

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CÂMPUS DE JABOTICABAL
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS**

**AVALIAÇÃO DO PROMOTOR OCT-4 DE EQUINOS EM UMA ABORDAGEM
TRANSGÊNICA EM CÉLULAS-TRONCO EMBRIONÁRIAS DE MURINOS**

**Fernanda da Silva Gonçalves
Médica Veterinária**

JABOTICABAL - SÃO PAULO - BRASIL

2010

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS DE JABOTICABAL
FACULDADE DE CIENCIAS AGRARIAS E VETERINARIAS**

**AVALIAÇÃO DO PROMOTOR OCT-4 DE EQUINOS EM UMA ABORDAGEM
TRANSGÊNICA EM CÉLULAS-TRONCO EMBRIONÁRIAS DE MURINOS**

Fernanda da Silva Gonçalves

**ORIENTADORA: Prof^a. Dr^a. Gisele Zoccal Mingoti
CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. Joaquim Mansano Garcia**

**Tese apresentada a Faculdade de Ciências Agrárias e
Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte
das exigências para a obtenção do título de DOUTOR EM
MEDICINA VETERINÁRIA – Área de Reprodução Animal.**

JABOTICABAL - SÃO PAULO - BRASIL

2010

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

FERNANDA DA SILVA GONÇALVES – Nasceu em Três Lagoas-MS em 29 de junho de 1977. Graduiu-se em Medicina Veterinária pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP – Câmpus de Jaboticabal em 2003. Durante a graduação realizou trabalho de iniciação científica na área de Medicina Veterinária Preventiva. Titulou-se Mestre pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP – Câmpus de Jaboticabal, curso de Pós-graduação em Medicina Veterinária, área de Reprodução Animal, em fevereiro de 2006, com a dissertação intitulada “Avaliação dos efeitos de antioxidantes adicionados ao meio de fecundação sobre a capacitação espermática, reação acrossomal, fertilização e desenvolvimento embrionário bovino *in vitro*”. Foi bolsista CNPq durante o mestrado.

Ingressou no doutorado em Medicina Veterinária, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP – Câmpus de Jaboticabal curso de Pós-graduação em Medicina Veterinária, área de Reprodução Animal, em março de 2006, sob a orientação da Prof^a. Dr^a. Gisele Zoccal Mingoti. Foi bolsista da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES. Entre o período de maio de 2008 a maio de 2009 realizou estágio de doutoramento no exterior (“sanduíche”), com o apoio da CAPES, pelo programa bolsas no exterior-PDEE, no “Roslin Institute”, Edimburgo, Escócia – Reino Unido sob a supervisão do Dr. Xavier Donadeu e Dr. Bruce Whitelaw, na área de biologia molecular e pluripotência/reprogramação celular em equinos.

“Sonhar, porque se desistimos disso apaga-se a última claridade e nada mais valerá a pena. Escapar, na liberdade do pensamento, desse espírito de manada que trabalha obstinadamente para nos enquadrar, seja lá no que for. E que o mínimo que a gente faça seja, a cada momento, o melhor que afinal se conseguiu fazer.”

Lya Luft - “Pensar é Transgredir”

Aos meus queridos pais,

Antônia Santa da Silva Gonçalves e

Sebastião Benedito Gonçalves

Pelo grande amor e pelo apoio para viver a cada caminhada, onde quer que eu
vá me dando a certeza de que nunca estarei só.

A minha irmã **Maria do Carmo** e cunhado **Marcelo** queridos e

As minhas adoráveis sobrinhas **Maria Fernanda e Maria Antônia**

por fazerem parte da minha vida e a tornarem tão especial.

A Deus, pela oportunidade de encontrar pessoas e caminhos tão especiais, que
me guiaram até aqui.

DEDICO com muito carinho

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, **Profª Drª Gisele Zoccal Mingoti**, por me dar a oportunidade de fazer o doutorado e me apoiar em todos os momentos dessa jornada. Muito obrigada, com muito carinho.

Ao Prof. Dr. **Joaquim Mansano Garcia** por me co-orientar nesse doutorado e grande auxílio para a realização desse trabalho.

À **Profª Drª Rosângela Zacarias Machado** pelo seu extremo apoio e incentivo para a realização desse doutorado.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)**, pelo apoio financeiro ao projeto de doutorado.

À **Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV), UNESP- Campus de Jaboticabal** pela oportunidade da realização do Doutorado.

À **seção de pós-graduação** da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV), UNESP- Jaboticabal, pelo auxílio.

Ao **Dr. Bruce Whitelaw** pela grande oportunidade e confiança que me forneceu para fazer parte de seu excelente grupo de pesquisa dentro do Instituto Roslin, estou-lhe muito, muito grata.

Ao **Dr. Xavier Donadeu** pelo acesso que me facilitou a uma pesquisa mais alargada e enriquecedora e pela sua crítica sempre tão atempada, como construtiva, bem-haja estou-lhe muito agradecida.

À **Drª. Alexandra Didomenico** pelo tempo que generosamente me dedicou, auxiliando em meu experimento e transmitindo-me os melhores e mais úteis ensinamentos, com paciência, carinho e confiança.

Ao **Dr. Simon Lilico** pelo tempo que me dedicou ajudando e me ensinando as técnicas de biologia molecular durante a elaboração desse experimento.

Ao **Prof. Dr. José Carlos Barbosa** pela realização da análise estatística deste trabalho.

À Doutoranda e amiga **Clara Slade** pela grande ajuda e incentivo na repetição desse experimento.

Aos meus grandes e amados amigos: **Maria Luísa de Cápuia, Sabryna Gouveia Calazans, Stael Pedroso, Simone Crestoni Fernandes, Elizabeth Schimit, Maria Eliane Vechetini, Ricardo Vasconcelos, Maria do Carmo Scalon Afonso, Rafael Costa Bermal, Daniela Aquino Chiari, Stéfano Chiari, Alisson Veríssimo, Gilberto Takashima, Márcio Sartório, Camila Baraldi** pelos especiais momentos de amizade, incentivo, carinho e confiança que me dedicam.

Ao meu querido amor **Diego Perelli** por seu carinho, apoio, companherismo que me vem dedicando.

Em especial aos meus queridos e novos amigos: **Eszter Varga, Hannauer Gárbor, Alexandros SykaKis, Jacob Lisakowski e Theodora Christidou** pelos ótimos momentos de descontração e carinho durante minha estadia em Edimburgo.

Aos meus colegas do Roslin Institute, Edimburgo, Escócia: **Chiara Sartori, Amandine Breton, Neil MacKenzie, Kate Walker, Daniela Gattegno, Charis Hoggs, Somayyeh Fahiminiya-Nadaf, Stephanie Schauer, Catalina Diaz, Gillian Parham, Douglas Vasey.**

À **Profª. Drª Maria Rita Pacheco** e à **Profª. Drª Isabel Cristina Boleli** por me permitir a experiência de lecionar em meu estágio docência e de entender a grandiosidade desta profissão.

A **todos os colegas, professores e funcionários** do Departamento de Reprodução Animal da FCAV-UNESP- Jaboticabal.

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram com incentivo, apoio e ajuda para que esse trabalho realiza-se.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS.....	xii
LISTA DE FIGURAS.....	xiii
RESUMO.....	18
ABSTRACT.....	19
1. INTRODUÇÃO.....	21
2. REVISÃO DE LITERATURA	23
2.1. Células Tronco e Medicina Regenerativa em Equinos.....	23
2.2. Células-Tronco Embrionária.....	24
2.3. Células-Tronco Pluripotentes Induzidas.....	26
2.4. Transferência Gênica.....	30
2.5. Clonagem Gênica.....	33
2.6. A Expressão do Oct-4.....	34
2.7. Vetores Lentivirais (Lentivetores).....	36
3. OBJETIVOS GERAIS E ESPECÍFICOS E HIPÓTESE.....	40
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	41
4.1. Construção dos vetores.....	41
4.1.1. Promotor Oct-4 de camundongo.....	41
4.1.2. Promotor Oct-4 de equino.....	42
4.2. Clonagem gênica.....	42
4.2.1. Transformação bacteriana.....	44
4.2.2.. Extração de DNA plasmídial de <i>Echerichia coli</i>	46
4.2.3. Determinação da concetração e grau de pureza do DNA.....	46
4.2.4. Identificação dos subclones.....	46
4.2.3. Sequenciamento.....	48
4.3. Cultivo de células-tronco embrionárias de murinos.....	49

4.4. Cultivo de fibroblasto embrionário murino.....	49
4.5. Transfecção de Células-Tronco embrionárias de murinos.....	50
4.5.1. Otimização da Transfecção.....	50
4.5.2. Transfecção transitória de CTE usando vetores plasmidiais sob o controle do promotor Oct-4 de camundongo e humano.....	51
4.5.3. Transfecções transitória e estável de CTE usando vetores plasmidiais sob o controle do promotor Oct-4 de equino.....	52
4.6. Formação de partículas virais.....	55
4.6.1. Semeadura das células HEK 293T (“human embryonic kidney”).....	55
4.6.2. Empacotamento dos vetores lentivirais (“packaging”).....	55
4.6.3. Titulação viral.....	56
4.7. Transdução das células-tronco embrionárias de murinos com vetores lentivirais.....	57
4.7.1. Lentivetores com Oct-4/GFP de camundongos e humanos.....	58
4.7.2. Lentivetores com Oct-4/GFP de equinos.....	59
4.8. Análise de microscopia.....	59
4.9. Análise pelo citômetro de fluxo.....	59
4.10. Análise estatística.....	60
5. RESULTADOS.....	61
5.1. Construção dos vetores plasmidiais e clonagem.....	61
5.2. Transfecção em Células-Tronco Embrionárias de Murinos.....	65
5.2.1 Otimização da Transfecção.....	65
5.2.2. Transfecção transitória de CTE usando vetores plasmídiais sob o controle do promotor Oct-4 de camundongo e humano.....	69
5.2.3. Transfecções transitória e estável de CTE usando vetores plasmídiais sob o controle do promotor Oct-4 de equino.....	71
5.3. Transdução em células-tronco embrionárias com os vetores recombinantes promotor mOCT e hOCT.....	76

5.4. Transdução em células-tronco embrionárias com os vetores recombinantes promotor ecOCT (m eq) e (heq).....	81
6. DISCUSSÃO.....	83
7.CONCLUSÕES.....	88
8. REFERÊNCIAS.....	89

LISTA DE TABELAS**Página**

Tabela 1. Percentagem de células GFP positivas 48 horas pós-transfecção em células-tronco embrionárias de murinos (CTE) e fibroblasto embrionário de murinos (FEM) pela citometria de fluxo.....	74
---	----

LISTA DE FIGURAS

Página

Figura 1. A) Diagrama do HIV-1 provírus e ORFs; B) Provírus integrado; C) Diagrama da partícula do virion maduro com proteínas e RNA (LEVER et al., 2004).....	39
Figura 2. Constituição do ligante acoplado ao plasmídeo receptor (pLZ2-EGFP). Em colorido sítios referentes as endonucleases de restrição: <i>Clal</i> , <i>HpaI</i> , <i>Sall</i> , <i>EcoRV</i> , <i>XhoI</i> e <i>BamH</i>	41
Figura 3. Esquema de clonagem dos três plasmídeo recombinantes: pLZ2-mOCT-EGFP, pLZ2-ecOCT-EGFP (m eq) e pLZ2-ecOCT-EGFP (h eq).....	45
Figura 4. Delineamento para otimização da transfecção em CTE de murinos.....	51
Figura 5. Delineamento da transfecção em CTE de murinos pelos vetores pLZ2-mOCT-EGFP e pLZ2-hOCT-EGFP.....	52
Figura 6. Delineamento da transfecção transitória e estável em CTE de murinos e FEM, pelos vetores pLZ2-mOCT-EGFP, pLZ2-hOCT-EFP, pLZ2-ecOCT-EFP(meq), pLZ2-ecOCT-EFP(heq).....	54
Figura 7. Esquema da transfecção em CTE de murinos usando os plasmídeos circular e lineralizado.....	54
Figura 8. Delineamento da transdução em CTE de murinos pelos vetores pLZ2-mOCT-EGFP e pLZ2-hOCT-EFP.....	57
Figura 9. Delineamento da transdução em CTE de murinos e FEM, pelos vetores pLZ2-ecOCT-EFP(meq) e pLZ2-ecOCT-EFP(heq).....	58
Figura 10. Eletroferograma em gel de agarose a 1% corado com “SYBR-safe® DNA gel strain” (Invitrogen), demonstrando a digestão resultante do vetor pLZ2-hOCT-EGFP (11.040 pb) pela enzima de restrição <i>EcoRV</i> (não digerido) e identificado pela ação da enzima de restrição <i>Sall</i>	61
Figura 11. Eletroferograma em gel de agarose a 1% corado com “SYBR-safe® DNA gel strain” (Invitrogen), demonstrando a digestão dos três clones positivos (1, 2 e 3) resultantes do vetor pLZ2-linker-EGFP (7.088 pb) pelas enzimas de restrição <i>EcoRV</i> e <i>Sall</i>	62

