogramming to and retention of the pluripotent ground state. **Journal of Cell Science**, v. 126, p. 1093-1098, 2013.

TANAKA, T. S.; KUNATH, T.; KIMBER, W. L.; JARADAT, S. A.; STAGG, C. A.; USUDA, M.; YOKOTA, T.; NIWA, H.; ROSSANT, J.; KO, M. S. H. **Genome Research**, v. 12, p. 1921-1928, 2002.

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

VALLIER, L.; ALEXANDER, M.; PEDERSEN, R. A. Activin/nodal and FGF pathways cooperate to maintain pluripotency of human embryonic stem cells. **Journal Cell Science**, v. 118, p. 4495–509, 2005.

VELJSTED, M.; AVERY, B.; GJORRET, J.O.; MADDOX-HYTTEL, P. Effect of leukemia inhibitory factor (LIF) on in vitro produced bovine embryos and their outgrowth colonies. **Molecular Reproduction Development**, v. 70, p. 445-454, 2005.

VEJLSTED, M.; OFFENBERG, H.; THORUP, F.; MADDOX-HYTTEL, P. Confinement and clearance of Oct-4 in the porcine embryo at stereomicroscopically defined stages around gastrulation. **Molecular Reproduction Development**, v. 73, p. 709-718, 2006a.

VELJSTED, M. DU, Y.; VAJTA, G.; MADDOX-HYTTEL, P. Post-hatching development of the porcine and bovine embryos-defining criteria for expected development in vivo and in vitro. **Theriogenology**, v. 65, p. 153-165, 2006b.

ZHANG, J.; TAM, W.L.; TONG, G. K.; WU, Q.; CHAN, H. Y.; SOH, B. S.; LOU, Y.; YANG, J.; MA, Y.; CHAI, L.; NG, H. H.; LUFKIN, T. Sall 4 modulates embryonic

stem cell pluripotency and early embryonic development by the transcriptional regulation of Po5f1. **Nature Cell Biology**, v. 8, p. 1114-1123, 2006.

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

WU, Q.; CHEN, X.; ZHANG, J.; LOH, Y.H.; LOW, T.Y.; ZHANG, W.; SZE, S.K.; LIM, B.; NG, H. H. Sall 4 interacts with Nanog and co occupies Nanog genomic sites in embryonic stem cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, p. 24090-24094, 2006.

YANG, J.; VAN OOSTEN, A. L.; THEUNISSEN, T. W.; GUO, G.; SILVA, J. C.; SMITH, A. Stat3 activation is limiting for reprogramming to ground state pluripotency. **Cell Stem Cell**, v. 7, p. 319-328, 2010.

YANG, Q.E.; FIELDS, S.D.; ZHANG, K.; OZAWA, M.; JHONSON, S.E.; EALY, A.D. Fibroblast growth factor 2 promotes primitive endoderm development in bovine blastocysts outgrowths. **Biology Reproduction**, v. 85, p. 946-953, 2011.

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