- Figura 12.** Eletroferograma em gel de agarose a 1% corado com “SYBR-safe® DNA gel strain” (Invitrogen), demonstrando a digestão de um clone do vetor recombinante pLZ2-mOCT-EGFP (8.989 pb) pela enzima de restrição *BamHI*..... 63
- Figura 13.** Eletroferograma em gel de agarose a 1% corado com “SYBR-safe® DNA gel strain” (Invitrogen), demonstrando avaliação do clone 1 para o vetor pLZ2-ecOCT-EGFP (meq); e dos clones 2 e 3 para o vetor pLZ2-ecOCT-EGFP (heq)..... 64
- Figura 14.** Transfecção transitória em CTE de murinos usando Fugene HD (Roche) com vetor pHS4 PGK-GFP..... 66
- Figura 15.** Transfecção transitória em CTE de murinos usando Lipofectamine 2000 (Invitrogen) com vetor PGK-GFP..... 67
- Figura 16.** Citometria de fluxo para direcionar a expressão do gene da GFP (CTE), mostrando a melhor taxa de expressão da GFP..... 68
- Figura 17.** Transfecção transitória em CTE de murinos usando Lipofectamine 2000 (Invitrogen) 3 µg DNA: 5 µL reagente: 1) Visualização das células GFP positivas 48 horas pós-transfecção em microscopia de epifluorescência. Aumento de 40x..... 70
- Figura 18.** Transfecção transitória em CTE de murinos usando Lipofectamine 2000 (Invitrogen) 3 µg DNA: 5 µL reagente. A) controle negativo (sem DNA e reagente), B) controle positivo PGK-EGFP, C) vetor pLZ2-ecOCT-EGFP (meq), D) vetor pLZ2-ecOCT-EGFP (heq), E) vetor pLZ2-mOCT-EGFP e F) vetor pLZ2-hOCT-EGFP..... 72
- Figura 19.** Citometria de fluxo para direcionar a expressão do gene da GFP (CTE). a) população de células negativas; b) população de células positivas para expressão da GFP. A) controle negativo (sem DNA e reagente), B) controle positivo (PGK-EGFP), C) vetor pLZ2-ecOCT-EGFP (meq), D) vetor pLZ2-ecOCT-EGFP (heq), E) vetor pLZ2-mOCT-EGFP, F) vetor pLZ2-hOCT-EGFP..... 73
- Figura 20.** Transfecção transitória em FEM usando Lipofectamine 2000 (Invitrogen) 3µg DNA: 3µL reagente. Controle positivo - pHS 4 PGK-EGFP; visualização das células GFP positivas 48 horas pós-transfecção em microscopia de epifluorescência. 40x. FEM (fibroblasto embrionário de murinos)..... 75
- Figura 21.** Transfecção estável em CTE de murinos usando Lipofectamine 2000 (Invitrogen) 3 µg DNA: 5 µL reagente. A) controle positivo (PGK-EGFP), B) vetor pLZ2-

hOCT-EGFP, C) vetor pLZ2-mOCT-EGFP, D) vetor pLZ2-ecOCT-EGFP (meq). Visualização das colônias Blastidina-resistentes GFP positivas 7 dias pós-transfecção em microscopia de epifluorescência. Aumento de 100x..... 75

Figura 22. Células tronco embrionárias de murinos 6 dias pós-transdução: A) lentivírus pLZ2-mOCT-EGFP, B) lentivírus pLZ2-hOCT-EGFP. Visualização das colônias resistente GFP positivas sob microscopia de epifluorescência. Aumento de 40x. Esquerda: fluorescência, direita: contraste de fase 77

Figura 23. CTE 7 dias pós-transdução: A e B) lentivírus pLZ2-hOCT-EGFP, C, D e E) lentivírus pLZ2-mOCT-EGFP. Visualização das colônias resistente GFP positivas em microscopia de epifluorescência. Aumento de 100x. Acima: fluorescência, abaixo: contraste de fase..... 78

Figura 24. CTE 8 dias pós-transdução: A) lentivírus pLZ2-hOCT-EGFP, B) lentivírus pLZ2-mOCT-EGFP. Visualização das colônias resistente GFP positivas em microscopia de epifluorescência. Aumento de 100x. Esquerda: fluorescência, direita: contraste de fase..... 79

Figura 25. Transfecção estável em CTE de murinos usando Lipofectamine 2000 (Invitrogen) 3 µg DNA : 5 µL reagente. A) controle negativo (sem reagente e DNA); B) controle positivo (PGK-EGFP); C) pLZ2-ecOCT-EGFP (meq); D) vetor pLZ2-ecOCT-EGFP (heq); E) pLZ2-mOCT-EGFP e F) vetor pLZ2-hOCT-EGFP. Aumento de 100x. Acima: fluorescência, abaixo: contraste de fase 80

Figura 26. CTE 6 dias após-transdução: A) controle (sem lentivírus), B) lentivírus pLZ2-ecOCT-EGFP (m eq). C) lentivírus pLZ2-ecOCT-EGFP (h eq). Visualização da expressão do GFP em microscopia de epifluorescência. Aumento de 40x. Esquerda: fluorescência, direita: contraste de fase..... 81

Figura 27. Fibroblasto embrionário murino 6 dias pós-transdução: A) lentivírus pLZ2-ecOCT-EGFP (meq). B) lentivírus pLZ2-ecOCT-EGFP (heq). Visualização da expressão do GFP em microscopia de epifluorescência. Aumento de 40x. Esquerda: fluorescência, direita: contraste de fase..... 82

ABREVIATURAS

Amp: Ampicilina

b-gal: b-Galactosidase bacteriana

Bsd: Blasticidina

CAT: Acetil-transferase

CM: Culture medium

Cos: Células Cos - linhagem celular (CV-1) usada para transfecção e clonagem.

c-Myc: Oncogene

CTE: Células-Tronco Embrionárias

ECAT 1, 15-1, 15-2 e 18: enhancer cloramphenicol acetiltransferase

ecOCT-meq: *eqqus caballus* Oct-4 promoter- mouse equivalent (promotor Oct-4 de eqüinos- sequencia camundongo equivalente)

ecOCT-heq: *eqqus caballus* Oct-4 promoter- human equivalent (promotor Oct-4 de equinos- sequencia humano equivalente)

ESG1: Embryonal stem cell-specific gene 1

Eras: Embryonic stem cell-expressed Ras

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMSO: Dimetilsulfóxido

DNA: Àcido desoxirribonucléico

DNMT3L: DNA (cytosine-5)-methyltransferase 3-like

Fbx15: proteína expressa em CTE indiferenciadas

FEM: Fibroblasto Embrionário Murino

FIV: Feline Immunodeficiency Virus (Vírus da Imunodeficiência Felina)

Fth17: H ferritin gene 17 (gene ferritina H 17)

GFP: Green fluorescence protein (Proteína fluorescente verde)

GDF3: Growth differentiation factor 3

Grb2: Growth factor receptor-bound protein 2

iPS: Induced pluripotent stem cells (Células tronco pluripotentes induzidas)

HEK-293T: Human embryonic kidney

HIV: Human Immunodeficiency Virus (Vírus da Imunodeficiência Humana)

hOCT: human Oct-4 promoter (promotor Oct-4 de humanos)

H-RasV12: Harvey rat sarcoma virus 12

Klf4: Kruppel-like factor 4 (gut) – é um gene humano

MCI: Massa celular interna

mL: Mililitros

mOCT: mouse Oct-4 promoter (promotor Oct-4 de camundongo)

LB: Luria Bertani

LIF: Leukemia Inhibitory Factor (Fator de Inibição de Leucemia)

LV: Lentivírus

Luc: Luciferase de vagalume

Oct3/4: Uma abreviação de “Octamer 4” – sinônimo POU5F1 (classe POU 5 homeobox 1) - fator de transcrição expressado em células tronco embrionárias.

SFB: Soro Fetal Bovino

Stat3: Signal transducer and activator of transcription 3

Stella: gene expresso em células germinativas primordiais.

Sox2: “SRY (Sex Determining Region Y)- box2” – fator de transcrição essencial para manter a auto-renovação de células indiferenciadas.

PBS: Phosphate-Buffered Saline

PCR: Reação em cadeia de polimerase

p.i: parte infectada

POU: POU class homeobox

psPAX2: vetor plasmidial

TCL1: T-cell leukemia/lymphoma protein 1

VSV-G: Vesicular Stomatitis Virus, que codifica a glicoproteína (G).

µg: Micro gramas

µL: Micro litros

RESUMO

O fator de transcrição Oct-4 é bem conservado entre as espécies e é conhecido por ser expresso em embriões e células-tronco embrionárias (CTE), sendo um importante marcador da pluripotência. Recentemente, foi relatado que a combinação de Oct-4 com três outros fatores de transcrição Klf-4, c-Myc e Sox2 foram capazes de reprogramar células somáticas a um estado indiferenciado pluripotente, chamadas células-tronco pluripotentes induzidas ("células iPS"), as quais apresentam várias das mesmas propriedades das CTE incluindo a pluripotência, auto-renovação e proliferação. O objetivo desse estudo foi avaliar a funcionalidade do promotor Oct-4 de eqüino em CTE de murinos. Três vetores plasmidiais expressando GFP ("green fluorescent protein") sob o controle do promotor Oct-4 de equinos, camundongo e quatro vetores lentivirais, também contendo o gene reporter GFP e os promotores Oct-4 de equinos, camundongo e humanos, pLZ2-ecOCT-EGFP (meq) (sequência equivalente de camundongos), pLZ2-ecOCT-EGFP (heq) (sequência equivalente de humanos), pLZ2-mOCT-EGFP e pLZ2-hOCT-EGFP, respectivamente, foram construídos. Todos os vetores também contêm um sítio de resistência à blasticidina que permite a seleção das células estáveis e das células transduzidas. Essas construções plasmidiais foram verificadas se funcionavam eficientemente, bem como o efeito do promotor Oct-4 em transfectar transientes e estáveis CTE. As construções com promotor Oct-4 de camundongo, humano e eqüino (sequência análoga à de camundongo) produziram somente 6% de células GFP positivas com intensidade de fluorescência (IF) >1000 pela análise em citômetro de fluxo, enquanto que o plasmídeo contendo o promotor Oct-4 de eqüino (sequência equivalente à de humanos) produziu menos células GFP positivas (>3%) com IF >1000, quando comparado ao controle positivo e entre os grupos. Entretanto, a expressão da GFP não foi observada em células estáveis, considerando que houve formação de colônias blasticidina-resistentes a partir do sexto dias pós-transfecção. Para otimizar o sistema em CTE de murinos, os lentivetores pLZ2-mOCT-EGFP e pLZ2-hOCT-EGFP foram testados como controles. Foi utilizado o vetor lentiviral derivado HIV-1, pois eles são considerados um eficiente veículo de transporte de genes em uma variedade de células. Colônias resistentes à blasticidina foram observadas 6 dias após transdução para ambos os vetores lentivirais e a expressão da GFP foi

avaliada pela microscopia de fluorescência. Embora o maior número de colônias formou-se quando as células foram infectadas com pLZ2-mOCT-EGFP do que com pLZ2-hOCT-EGFP, expressão da GFP foi maior quando as células foram transduzidas com pLZ2-hOCT-EGFP. Adicionalmente, a expressão da GFP foi aumentada durante o tempo, especialmente em células transduzidas com pLZ2-hOCT-EGFP. Além disso, não foi observada expressão da GFP sob o controle do promotor Oct-4 de eqüinos em CTE de murinos infectadas. Contudo, a aplicação desse sistema de vetores plasmidiais e lentivirais pode, portanto, promover uma importante ferramenta em transferência gênica e expressão do transgene Oct-4 GFP em células pluripotentes.

Palavras-chave: Promotor Oct-4; Lentivector; Vetor plasmidial; Células tronco embrionárias; Transfecção; Transdução

ABSTRACT

The pluripotency transcription factor Oct-4 is well conserved among species and is known to be expressed in embryos and embryonic stem (ES) cells; it is being an important pluripotency marker. It was recently demonstrated that the combination of Oct-4 with three other factors Klf-4, c-myc and Sox2 were able to reprogram somatic cells to a pluripotent and undifferentiated state. These cells known as induced pluripotent stem (iPS) cells share several properties with ES cells including self-renewal, proliferation and pluripotency. The aim of this study was to assess the functionality of the horse Oct-4 promoter in mouse ES cells. Three plasmids vectors expressing GFP (green fluorescent protein) under the control of the horse, mouse and four lentivirus vectors also containing reporter gene GFP and horse, mouse and human promoters, pLZ2-ecOCT-EGFP (mouse sequence equivalent), pLZ2-ecOCT-EGFP (human sequence equivalent), pLZ2-mOCT-EGFP and pLZ2-hOCT-EGFP, respectively, were built. All these vectors also contain a blasticidin resistance cassette to allow selection of transfected stable cells and transduced cells. Afterwards, to assess the functionality of the Oct-4 promoter all plasmids were tranfected the into transient and stable mouse ES cells. Constructs with mouse, human and horse (mouse analog sequence) Oct-4 promoter produced only 6% GFP positive cells with fluorescence intensity (FI)>1000 by

FACs assay, while plasmid horse (human analog sequence) Oct-4 promoter produced less GFP positive cells (>3%) with FI>1000, when compared with the positive control and among groups. However, GFP expression was not present in stable cells, whereas there were Blasticidin-resistant colonies-forming from 6 days post-transfection. To optimize the system in mouse ES cells, pLZ2-mOCT-EGFP and pLZ2-hOCT-EGFP lentivectors, were tested as controls. It was used HIV-1-derived lentiviral vectors because they are considered to be an efficient vehicle for delivering genes into a variety of cells. Blasticidin-resistant colonies were observed from 6 days post-transduction with both lentivirus vectors and GFP expression was then assessed by fluorescence microscopy. While the number of colonies was much greater when cells were transduced with pLZ2-mOCT-EGFP than with pLZ2-hOCT-EGFP, GFP expression was greater when cells were transduced with pLZ2-hOCT-EGFP. Additionally, GFP expression was found to be increased overtime especially in the cells transduced with pLZ2-hOCT-EGFP. Furthermore, in the mES infection, GFP expression was not observed under the control of the horse Oct4 promoter. Thus, the application of these plasmids and lentivirus vector system should therefore provide an important tool in gene transfer and expression of the horse Oct-4 GFP transgene in pluripotent cells.

Key-words: Oct-4 promoter; Lentivirus vector; Plasmids vector; Embryonic stem cell; Transfection; Transduction.

1. INTRODUÇÃO

Células-tronco embrionárias (CTE), que são derivadas da massa celular interna de blastocisto de mamíferos, têm a capacidade de crescer indefinidamente e de manter a pluripotência e a habilidade de diferenciação em três camadas germinativas: mesoderme, endoderme e ectoderme (EVANS & KAUFMAN, 1981; MARTIN, 1981). Células-tronco embrionárias de humanos podem ser usadas para o tratamento de doenças como Parkinson, injúrias na medula espinhal e diabetes (THOMSON et al., 1998). Entretanto, existem muitas dificuldades éticas em relação ao uso de embriões humanos, bem como problemas de rejeição tecidual em pacientes após o transplante. Uma alternativa para essa questão é a geração de células pluripotentes diretamente de células do próprio paciente.

Células somáticas podem ser reprogramadas pela transferência do conteúdo de seu núcleo dentro dos oócitos (WILMUT et al., 1997) ou pela fusão com células tronco embrionárias (TADA et al., 2001; COWAN et al., 2005), indicando que oócitos não fertilizados e células tronco embrionárias contêm fatores que podem conferir totipotência ou pluripotência para células somáticas. Sendo assim, TAKAHASHI & YAMANAKA (2006) demonstraram a indução de fibroblasto embrionário e adulto de camundongo em células-tronco pluripotentes pela introdução de quatro fatores de transcrição, Oct-4, Sox2, c-Myc e Klf4, sob condições de cultivo de células-tronco embrionárias. Estas células foram designadas de células-tronco pluripotentes induzidas (iPS – induced pluripotent cells), as quais apresentam as propriedades morfológicas e de crescimento e também expressam os mesmos marcadores celulares das células tronco embrionárias (TAKAHASHI & YAMANAKA, 2006). Transplantes subcutâneos de células iPS em camundongos imunodeficientes resultaram em tumores contendo uma variedade de tecidos com todas as três camadas germinativas. A injeção dessas células em blastocistos contribuíram para o desenvolvimento embrionário em camundongos (TAKAHASHI & YAMANAKA, 2006).

Em espécies domésticas, as células iPS oferecem uma alternativa promissora para tentar estabelecer linhagens de células tronco embrionárias com origem nas próprias células tronco pluripotentes induzidas. Isto é particularmente relevante em equinos onde o uso terapêutico de células-tronco pluripotentes tem

grande potencial para aplicação na medicina regenerativa, principalmente para o tratamento de injúrias musculoesqueléticas. Nesta espécie, poucos estudos têm sido feitos para a geração e caracterização de linhagem de células-tronco embrionárias. Assim, o estabelecimento de um eficiente sistema de transferência gênica para células iPS é considerado essencial para sua diferenciação em células funcionais, uma vez que as características detalhadas de transdução das células iPS não foram examinadas até o presente momento (TASHIRO et al., 2009). Desta forma, é de grande valor encontrar um caminho eficiente para a manipulação e caracterização de células-tronco pluripotentes. A transferência gênica de vetores baseada em retrovírus e lentivírus proporciona um meio eficaz para integração e expressão de genes exógenos em células de mamíferos. Vetores lentivirais, principalmente derivado do vírus da imunodeficiência humana (HIV-1) é considerado um veículo competente para integração de genes em várias células (KOSAKA et al., 2004).

O fator de transcrição Oct-4 é um importante co-regulador dos primeiros estágios do desenvolvimento embrionário em mamíferos através da correlação da sua presença com a manutenção da pluripotência. Por esta razão é comumente utilizado como um marcador para a identificação de CTE. Até os dias de hoje, nenhum trabalho foi descrito sobre avaliação da habilidade do promotor de eqüinos como um marcador da pluripotência.

Sendo assim, o presente estudo objetivou investigar a capacidade do promotor Oct-4 de eqüinos como marcador de pluripotência, avaliado pela expressão da proteína verde fluorescente (GFP) através da transfecção e transdução de células tronco embrionárias de murinos por vetores plasmidiais e lentivirais, respectivamente. Deste modo, esses vetores poderiam ser um meio adequado em caracterizar o estado pluripotente em CTE, pela ativação do Oct-4 endógeno, e também atuar como ferramenta em potencial para o reconhecimento e isolamento de células tronco pluripotentes induzidas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Células Tronco e Medicina Regenerativa em Equinos

O estabelecimento de linhagens de células-tronco embrionárias (CTE) em espécie de ungulados domésticos, tais como o suíno, ovino, caprino, bovino e equino tem o mesmo interesse e similares razões que aquelas aplicadas ao desenvolvimento de linhagens de CTE em camundongos e humanos. Razões estas que incluem o interesse por pesquisas básicas, como embriologia comparativa e manutenção e diferenciação da biologia celular de células-tronco de ungulados. Também, o desenvolvimento de pesquisas com o intuito de estabelecer linhagens de CTE de ungulados. Isso inclui, por exemplo, a criação de modelos experimentais para o estudo de doenças genéticas humanas e terapias de transplante celular. Outra significativa utilidade em se obter CTE de ungulados é seu potencial uso na engenharia genética para melhorar e diferenciar os aspectos da produção animal, produtos derivados, resistência a doenças e a produção de biofármacos (TALBOLT & BLOMBERG, 2008).

Em equinos, somente o uso terapêutico de células-tronco mesenquimais adultas foi relatado (CARSTANJEN et al., 2006; CROVACE et al., 2007; GUEST et al., 2008). A eficiência desses tratamentos é difícil de se determinar uma vez que raramente utilizaram animais controle e frequentemente o tratamento com células-tronco é combinado com outros fatores presentes no sobrenadante da medula óssea e soro autólogo.

Muitos cavalos de competição possuem uma carreira de risco devido a injúrias musculoesqueléticas como resultado do seu esforço, sendo estas a principal causa de lesão severa e morte para cavalos de corrida (cerca de 80% do total de mortes). Desta forma, esta realidade está trazendo uma maior preocupação com o bem-estar destes animais, já que estas injúrias são a maior causa de perdas econômicas reduzindo a performance do mercado de cavalos (HILL et al., 2003; STOVER, 2003).

Já existem companhias no Reino Unido e EUA que estão utilizando células-tronco para reparar danos no tecido musculoesquelético em equinos. No caso de lesões dos tendões, as tradicionais terapias envolvem a cicatrização mecânica dos tendões. Em relação a essa técnica, as células-tronco trazem uma vantagem, em vez de atuarem com o mecanismo reparador, elas têm a capacidade de regenerar as

células do tecido lesado. Embora, terapias comerciais com células-tronco em cavalos estão utilizando células mesenquimais provenientes da medula óssea ou tecido adiposo. No entanto, uma pequena fração de células da medula óssea (0,01% ou menos) são verdadeiras células-tronco capazes de se diferenciar nos tipos celulares desejados e também somente podem ser mantidas por período limitado de tempo (HILL et al., 2003; STOVER, 2003).

Portanto, é preciso buscar uma alternativa para todos esses esforços em sistemas baseados em terapia celular para a regeneração do tecido musculoesquelético em equinos. Sendo assim, a geração de células iPS poderia oferecer uma grande melhoria nas atuais terapias com células-tronco. Por exemplo: a) células iPS poderiam ser uma permanente origem de células-tronco pluripotentes para regeneração de tecidos autólogos; b) elas poderiam ser usadas não somente para tratamento de lesões musculoesqueléticas como também para outros danos teciduais; c) células iPS poderiam ser geradas a partir de uma simples biópsia da pele, sem procedimentos de alto risco, como a aspiração da medula óssea. Assim, a geração de células iPS de equinos poderá constituir um grande avanço científico e terapêutico na medicina veterinária.

2.2. Células-Tronco Embrionárias

Células-tronco embrionárias (CTE) são derivadas da massa celular interna de blastocistos e se proliferam extensivamente, enquanto mantêm a pluripotência. A primeira célula tronco isolada foi derivada de embrião de camundongo (EVANS & KAUFMAN, 1981; MARTIM, 1981) como resultado do desenvolvimento do camundongo “Knockout” (DOETSCHMAN et al., 1985; HOOPER et al., 1987). As CTE têm a capacidade de se desenvolverem em qualquer tipo celular, sendo que a geração de linhagens de CTE de blastocistos humanos (THOMSON et al., 1998) mostrou a possibilidade de usá-las como fonte doadoras de células para transplantes em terapia celular. Portanto, somente as CTE podem ser consideradas pluripotentes, já que são capazes de se diferenciar em qualquer célula somática oriunda de cada um dos três folhetos embrionários: endoderma, mesoderma e ectoderma, quando estimuladas apropriadamente (RIPPON & BISHOP, 2004). Em contraste com as células

diferenciadas, as CTE mantêm um estado indiferenciado, têm a habilidade de auto-renovação e possuem a pluripotência. Desta maneira, as CTE podem dar origem à maioria, se não a todos os tipos de células somáticas, e ainda às células germinativas, (oócitos e espermatozóides).

Estas células possuem um importante potencial de aplicações clínicas que incluem o tratamento de diabetes juvenil, doença de Parkinson, problemas cardíacos e injúrias na medula espinhal. Entretanto, o uso de embriões humanos e o risco de rejeição tecidual permanecem como desafios para o transplante de CTE. Uma alternativa para solucionar essas questões é efetuar a reprogramação do núcleo de células somáticas para transformá-las em CTE pluripotentes, e assim então, utilizá-las como fontes doadoras apropriadas para transplantes em medicina regenerativa.

Ainda, as CTE podem ser manipuladas geneticamente e os fenômenos de mutação/inserção podem ser estudados em corpos embrióides ou em células isoladas após a diferenciação *in vitro* (BOHELER et al, 2002). A manipulação gênica e posterior diferenciação *in vitro* das CTE permite modificações no genoma mamífero sem causar preocupações de efeitos adversos no desenvolvimento embrionário como um todo (BOHELER et al., 2002). Desta forma, as CTE podem ser transformadas e utilizadas para inferir sobre a complexa rede de genes que codificam fatores de transcrição na regulação da expressão gênica tecido-específica, através da comparação de linhagens mutadas “Knockout” e linhagens selvagens (DUNCAN et al., 1998).

Adicionalmente, “stem-like cells” (células similares a células tronco), as quais são definidas por marcadores de expressão, demonstram ter a capacidade de serem induzidas à diferenciação, de sobreviver à passagem, e de ter a morfologia das células-tronco foram recentemente isoladas de embriões de equinos produzidos *in vitro*, porém ainda não foram realizados trabalhos isolando CTE de embriões *in vitro* de equinos (HARDING, 2005).

Portanto, essas características fazem das linhagens de CTE um importante recurso para o avanço da medicina regenerativa e, se estabelecido para espécies animais domésticos, tais como equinos, tornaria possível a melhoria dos recursos através da sua aplicação para a tecnologia da engenharia genética. Infelizmente, apesar dos significativos avanços nas pesquisas com CTE em humanos e

camundongos, a derivação de linhagens de CTE na espécie eqüina ainda não teve sucesso (TALBOT & BLOMBERG, 2008).

2.3. Células Tronco Pluripotentes Induzidas (Células iPS)

A reprogramação nuclear permite o estudo da natureza e reversibilidade de modificações genômicas que ocorrem nas células durante a sua diferenciação e desenvolvimento (HOCHEDLINGER & JAENISCH, 2006). Além disso, a reprogramação de células adultas em um estado pluripotente como o de CTE permite a geração de células-tronco paciente-específica, trazendo um enorme potencial para o tratamento e análises de doenças degenerativas (YAMANAKA, 2007). A reprogramação nuclear pode ser alcançada pela transferência nuclear em oócitos (WILMUT et al., 1997), pela fusão entre CTE e células somáticas (TADA et al., 2003) e pela expressão de fatores de transcrição ectópicos em células somáticas (TAKAHASHI & YAMANAKA, 2006). Uma das mais recentes abordagens foi a expressão viral de fatores de transcrição Oct-4 e Sox2 combinados com Klf4 e c-Myc (MAHERALI, 2007; TAKAHASHI et al., 2007; WERNIG, 2007; OKITA et al., 2008; PARK et al., 2008) ou Lin28 e Nanog (YU et al., 2007) para a geração de células-tronco pluripotentes induzidas (iPs “cells- induced pluripotent cells”).

O sucesso da reprogramação por fusão indica que as CTE possuem fatores que induzem a pluripotência em células somáticas. Baseado nessa hipótese, três grupos de potenciais fatores foram selecionados para verificar a indução da pluripotência (TAKAHASHI & YAMANAKA, 2006). O primeiro grupo consistiu-se de fatores de transcrição especialmente expressos em CTE, incluindo Nanog, Oct 3/4, Sox2, UTF1, Sall4, Sox15 e Rex1. O segundo grupo constituiu por genes relacionados ao crescimento celular e de tumores e que têm mostrado um importante papel nas CTE, incluindo c-Myc, Stat3, β -catenin, Grb2, Klf-4, TCL1 e ERas. O terceiro grupo consistiu de fatores que também são especialmente expressos em CTE, mas com menos funções definidas incluindo ECAT1, ESG1, Fbx15, DNMT3L, ECAT8, GDF3, ECAT15-1, ECAT15-2, Fthl17 e Stella. Assim, as células que foram transduzidas com a combinação dos quatro fatores de transcrição Oct3/4, Sox2, c-Myc e Klf4 mostraram características morfológicas e de proliferação similares às CTE. Além disso, quando

essas células foram transplantadas em camundongos imunodeficientes produziram teratomas contendo vários tecidos das três camadas germinativas (TAKAHASHI & YAMANAKA, 2006; WERNIG, 2007). Devido a isto, foram designadas de células-tronco pluripotentes induzidas (iPs cells- induced pluripotent cells). As CTE são similares às células tumorais, ou seja, são imortais e se proliferam rapidamente. CTE funcionam como células transformadoras do fenótipo, embora isso possa ser reversível quando elas são injetadas dentro de blastocistos murinos e formam quimeras aparentemente normais (YAMANAKA, 2007). Desta forma, esses dados demonstram que células pluripotentes podem ser geradas a partir de fibroblastos com poucos fatores de transcrição (TAKAHASHI; YAMANAKA, 2006).

A transdução mediada por vetores virais com definidos fatores (genes) tem sido usada para a geração de células iPS em fibroblasto embrionário e adulto de células somáticas de camundongos e humanos. Por expressão gênica e desenvolvimento do potencial das células iPS, estas células se tornam similares às CTE e mantêm uma total capacidade para a diferenciação e habilidade de formar teratomas, gerar quimeras e formar as camadas germinativas (YU et al., 2007; LOWRY et al., 2008). Esta tecnologia pode ser aplicada em muitos tipos celulares, como também em fibroblastos. Sendo assim, numerosos tipos celulares têm se mostrado propícios para a direta reprogramação, incluindo precursores neuronais e células β pancreáticas (HANNA et al., 2007; STADTFELD et al., 2008). Sem questões éticas ou práticas associadas ao uso de células-tronco embrionárias de humanos, as células-tronco pluripotentes induzidas surgiram como um método promissor para a terapia gênica em medicina regenerativa (HANNA et al., 2007; WERNIG, 2007). Porém, os atuais protocolos ainda envolvem a reprogramação com vetores virais, podendo levar à multiplicação de cópias pró-virais por todo o genoma, além do potencial efeito prejudicial dos oncogenes em relação à mutagênese insercional ou reativação da transcrição viral silenciada em células derivadas de linhagens de células iPS.

As células iPS foram inicialmente isoladas usando a seleção por drogas pela reativação de genes específicos em CTE, incluindo Fbx15 (TAKAHASHI & YAMANAKA, 2006), Oct-4 e Nanog (MAHERALI, 2007; WERNIG et al., 2007; OKITA et al., 2008). Estes genes candidatos foram testados através da detecção da indução da

pluripotência por marcadores da expressão gênica. Este sistema utilizou Fbx15, o qual é especialmente expressado em CTE e nos primeiros estágios embrionários, mas dispensável na autorenovação e no desenvolvimento das CTE (TOKUZAWA et al., 2003). Curiosamente, células iPS produzidas com seleção pelo gene Fbx15 foram menos eficientes que CTE, enquanto que células iPS produzidas por seleção pelos genes Oct-4 e Nanog apresentaram indistinguível funcionalidade e padrões moleculares como as CTE. A similaridade entre células iPS e CTE e a facilidade com que tais células podem ser geradas quando comparadas com a transferência nuclear ou a fusão celular faz dessa abordagem uma poderosa ferramenta para mais estudos no processo de reprogramação e para a potencial aplicação clínica.

Pouco ainda é conhecido sobre os aspectos e eventos moleculares e celulares acerca da reprogramação nuclear. A geração de células iPS é um processo gradual que em média leva entre 15 a 20 dias após a infecção das células somáticas com o vetor retroviral carreando quatro fatores de transcrição mostrando uma taxa de eficiência menor que 0,1% (TAKAHASHI & YAMANAKA, 2006; MAHERALI, 2007; WERNIG, 2007). A omissão de c-Myc do coquetel de genes reduz a eficiência e atrasa o processo de reprogramação (NAKAGAWA et al., 2008). O estabelecimento de células iPS levou ao silenciamento dos genes retrovirais e à re-expressão de genes pluripotentes endógenos como o Oct-4 e Nanog (MAHERALI, 2007; WERNIG, 2007; OKITA et al., 2008). Além disso, células iPS reativam o cromossomo X silenciado em células de fêmeas, restaurando a atividade da telomerase e reestabelecendo, em larga escala no genoma, a metilação das histonas que é característica padrão das CTE (TAKAHASHI & YAMANAKA, 2006; MAHERALI, 2007). Porém, não é conhecido se esses eventos têm uma ordem sequencial e qual evento coincide com o momento que as células somáticas se tornam independentes dos fatores exógenos de expressão.

Um dos passos mais críticos na geração das células iPS é aplicação dos vetores virais para o processo de reprogramação. Especialmente porque a incontrolável inserção dentro do genoma de vetores retrovirais e lentivirais pode potencialmente ativar oncogenes endógenos quando as células iPS geradas forem transplantadas (NIENHUIS et al., 2006). O uso de vetores não virais pode ser uma alternativa para essas questões. Repetidas transfecções de plasmídeos que contém o cDNA com os

quatro fatores da pluripotência introduzidos em fibroblasto embrionário de murinos (FEM) resultou em células iPS livres de vetores virais sem evidências de integração plasmídica (OKITA et al., 2008). KAJI et al., (2009) mostravam que a inserção de vetores individuais para cada fator de transcrição, antes regra necessária para a reprogramação das células somáticas, pode ser removida, e desta maneira pode-se usar mais de um fator de transcrição em apenas um plasmídeo e gerar células iPS.

As mudanças moleculares nas características da pluripotência ocorrem gradualmente nas células em cultivo. O mecanismo pelo qual esses quatro genes induzem a reprogramação é desconhecido, mas a função desses fatores é conhecida, então são sugeridas hipóteses em relação ao papel desses genes na indução da pluripotência. Oct-4 e Sox2, junto com Nanog formam o núcleo regulatório da rede que promove a pluripotência em CTE. Embriões que têm a supressão de Oct-4 morrem no útero devido a defeitos em sua massa celular interna (MCI). A supressão de Oct-4 em CTE de camundongos resulta na perda da pluripotência e da diferenciação em trofotoderma. De modo similar, a supressão de Sox2 em embriões provoca a perda da implantação devido a defeitos no epiblasto, sendo esse fator um importante regulador da diferenciação em trofotoderme. Já o gene Nanog pode ser dispensado como fator a ser introduzido para a reprogramação, pois ocorre a indução da expressão endógena através de mútua ação entre Oct-4 e Sox2 (GEARHART et al., 2007).

O proto-oncogene c-Myc é responsável pela regulação da expressão de 15% de todos os genes, incluindo os genes envolvidos na divisão e no crescimento celular e apoptose. Esse gene exerce um efeito sobre os alvos de transcrição que são positivos para recrutamento de histonas, enzimas modificadoras que atuam no processo de transcrição geral e remodelamento da cromatina. Porém, c-Myc atua de maneira negativa para recrutamento da DNA metiltransferase. Em muitos contextos, c-Myc estimula a proliferação e inibe a diferenciação celular. Contrariamente, esse fator induz a apoptose e a diferenciação em CTE de humanos. No entanto, 20% dos camundongos derivados de células iPS desenvolveram tumores devido a reativação do transgene c-Myc (OKITA et al., 2008).

O fator de transcrição Klf4 promove a auto-renovação de CTE de camundongos, provavelmente através de uma via LIF-dependente (fator de inibição da

leucemia). Foi então sugerido que Klf4 tem um efeito citostático pela repressão de p53, um supressor de Nanog, ou pela promoção da proliferação celular juntamente com o oncogene H-RasV12. A baixa eficiência com a qual células-tronco pluripotentes induzidas são geradas (<0,01%, apesar de 50% de taxa de transfecção) pode indicar que somente um sub grupo de células podem ser induzidas a pluripotência. A pele, um complexo tecido com grande capacidade regenerativa contém uma variedade de células-tronco, incluindo crista epidermal, mesenquimal e neural, além de células-tronco ou progenitores das células sanguíneas provenientes da circulação. Fibroblastos derivados da pele representam uma população heterogênea de células. Eles possuem distintos padrões de expressão gênica. Além disso, fibroblastos provenientes de uma simples região da pele possuem uma larga variedade nas características morfológicas e fisiológicas (GEARHART et al., 2007).

2.4. Transferência Gênica

Linhagens de CTE transgênicas são importantes ferramentas para a compreensão do desenvolvimento e da diferenciação celular. A transferência gênica pode ser alcançada por transfecção química/mecânica ou por transdução viral (KOBAYASHI et al., 2005).

Espera-se que a eficiente e transiente transferência gênica em CTE seja útil para o estudo básico no desenvolvimento biológico para posterior aplicação em medicina regenerativa (KAWABATA et al., 2005). Métodos de eletroporação (TOMPERS & LABOSKY, 2004), vetores retrovirais (CHERRY et al., 2000), vetores lentivirais (KOSAKA et al., 2004), lipofecção com a utilização de lipossomas e a supertransfecção, método que utiliza replicação e antígeno T (NIWA et al., 2000), estão sendo empregados para a expressão de genes exógenos em CTE.

Nos métodos de eletroporação, lipofecção e supertransfecção, o gene alvo, em células estáveis, é selecionado usando genes que apresentam sítios droga-resistentes. Já no caso de vetores retrovirais e lentivirais, o gene exógeno é introduzido no cromossomo da célula. Vetores virais têm sido usados por vários grupos de pesquisa para atingir uma expressão estável do transgene em CTE (STEWART et al., 1985; ROBERTSON, 1986). No entanto, uma das maiores limitações desses vetores é o silenciamento gênico que ocorre durante a propagação (CHERRY et al., 2000) e

diferenciação (LAKER et al., 1998) das células transduzidas. Porém, recentemente, vetores lentivirais foram usados com sucesso para transduzir CTE (MA & DIAMOND, 2001; PFEIFER et al., 2002). As atuais gerações de vetores lentivirais são auto-inativáveis (ZUFFEREY et al., 1988) e, portanto, compatíveis com os altos níveis de biossegurança. Como outra estratégia para introdução de moléculas de DNA nas células, a lipofecção surgiu como método promissor para ausência de vetores virais, devido à ausência de introdução do DNA exógeno. Lipídeos catiônicos interagem com o DNA para formar lipocomplexos encapsulados, os quais possuem alta eficiência em muitos tipos celulares, tanto *in vitro* (MONTIGNY et al., 2003) como *in vivo* (TAGAWA, 2002). Os lipocomplexos atingem o interior das células através da ligação na superfície da membrana com protoglicanos e caderinas (KELLER, 1999), seguido de endocitose. Esse caminho endocítico oferece vantagens distintas para os vetores não virais para a inserção do DNA exógeno em células eucarióticas. O tráfego dos endossomos pode facilitar o movimento das moléculas de DNA em torno do núcleo (ZABNER et al., 2005), superando as dificuldades de difusão e oferecendo proteção contra as nucleases citoplasmáticas. No entanto, a falha no sistema endossomal pode gerar a fusão com os lisossomos, a qual resulta na degradação do DNA transfectado pela DNaseII exonuclease (WATTIAUX et al., 2000).

2.5. Clonagem Gênica

O simples princípio de “cortar e colar” fragmentos de DNA é o suporte principal da tecnologia da clonagem gênica. O passo chave da clonagem gênica é a introdução do gene de interesse em um vetor plasmídico. Vetores plasmidiais são, portanto, designados a conterem um ou mais sítio de clonagem. Sendo estes sítios séries de sequências de reconhecimento restrito para uma variedade de endonucleases de restrição chamadas poli-ligantes (“polylinker”). As enzimas de restrição cortam e abrem o DNA do plasmídeo circular e permitem que um DNA exógeno seja nele enxertado. A combinação de dois fragmentos de DNA gera uma nova estrutura, denominada molécula de DNA recombinante (MIKLÓS, 2003).

Em biologia molecular um vetor é uma molécula de DNA que é usado como veículo para carrear uma sequência de DNA exógeno para dentro da célula

hospedeira. Plasmídeos, os mais simples vetores bacterianos, possuem em média tamanho de 1Kb à 20KB pares de bases e são moléculas de DNA circular que existem separadamente ao cromossomo da bactéria. Desta maneira, esses plasmídeos podem ser utilizados como ferramentas para propagação de extensas sequências de DNA ou como veículo transportador de genes exógenos para a expressão em células hospedeiras (MIKLÓS, 2003).

O uso de plasmídeos para difundir extensas quantidades de genes específicos em bactérias têm vantagens pela rápida taxa de crescimento das mesmas. Por exemplo, se um plasmídeo é colocado em uma célula hospedeira e é duplicado após cada divisão celular (em que cada célula filha recebe uma cópia), então muitas cópias de plasmídeos serão duplicados em cultura depois de várias gerações. Sendo assim, a propagação de sequências de DNA deve acontecer em células vivas, onde a transformação, captação celular e expressão do DNA na bactéria é crucial no processo de pesquisa. A bactéria *Escherichia coli* tem se tornado o organismo mais utilizado na biologia molecular, pois promove um simples e bem conhecido ambiente para a obtenção, isolamento e amplificação do DNA exógeno.

Um método amplamente empregado para se estudar a expressão de genes eucarióticos é o sistema de gene reporter. Essa abordagem permite avaliar o efeito que uma sequência regulatória de um determinado gene - artificialmente inserido à montante de um outro gene, chamado de "reporter" - exerce sobre o nível de transcrição deste último. Em razão desta característica, este é o método de escolha para se delimitar os elementos regulatórios, avaliar os efeitos de genes recombinantes sobre a transcrição gênica e estudar o impacto das mutações em elementos regulatórios *cis*. (ALAM & COOK, 1990; BRONSTEIN, 1994).

Primeiramente, constrói-se um plasmídeo quimérico, contendo a sequência regulatória sob estudo, ligada a um gene reporter. O plasmídeo recombinante é então introduzido em um tipo de célula apropriado e, após um período de 24-72h, o produto do gene reporter expresso é quantificado ou avaliado. A quantidade de proteína reporter sintetizada sob várias condições ou tratamentos a que as células foram submetidas deve refletir a habilidade da sequência regulatória inserida em promover a transcrição. Espera-se que a proteína reporter não altere a fisiologia da

célula transfectada, nem seja sintetizada endogenamente pelo hospedeiro. Se isto ocorrer, é desejável que apresente diferenças em relação à versão reporter a fim de que ambas possam ser diferenciadas com segurança. Além disso, é necessário que o reporter seja facilmente detectável mesmo em concentrações muito baixas e que, de fato, reflita a expressão do gene *in vivo*, em termos de cinética e magnitude de resposta. Ainda, é importante lembrar que esses ensaios permitem a quantificação ou a detecção da atividade ou dos níveis da proteína reporter, e não dos níveis de RNA. Apesar de ambos estarem freqüentemente correlacionados, um tratamento das células que eventualmente afete a tradução alterará a fidelidade dos valores obtidos (ALAM & COOK, 1990; BRONSTEIN, 1994).

Os genes reporter mais amplamente utilizados em estudos da expressão gênica de mamíferos incluem os que codificam enzimas como cloranfenicol acetil-transferase (CAT), luciferase de vaga-lume (*luc*), b-galactosidase bacteriana (*b-gal*), fosfatase alcalina e proteína verde fluorescente (GFP, do inglês “green fluorescent protein”). A clonagem do gene GFP de um tipo de água-viva (*Aequorea victoria*) (PRASHER, 1992; CHALFIE, 1994) possibilitou a expressão da proteína em sistemas heterólogos. A proteína GFP, quando expressada em células procarióticas ou eucarióticas, produz fluorescência verde após a excitação das células por luz azul ou UV. Essa propriedade intrínseca da proteína permite que esse sistema repórter seja bastante apreciado para avaliação da expressão de genes *in vivo*, principalmente em estudos de desenvolvimento. Como exemplo, pode-se citar a expressão de GFP, sob o controle de um promotor neuronal específico no nemátóide *Caenorhabditis elegans*: a fluorescência decorrente da expressão de GFP permitiu que pesquisadores monitorassem, em tempo real, a formação dos processos neuronais ao longo do desenvolvimento deste verme. Isto demonstrou que o GFP pode ser usado como marcador da expressão gênica e de proteínas tanto em células e tecidos vivos quanto em fixados (CHALFIE, 1994).

2.6. A Expressão de Oct-4

O gene Oct-4 (Octamer 4) codifica um fator de transcrição que é expressado em CTE e células germinativas de embriões de mamíferos. O fator de transcrição Oct-4 co-regula os primeiros estágios de desenvolvimento embrionário em

mamíferos correlacionando sua presença com a manutenção da pluripotência (NIWA et al., 2000). Por esta razão, Oct-4 é comumente usado com um marcador para a identificação de células-tronco embrionárias. Sendo que em embriões de equinos, os padrões de expressão de Oct-4 não foram estudados até o presente momento (HARDING, 2005). Foi relatado que o fator de transcrição Oct-4 funciona como um ativador transcricional de genes que são requeridos para a manutenção de um estado totipotente indiferenciado. Ainda, é capaz de prevenir a expressão de genes que são ativados durante a diferenciação de células-tronco embrionárias (PESCE & SCHÖLER, 2000; TOMILIN et al., 2000).

Oct-4 (também chamado Oct3, Oct3/4, POU5F1, OTF3 e NF-A3 dependendo da espécie) é um fator de transcrição da família POU (POU homeobox class) envolvido na regulação dos primeiros estágios de desenvolvimento embrionário e de diferenciação celular e foi o primeiro gene investigado em murinos (SCHÖLER et al., 1989). A região POU desse fator de transcrição contém conservado o domínio POU-específico. Este domínio é dividido em dois subdomínios e homeodomínios que permitem a classificação dos membros da família POU em 5 classes distintas, com Oct-4 representando a quinta classe e mais recentemente identificada (SCHÖLER et al., 1990; SCHÖLER, 1991).

Oct-4 vem sendo estudado extensivamente em pesquisas relacionadas com a pluripotência embrionária, incluindo a classificação de Oct-4 em embriões e a identificação em CTE, bem como em células-tronco pluripotentes (OKAMOTO et al., 1990; ROSNER et al., 1990). A proteína Oct-4 ainda não foi estudada em equinos e há apenas um único relato (como resultado de análise de PCR em tempo real) que o descreve como um marcador para pluripotência de células-tronco pluripotentes de equinos (SAITO et al., 2002). Por outro lado vários estudos foram feitos em camundongos (SCHÖLER et al., 1989; ROSNER et al., 1990; KIRCHHOF et al., 2000), suínos (KIRCHHOF et al., 2000), bovinos (KIRCHHOF et al., 2000; KUROSAKA et al., 2004), ratos (BUEHR et al., 2003), macacos *rhesus* (MITALIPOV et al., 2003) e humanos (CAUFFMAN et al., 2005). Existem evidências de variações nos padrões de expressão nos primeiros estágios de desenvolvimento embrionário dessas espécies e

estes padrões parecem ser reativamente espécie-específicos. Embriões produzidos *in vitro*, de roedores e macacos *rhesus*, expressam a proteína Oct-4 em estágios mais avançados do desenvolvimento embrionário primário (começando em 5 células e 16 células, respectivamente); também nestas espécies, a proteína pode ser isolada da MCI de blastocistos eclodidos. Nesse estágio, os padrões de expressão de mRNA são idênticos aos padrões de expressão da proteína. Em embriões produzidos *in vitro*, tanto na espécie bovina como em suínos, a proteína Oct-4 está presente durante todo o desenvolvimento embrionário primário, podendo ser encontrada tanto no trofoblasto como na MCI de blastocistos (HARDING, 2005). Em mórula ocorre um declínio da sua regulação nas células da sua superfície que se diferenciaram em trofotoderme e também depois da cavitação do blastocisto, Oct-4 é mantido nas células da MCI (OKAMOTO et al. 1990). Oct-4 também é expressado em CTE indiferenciadas, carcinoma de linhagens de células germinativas derivados da MCI e epiblasto, porém não é observada a sua expressão em linhagens de células somáticas.

O padrão de expressão é refletido como um complexo arranjo de elementos regulatórios. A expressão do gene Oct-4 é dirigida por um promotor mínimo TATA (OKAZAWA et al. 1991) e por pelo menos dois elementos “enhancer” (YEOM et al. 1990). O promotor é localizado entre os primeiros 250 pares de base anteriores ao início do sítio de transcrição e contém sítios de agrupamentos sobrepostos (PIKARSKY et al. 1994; SCHOORLEMMER et al., 1994; SYLVESTER & SCHÖLER, 1994). Entre esses agrupamentos existe um GC-box representando um sítio de ligação com alta afinidade pelos fatores de transcrição Sp1 e Sp3 que modulam a atividade do promotor Oct-4.

Sequências análogas do gene Oct-4 murino têm sido identificadas em uma variedade de espécies de mamíferos. O gene Oct-4 de murinos é altamente conservado em humanos e bovinos, com evidências de 87% e 81% do total da identidade da sequência da proteína, organização genômica em cinco éxons e mapeamento cromossomal para o complexo maior de histocompatibilidade (MHC) (TAKEDA et al., 1992; ABDEL-RAHMAN et al., 1995; VAN EIJK et al., 1999). Uma comparação da região promotora de bovinos com murinos (OKAZAWA et al. 1999) e humanos (TAKEDA et al. 1992) revelou uma extensa sequência conservada entre as

espécies, principalmente nos sítios de ligação Sp1 e Sp3 (VAN EIJK et al., 1999). O alto grau de similaridade da sequência sugere que Oct-4 desempenha um papel similar em todas as espécies de mamíferos (KIRCHHOF et al., 2000). Foi descrito anteriormente que Oct-4 atua como um fator de transcrição para muitos genes, especialmente aqueles que são expressos em células pluripotentes. Este padrão de expressão sugere que Oct-4 está associado ao “status” de totipotência tanto na implantação embrionária como na cultura *in vitro* (OKAMOTO et al., 1990; OVITT et al., 1998). Desta forma, o alto grau de conservação entre as espécies indica que este gene tem um padrão similar de expressão, o que torna o Oct-4 um marcador adequado para identificação da pluripotência e totipotência de células provenientes das espécies domésticas (KIRCHHOF et al., 2000).

2.7. Vetores Lentivirais (Lentivectores)

A família *Retroviridae* é caracterizada por apresentar genoma com RNA de polaridade positiva e por converter esse RNA em DNA, através da transcriptase reversa. São três as subfamílias: *Oncovirinae*, *Lentivirinae* e *Spumavirinae*. Os oncovírus são muito utilizados na terapia gênica, particularmente o vírus da leucemia murina (MLV). No entanto, um oncovírus não possui a capacidade de infectar células quiescentes, como neurônios e células-tronco hematopoiéticas; desta forma, os lentivírus foram extensivamente estudados para serem utilizados em transdução celular (MILLER, 1992; PALÚ et al., 1999; BUCHSCHACHER & WOONG-STAAAL, 2000).

Vetores baseados em lentivírus têm alcançado grande desenvolvimento no que se refere a estudos clínicos, porém a utilização desses agentes como “veículos de entrega” (“delivery”) foi aplicada mais recentemente. Eles possuem vantagens particulares para certas aplicações *in vitro* e *in vivo*, especialmente a capacidade única de integração do material genético dentro do genoma de células que não estão em processo de divisão (LEVER et al., 2004). A integração do genoma viral ao genoma hospedeiro depende da capacidade do provírus em penetrar o núcleo da célula. Para a maior parte do retrovírus isso ocorre durante a divisão celular, quando a carioteca rompe-se. Contudo, os lentivírus possuem mecanismo de transporte ativo do seu provírus pelos poros da carioteca (BUKRINSKY & HAFFAR, 1999), devido às

sequências situadas no núcleo e formação de complexos protéicos de transporte dependentes de genes acessórios, como *vpr* do HIV (VODICKA et al., 1998).

Os vetores lentivirais derivados do vírus da imunodeficiência humana (HIV-1) causam menor efeito citotóxico, resultando em uma infectividade generalizada. Estes também podem transduzir genes específicos no cromossomo das células alvo, mesmo na ausência de divisão celular. Desta forma, esta propriedade única dos vetores lentivirais os tornam competentes para a transdução e expressão gênica a longo prazo em células alvo (KOSAKA et al., 2004).

Lentivetores (derivados do vírus HIV) não são totalmente susceptíveis ao silenciamento gênico em CTE. PFEIFER et al., (2002), reportaram expressão estável do transgene em lentivírus em CTE proliferativas de murinos. A expressão do gene foi mantida mesmo quando foram cultivados *in vitro* como corpos embrióides, ou, *in vivo*, como teratomas. A família dos lentivírus compreende retrovírus complexos com a convencional estrutura formada por três parículas virais presentes em todo retrovírus (gag, pol e env) codificando proteínas do capsídeo, enzimas virais e de glicoproteínas do envelope, respectivamente (SWANSTROM & WILLS, 1997). Bem como dois genes regulatórios adicionais (*tat* e *rev*), essenciais para expressão gênica no tipo selvagem, e outros adicionais de função ainda não elucidada (MYIOSHI et al. 1999; KAY et al., 2001) (Figura 1).

Vários laboratórios estão atualmente usando diferentes tipos de lentivírus (LV) como vetores originários de várias espécies, os quais incluem: HIV-1 (NALDINI et al., 1996), vírus HIV-2 de macacos (POESCHLA et al., 1998), de felinos (FIV) (POESCHLA et al., 1998) ou de bovinos (BIV) (BERKOWITZ et al., 2001), vírus da artrite encefalite caprina (CAEV) (MSELLI-LAKHA et al., 1998), vírus da anemia infecciosa equina (EIAV) (OLSEN et al., 1998; MITROPHANOUS et al., 1999), vírus Maedi-visna (MVV) (BERKOWITZ et al., 2001). No entanto, a titulação obtida foi baixa, sugerindo que possa haver defeitos na transcriptase reversa e integração ou empacotamento do RNA viral (“packaging”) (LEVER et al., 2004).

Os vírus dependem da célula hospedeira para sintetizar suas proteínas e enzimas usadas na replicação. Uma partícula viral completa, que é capaz de infectar uma célula, é chamada de vírion na fase extracelular. A estrutura viral básica possui na

parte central, a qual é constituída pelo material genético e proteínas associadas; no seu revestimento, o capsídeo, composto por subunidades protéicas (protômeros) que fornecem proteção contra desnaturação química e degradação enzimática do ácido nucléico; e, alguns vírus apresentam envelope, fragmento de membrana lipoprotéica modificada (DA SILVA, 2005).

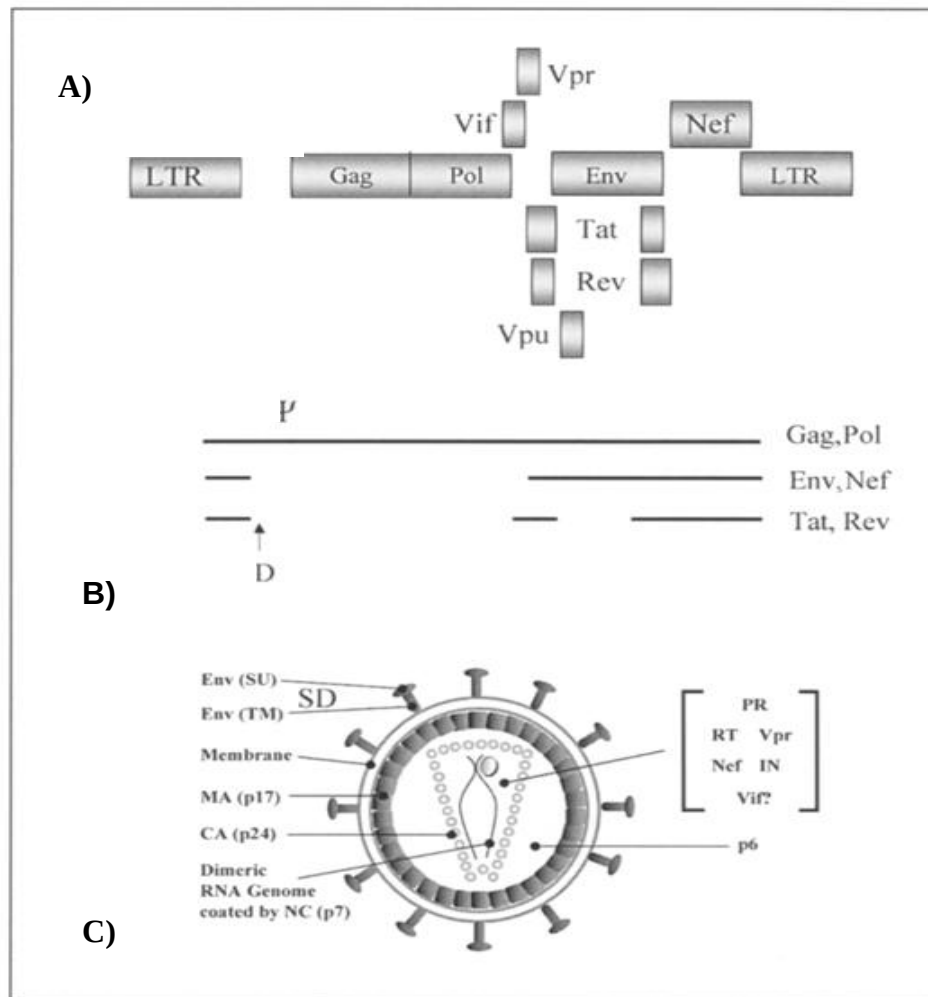


Figura 1. A). Diagrama do HIV-1 provírus e ORFs; B) Principais espécies de RNA transcritas de um Provírus integrado; C) Diagrama da partícula do virion maduro com proteínas e RNA (LEVER et al., 2004). ORFs: Open reading frame; ORFs: Gag, Pol e Env (genes estruturais e enzimáticos); genes regulatórios adicionais: Nef, Tat e Rev; LTR: long terminal repeats-extremidade do provírus; vpr, vpi e vpu: genes acessórios. Todos estes genes são necessários para a expressão gênica dos lentivírus.

Para a produção de vetores virais é necessário fornecer os elementos mencionados anteriormente pelo sistema de entrega gênica, método químico ou físico. Desta maneira, plasmídeos distintos são adicionados sobre uma monocamada de células aderentes, chamadas de células empacotadoras (“packaging cells lines”), num processo denominado de transfecção (MILLER, 1990; COSSET et al., 1995). Os lentivetores são produzidos por co-transfecções transientes de construções empacotadoras e DNA vetores em linhagens celulares com alta expressão com as Cos e HEK-293T (LEVER et al., 2004). Nessas células, os plasmídeos de empacotamento e de envelope têm seus genes transcritos e traduzidos para a produção de proteínas estruturais e enzimas necessárias à formação do vírus. No vírus recombinante, as sequências regulatórias e estruturais são separadas em vetores distintos para que esta partícula recombinante seja defectiva para essas sequências. Portanto, seu material genético é representado pelo vetor recombinante, composto basicamente, pelo transgene e seus elementos regulatórios, e sequências virais relacionadas aos eventos de transcrição e de integração. Apenas o vetor recombinante contém a sequência *psi* (Ψ) de empacotamento (KAY et al., 2001).

Os lentivírus são atrativos como vetores devido à sua característica única em relação aos outros vírus que combina sua alta habilidade em manipular o genoma com a sua capacidade de carrear genes de tamanhos de sequências grandes (7-8 Kb), como também baixos níveis de atividade pró-inflamatória e integração de seu genoma em células que não estão dividindo (LEVER et al., 2004).

3. Objetivos Gerais

Investigar a habilidade do promotor Oct-4 de eqüinos como um marcador da pluripotência, através da expressão do gene repórter GFP, pelo do uso de vetores plasmidiais e lentivirais (derivado HIV-1) pela transfecção e transdução de CTE de murinos, respectivamente.

3.1. Objetivos específicos

1. Construir, identificar e analisar vetores plasmidiais e lentivirais com a região promotora (“upstream”) do gene Oct-4 de camundongos e equinos. Derivar duas sequências análogas do promotor de camundongo e humano para o promotor Oct-4 de equinos.

2. Verificar a funcionalidade dos plasmídeos recombinantes em expressar a proteína GFP controlada pelo promotor Oct-4 de camundongo, humano e equino (sequências análogas a de camundongo e humanos) em transfectar e identificar a pluripotência em CTE de murinos. Avaliar a eficiência dos promotores na forma de DNA linear e DNA circular em transfectar as CTE de murinos.

3. Verificar a funcionalidade dos lentivetores carreando os promotores Oct-4 de camundongo, humano e eqüino (sequências análogas a de camundongo e humanos). Avaliar a capacidade dos promotores em expressar a GFP pela transdução das CTE de murinos.

3.2. Hipótese

Dessa maneira, o vetor lentiviral poderia ser adequado em reconhecer o estado pluripotente pela ativação do Oct-4 endógeno como uma estratégia de seleção mais rigorosa para o isolamento de células reprogramadas.

4. Material e Métodos

4.1. Construção dos vetores

4.1.1. Promotor Oct-4 de camundongo

Para a recombinação e clonagem do promotor Oct-4 de camundongo (denominado mOCT – mouse Oct-4 promoter) foi utilizado como vetor receptor o plasmídeo pLZ2-hOCT-EGFP (hOCT – human Oct-4 promoter), desenvolvido pelo pesquisador Debbio Zhao e gentilmente cedido pela doutoranda Chiara Sartori, Roslin Institute, Escócia. A estratégia de clonagem (desenvolvida pelo Dr. Simon Lilico, Roslin Institute) foi baseada, basicamente, na retirada do fragmento do promotor humano do plasmídeo pLZ2-EGFP, acoplamento de um ligante e inserção do promotor de camundongo extraído do plasmídeo - pOctneo1 (MCWHIR et al., 1996) (gentilmente cedido pela Dr^a. Alexandra Didomenicco, Roslin Institute)

O fragmento de 1.905 pb, consiste da sequência flanqueadora 5' do gene Oct-3/4 e correspondente a posição -1876 à +29 da sequência descrita por OKAZAWA et al., (1991) contém extremidades *Sall* e *HindIII*. O promotor de humanos (hOCT) possui 3.985 pb e o plasmídeo pLZ2-EGFP consiste de 7.088 pb.

Um ligante (“linker”), com oligonucleotídeos (oligos) para as extremidades ClaI e BamHI contendo os sítios Sal e HpaI foi desenvolvido: oligo1: Ligante ClaI/BamHI finais-mOCT (5' – 3'): CGA TGT CGA GGT TAA CGA TAT CG (Invitrogen) e oligo2: Ligante ClaI/BamHI finais-mOCT (5' – 3'): GAT CCG ATA TCG TTA ACC TCG AGG TCG ACA T (Invitrogen) (Figura 2).

5' CGAT GT CGAC CTCGAG GTTAAC GATAT TCG 3' 3' TACAG CTG GAGCTCC AATTG CTATAG CCTAG 5'

Figura 2. Constituição do ligante acoplado ao plasmídeo receptor (pLZ2-EGFP). Em colorido sítios referentes as endonucleases de restrição: *ClaI* , *HpaI*, *Sall*, *EcoRV*, *XhoI* e *BamH*.

4.1.2. Promotor Oct-4 de equino

O promotor Oct-4 de eqüinos (denominado ecOCT- *equus caballus* Oct-4) foi clonado em um vetor comercial de um trabalho prévio (PARHAM, 2008), onde foi realizado alinhamento das sequências de eqüinos, camundongo, humanos e bovinos de acordo com as sequências já estabelecidas (NORDHOFF et al., 2001). A partir dessa avaliação, foi estabelecida a região promotora a ser clonada do gene Oct-4 de eqüino, seguindo tamanho equivalente e similaridades de fatores reguladores na área codificadora “upstream” ao promotor Oct-4 clonado de humanos (3.583 pb) e camundongos (2.018 pb). PARHAM (2008) extraiu o fragmento da região promotora do DNA genômico (Qiagen) de fibroblasto de pele de eqüinos (The Royal-Dick School of Veterinary Studies, University of Edinburgh) que foi amplificado por PCR (“PCR Roche Fast Start Polymerase kit”, Roche) e as bandas foram coletadas e purificadas. Os promotores foram então ligados ao vetor pGEM®-T Easy vector (Promega) durante 12 horas. Finalmente, foram transformados em bactéria, o DNA plasmídico foi retirado e as amostras foram enviadas ao sequenciamento.

Basicamente, os dois promotores Oct-4 distintos de equino, com as sequências equivalentes de humanos (denominada ecOCT-heq [human equivalent]) e camundongo (denominada ecOCT-meq [mouse equivalent]), foram extraídos do vetor pGEM® -T Easy (doador) e acoplados ao vetor plasmídico viral pLZ2-linker-EGFP (receptor).

4.2. Clonagem gênica

A construção dos plasmídeos recombinantes com os promotores Oct-4 de camundongo e equino derivou-se da extração dos fragmentos da região promotora de um plasmídeo doador (pGEM® T Easy vector e pOctneo1) para um plasmídeo receptor pLZ2-hOCT-EGFP (derivado HIV-1) (Roslin Institute), que contém a proteína GFP sob o controle do promotor de humanos. Primeiramente, retirou-se o fragmento correspondente ao promotor de humano- hOCT (3,9kb) pela ação das endonucleases de restrição *ClaI* e *BamHI* (Roche). Acoplou-se ao vetor receptor um ligante (item 4.1.1.) Foi retirada de um vetor doador pOctneo1 (McWHIR et al., 1996) a sequência referente ao promotor de camundongo - mOCT (1,9kb) pela ação das enzimas de restrição *Sall* e

HindIII (Roche). Da mesma maneira, os fragmentos referentes aos promotores Oct-4 de eqüino nas sequências análogas a camundongo (2kb) (ecOCT-meq) e de humanos (ecOCT-heq) (3,6kb) foram extraídos do vetor pGEM- T Easy (Promega) (PARHAM, 2008) pela ação das endonucleases de restrição *EcoRI* e *Sall* (Roche). O fragmento do promotor mOCT foi acoplado ao plasmídeo receptor nos sítios de *Sall* e *HpaI*. O fragmento dos promotores ecOCT-meq e ecOCT-heq foram ligados ao plasmídeo pLZ2-EGFP no sítio de *EcoRI* (Figura 3).

Foi realizada a eletroforese em gel de agarose a 1% (Ultra Pure® Low Melting Point Agarose- Invitrogen) para extração e purificação (PureLink™ Gel Extration kit - Invitrogen) das bandas correspondentes a cada promotor e ao vetor receptor.

Uma reação de Blunting foi feita, pois as extremidades (5'-3' "overhang") dos fragmentos que contêm os promotores foram preparadas para a ligação com vetor receptor, desta forma convertidas em "blunt ends. Em minitubos, foram adicionados os reagentes e, em seguida, as amostras foram submetidas a diferentes temperaturas (12°C, 75°C e 4°C). O plasmídeo pLZ2-EGFP foi preparado para posterior ligação entre vetor e inserto. Para a linearização de 5µg do plasmídeo em 25 µL de reação foi adicionado 2,5 µL tampão (Roche), 12 µL de água destilada e 10 U/µL de *EcoRV* (Roche). Este foi escolhido como sítio de inserção do promotor, que está presente na sequência ligante (linker). Posteriormente, foi feita a reação de defosforilação do vetor. Em 25 µL de amostra linearizada foram adicionados 5 µL de tampão (Promega), 3 µL de água destilada e 5 µL SAP "Shrimp Alkaline Phosphatase" (Promega) com um volume final de 40 µL.

Para a inserção do promotor no plasmídeo (reação de ligação) foi usado o kit "Rapid DNA Ligation" (Roche). Utilizaram-se uma proporção de 3:1 de inserto:vetor e uma concentração típica de uma reação de ligação de 200 ng de DNA vetor. Para a reação de ligação, em minitubos, foram adicionados os seguintes componentes: 1) 4 µL do promotor mOCT (10,24 ng), 1 µL do vetor pLZ2-EGFP (80,4ng), 5 µL de tampão de ligação (5X), 3 µL de água destilada, 10 µL de tampão de ligação (2X). Ao final, após prévia agitação da solução, foi acrescentado 1 µL da enzima de ligação (T4 DNA ligase). Essa reação foi incubada à temperatura ambiente durante 10 minutos. Essa reação gerou o vetor pLZ2-mOCT-EGFP (Figura 3). 2) 7 µL do promotor ecOCT-meq

(50ng), 0,7 μ L do vetor pLZ2-EGFP (58,3 ng), 5 μ L de tampão de ligação (5X), 0,3 μ L de água destilada, 10 μ L de tampão de ligação (2X). Ao final, após prévia agitação da solução acrescentou-se 1 μ L da enzima de ligação (T4 DNA ligase). Essa reação foi incubada à temperatura ambiente por 10 minutos. Essa reação gerou o vetor pLZ2-ecOCT-EGFP (meq). 3) 5 μ L do promotor ecOCT-heq (60 ng), 0,5 μ L do vetor pLZ2-EGFP (40 ng), 5 μ L de tampão de ligação (5X), 2,5 μ L de água destilada, 10 μ L de tampão de ligação (2X). Ao final, após prévia agitação da solução, foi acrescentado 1 μ L da enzima de ligação (T4 DNA ligase). Essa reação foi incubada à temperatura ambiente durante 10 minutos. Essa reação formou o vetor pLZ2-ecOCT-EGFP (heq) (Figura 3).

4.2.1. Transformação bacteriana

Para a transformação, foram utilizadas 40 μ L de células competentes (XL10-Gold® Ultracompetent Cells-200315 – Stratagene) com 1 μ L a 2 μ L dos plasmídeos. As células foram incubadas em gelo por 30 minutos, sendo em seguida submetidas ao choque térmico à 42°C por 30 segundos e novamente colocadas no gelo durante 2 minutos. Adicionou-se 1 mL de meio LB (Luria Bertani) suplementado com glucose e manteve-se a suspensão celular à 37°C por 1 hora à 225 rpm. Posteriormente adicionaram-se 20 a 100 μ L da respectiva reação transformante nas placas de Petri com ágar e o antibiótico Ampicilina (100 mg/mL). As placas foram incubadas à 37°C durante 12 horas. No dia seguinte, as colônias que possuíam o maior tamanho e se apresentavam mais isoladas foram selecionadas. Posteriormente, misturadas à 2 e 5 ml do meio LB e Ampicilina (100 mg/mL) e incubadas à 37°C, a 225 rpm por 8 horas.

4.2.2. Extração de DNA plasmídial de *Escherichia coli*

Foi utilizado um método químico para a purificação do material genético por lise alcalina (SAMBROOK et al., 2001) de preparação de DNA plasmídial em pequena (Minipreparados) e grande escala (Maxipreparados) da amostra.

O minipreparado foi utilizado para se obter uma pequena escala de DNA purificado para posterior utilização para o sequenciamento e/ou clonagem gênica. Foram preparados a partir de 1 a 2 mL de cultura bacteriana utilizando o kit Wizard® Plus Minipreps DNA Purification System (Promega).

O maxipreparado foi usado para o isolamento do DNA plasmídial da bactéria para se obter um alto rendimento. Foi utilizado o kit PureLink™ HiPure Plasmid Filter Purification Kits for Midi and Maxi preparation of Plasmid DNA- K2100-17 (Invitrogen) Foram coletados 250 a 500 mL de cultura de células de *Escherichia coli* transformadas em meio LB com antibiótico Ampicilina durante 12 horas.

4.2.3. Determinação da concentração e grau de pureza do DNA

O método usado para a determinação do grau de pureza de DNA foi o método espectrofotométrico – NanoDrop 3300 (Thermo Scientific). Uma vez determinado o grau de pureza da amostra, a concentração foi avaliada também por espectrofotometria. Na análise espectrofotométrica, a absorvância a 260nm foi proporcional à quantidade de ácidos nucleicos. O grau de pureza foi calculado através da relação A260/A280 onde foram preconizados valores entre 1,8 e 2,0 nm.

4.2.4. Identificação dos subclones

O primeiro passo foi avaliar as amostras purificadas provenientes da reação do minipreparado, após verificação pelo Nanodrop de suas concentrações e grau de pureza. As amostras foram digeridas por enzimas de restrição (Roche) específicas para sequência de cada promotor Oct-4, as quais foram analisadas de acordo com o mapa de cada vetor (Apêndice) e pesquisa através do programa NEBcutter V2.0 (BioLabs® inc., New England - tools.neb.com/NEBcutter2/). Este programa indica os sítios de corte do DNA. Verificou-se a presença dos fragmentos

desejáveis pela eletroforese em gel de agarose. Foi realizado a eletroforese em gel de agarose a 1% (Ultra Pure™ Agarose -Invitrogen, Carlsbad, USA) e tampão TBE 1X (Tris-HCL 89mM; EDTA 2,5 mM e ácido bórico 89 mM, pH 8,3), corado com 10 µL de SYBR safe gel stain (Invitrogen), o qual foi adicionado à cuba de eletroforese e colocado em temperatura 4°C por 1 hora para estabilização do corante. Foram acrescentados nas canaletas do gel, 10 µL de DNA (plasmídeo recombinante) diluídos em 2 µL ou 1 µL de tampão de corrida (Blue/Orange Loading Dye, 6X- Promega). O gel permaneceu em tensão de 100V por aproximadamente uma hora. Após este procedimento, as bandas foram visualizadas nos géis, sendo posteriormente fotodocumentadas em aparelho Gel-Doc 2000 (Bio-Rad) para análise da inserção do promotor no vetor plasmídico.

Desta maneira, as amostras foram enviadas para o sequenciamento para confirmação definitiva de que o inserto (promotor Oct-4) havia sido recombinado ao plasmídeo. As amostras foram identificadas e armazenadas à -20°C para posterior uso em outros processos de clonagem, na transfecção e produção dos lentivírus.

Para o vetor pLZ2-linker-EGFP (receptor), foram analisados clones dos minipreparados, provenientes das colônias selecionadas das placas de Ágar/Ampicilina. Desta maneira, utilizou-se para cada 1 µg de DNA, um controle (sem Enzima de Restrição), 1 µL de *EcoRV* e 1 µL de *Sall* (Roche). Todas as amostras foram incubadas 37°C por 1 hora.

Para o vetor pLZ2-mOCT-EGFP (promotor Oct-4 de camundongo), foram verificados clones dos minipreparados, coletados das colônias selecionadas das placas de Ágar/Ampicilinas. Desta forma, 1 µg de DNA foi digerido por 1 µL da enzima de restrição *BamHI* (Roche). Todas as amostras foram incubadas 37°C por 1 hora.

Para o vetores pLZ2-ecOCT-EGFP (meq) e (heq) (promotor Oct-4 de eqüinos sequência equivalente de camundongo e de humanos), foram testados clones dos minipreparados para o vetor com a sequência equivalente à humanos (heq) e para os vetor com sequência equivalente a camundongos (meq). Desta forma, utilizou-se para cada 1 µg de DNA, um controle (sem Enzima de Restrição), 1 µL de *BamHI* (Roche), 1 µL de *ClaI* (Roche) e 1 µL tanto de *BamHI* e *ClaI* numa mesma reação. Todas as amostras foram incubadas 37°C durante 2 horas. O vetor doador pLZ2-hOCT-

EGFP também foi analisado. Assim, 1 µg de DNA foi digerido por 1 µL das enzimas de restrição *EcoRV* e *Sall*. (Roche), bem como, uma reação controle (sem enzima). As reações foram incubadas à 37°C por 1 hora. **4.2.3. Sequenciamento:** Todas as análises do sequenciamentos dos clones positivos dos vetores recombinantes foram realizados pela DNA Sequencing & Services, College of Life Sciences, University of Dundee, Dundee, Escócia – Reino Unido (www.dnaseq.co.uk). Para o sequenciamento do DNA foi utilizado o equipamento ABI 3730 Capillary DNA Sequencer (Hortense) (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA). Foram enviadas em minitubos, 30 µL/reação à uma concentração de 1 µg/60µL em água destilada esterilizada. Foram utilizados iniciadores (primers) (Invitrogen) específicos para cada sequência do promotor Oct-4, os quais foram desenhados pelo programa Primer3 Input (version 0.4.0) (frodo.wi.mit.edu). Foram enviados 10 µL/primer à uma concentração de 3,2 µM da solução estoque 100 µM em água destilada esterilizada. Para sequência do promotor Oct-4 de camundongo: Forward prime (5' – 3'): CCC TTT ATT TAG GTC TTC CA e Reverse primer (5' – 3'): TAG ACT TCA GGG TCA GCT TG. Para a sequência dos promotores Oct-4 de equino: Forward primer (5' – 3'): AGG CCC GAA GGA ATA GAA GA e Reverse primer (5' – 3'): TCC AGC TCG ACC AGG ATG. Os resultados foram submetidos ao alinhamento para verificação das similaridades entre as sequências analisadas pelo sequenciamento e as sequências dos promotores Oct-4 obtidas do banco de dados ENSEMBL (www.ensembl.org). Na análise do promotor de camundongo e de equino obtiveram-se as sequências: ENSMUST000000252771 e ENSECAT00000009247, respectivamente. Utilizou-se os programas Basic Alignment Search Tool – BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) e ClustalW (www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw/)

4.3. Cultivo de células-tronco embrionárias de murinos.

As CTE da linhagem Bruce 4 (B4), foram cultivadas sobre monocamada de gelatina de suíno 0,1% (Sigma) em PBS. Previamente, os criotubos contendo as CTE foram descongelados em água a 37°C por 2 minutos. Posteriormente, seu conteúdo foi depositado em tubo cônico de 15mL, preenchido com 5mL de meio de cultura de células (descrito abaixo) e o tubo foi centrifugado a 1000 RPM por 5 minutos. O pellet foi ressuspensionado em 5mL de meio de cultura. Este procedimento é necessário para retirar-se o crioprotetor (DMSO) presente no meio de congelamento das células, pois trata-se de uma substância tóxica. Desta maneira, as células foram colocadas em garrafas de 75 cm² banhadas, previamente, com solução de gelatina e adicionado o meio de cultivo.

As CTE foram cultivadas em meio Dulbecco's modificado Eagle's Medium – DMEM (Gibco) suplementado com 15% de soro fetal bovino (Gibco), 100 µM β-mercaptoethanol (Sigma), 2mM de glutamina (Invitrogen), 1x MEM aminoácido não essencial (Sigma) e 1000 U/ml ESGRO LIF (Chemicon) e filtrado em filtro de nitrocelulose de 0,45 µm (Millipore). O meio foi trocado a cada 24 horas. As células foram incubadas à 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. Sendo regularmente separadas usando tripsina/EDTA (0,4%) a cada dois dias e mantidas em cultura por não mais que 10 passagens.

4.4. Cultivo de fibroblasto embrionário murino.

Os FEM (Roslin Institute) foram cultivados em meio Dulbecco's modificado Eagle's Medium – DMEM (Gibco) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco) e filtrado em filtro de nitrocelulose de 0,45 µm (Millipore). As células foram descongeladas como descrito anteriormente e colocadas em garrafas 75 cm² banhadas previamente com solução de gelatina 0,1% (Sigma) em PBS. As células foram incubadas à 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂ e separadas utilizando tripsina/EDTA (0,4%) a cada três dias.

4.5. Transfecção de Células tronco embrionárias de murinos

4.5.1. Otimização da transfecção.

Para a padronização da transfecção, as CTE de murinos foram semeadas 24 horas antes do início do experimento em placas de 6 poços contendo 2 mL de meio de cultivo/poço. Foram utilizados dois reagentes: Fugene HD (Roche) e Lipofectamine 2000 (Invitrogen) em diferentes concentrações ($\mu\text{g DNA}$: μL de reagente) (Figura 4). As células foram plaqueadas na concentração de 5×10^5 células/poço e 1×10^6 células/poço, respectivamente. Para transfecção das células foi utilizado um fosfoglicerato quinase codificando GFP, o qual expressa essa proteína em qualquer tipo celular (pHS 4 PGK-GFP) (Roslin Institute).

Foi adicionado 2 μg de PGK-GFP (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) em 100 μL de OptiMEMI® Reduced Serum Medium (Invitrogen) misturado e incubado a temperatura ambiente por 30 minutos. Foram então, acrescentadas diferentes concentrações de Fugene HD (0, 3, 4, 5, 6 e 7 μL), misturando através de pipetagem. A solução foi incubada à temperatura ambiente durante 15 minutos e, após esse período a solução foi adicionada à placa.

De uma outra maneira, diferentes concentrações (1 e 3 μg) de PGK-GFP (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) foram diluídas em 250 μL de OptiMEMI® (Invitrogen). Várias concentrações de Lipofectamine 2000 (0, 2, 3, 5, 3, 5 μL) foram diluídas em 250 μL de OptiMEMI, misturadas e incubadas à temperatura ambiente por 5 minutos. As duas soluções foram misturadas e incubadas a temperatura ambiente durante 20 minutos, sendo posteriormente adicionadas à placa de cultivo.

Vinte e quatro horas após a transfecção, o meio foi removido e foi acrescentado meio de cultura fresco (item 4.3). As células foram analisadas em microscopia de fluorescência e citometria de fluxo 48 horas pós-transfecção para a verificação do melhor reagente a ser usado em CTE de murinos da linhagem B4 de acordo com os níveis de expressão do GFP.

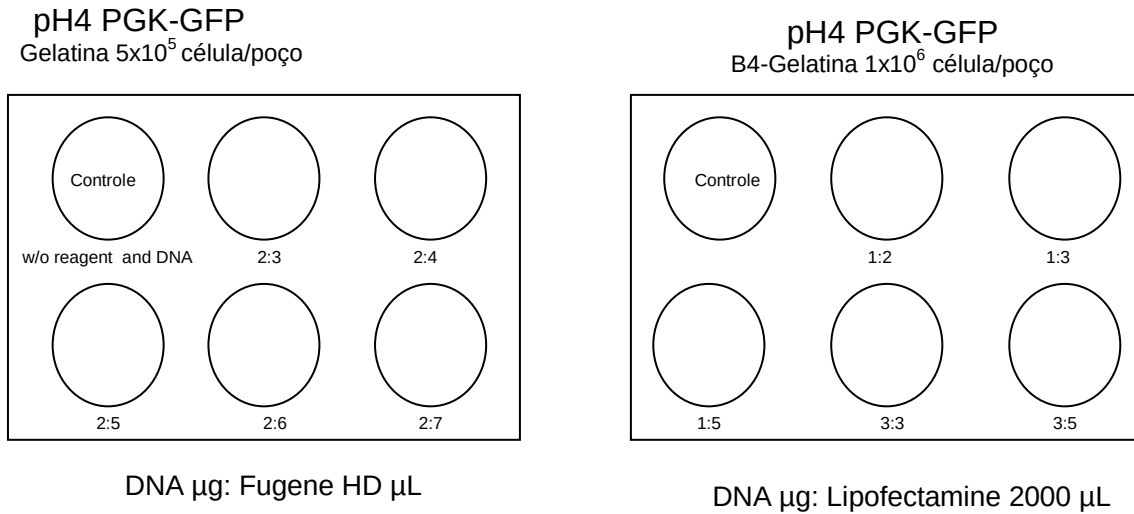


Figura 4: Delineamento para otimização da transfecção em CTE de murinos.

4.5.2. Transfecção transitória em CTE usando vetores plasmídiais sob o controle do promotor Oct-4 de camundongo e humano.

As CTE foram semeadas (1×10^6 células/poço) 24 horas antes da transfecção, em placas de 6 poços banhadas em gelatina de pele de suíno a 0,1% (Sigma). O reagente utilizado foi a Lipofectamina 2000 (Invitrogen) e as células foram transfectadas com os plasmídeos carreando o promotor Oct-4 de camundongo e humano, denominados de pLZ2-mOCT-EGFP e pLZ2-hOCT-EGFP, respectivamente, nas concentrações (3 µg de DNA: 5 µL de reagente). Foram feitos um controle negativo que conteve apenas células sem DNA e reagente e um controle positivo que utilizou o PGK-GFP (Figura 5).

Foram adicionados 3 µg do vetor pLZ2-mOCT-EGFP (1,45 µg/µL) e do vetor pLZ2-hOCT-EFP (1 µg/µL) diluídos em 250 µL de OptiMEMI® (Invitrogen). Da mesma forma, 5 µL Lipofectamine 2000 foi diluída em 250 µL de OptiMEMI e incubada à temperatura ambiente por 5 minutos. Foram então, misturadas as duas soluções de cada plasmídeo e incubadas à temperatura ambiente durante 20 minutos, sendo posteriormente adicionadas à placa de cultivo.

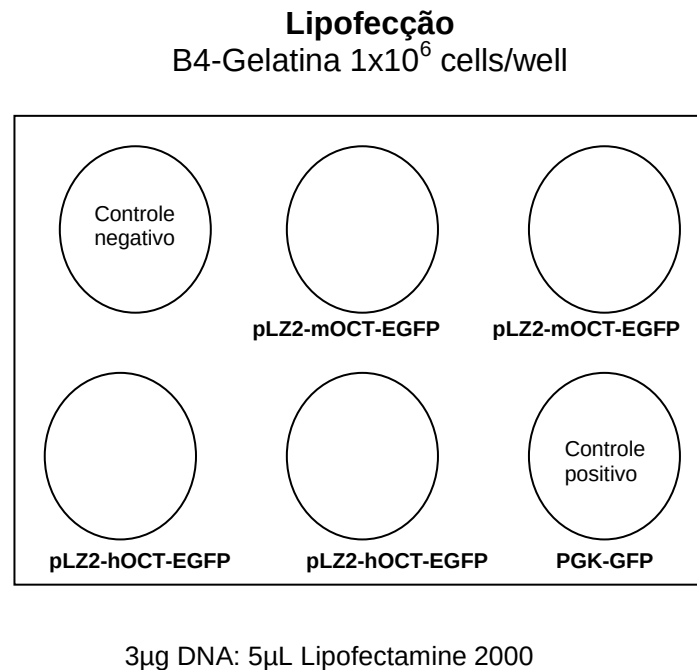


Figura 5. Delineamento da transfecção em CTE de murinos pelos vetores pLZ2-mOCT-EGFP e pLZ2-hOCT-EGFP. mOCT (mouse Oct-4 promoter); hOCT (human Oct-4 promoter).

4.5.3. Transfecções transitória e estável em CTE usando vetores plasmídiais sob o controle do promotor Oct-4 de equinos.

As CTE (5×10^5 células/poço) e os FEM (1×10^5 células/poço) foram semeados um dia antes da transfecção em placas de 6 poços banhadas em gelatina de pele de suíno a 0,1% (Sigma). Foram realizados dois tipos de transfecção: a transitória e a estável. O reagente utilizado foi a Lipofectamina 2000 (Invitrogen). Os FEM foram utilizados como controle negativo das células, pois não possuem pluripotência e não expressam a GFP (Figura 6).

Foram diluídos separadamente, em 250 µL de OptiMEM I® (Invitrogen), 3 µg do vetor pLZ2-mOCT-EGFP (1,45 µg/µL), do vetor pLZ2-hOCT-EGFP (1 µg/µL), do vetor pLZ2-ecOCT-EGFP (meq) (3,94 µg/µL) e do vetor pLZ2-ecOCT-EGFP (heq) (0,9 µg/µL). Como controle positivo da transfecção utilizaram-se 3µg do PGK-GFP (1 µg/µL). Diluíram-se 5 µL Lipofectamine 2000 em 250 µL de OptiMEM I, e incubou-se à

temperatura ambiente por 5 minutos. Misturam-se as duas soluções de cada plasmídeo que foram incubados à temperatura ambiente durante 20 minutos. Posteriormente, as soluções foram adicionadas à placa de cultivo.

Para integração estável dos vetores no genoma das CTE de murinos, 10 µg dos plasmídeos contendo promotor ecOCT (meq e h eq) foram linearizados pela enzima de restrição Scal (Roche). Dez microgramas dos plasmídeos com os promotores mOCT e hOCT foram digeridos pelas endonucleases de restrição ClaI e Scal (Roche), respectivamente. E dez microgramas do fosfoglicano quinase acoplado ao GFP, o pHS 4-PGK-GFP foi linearizado pela ApaLI (Biolab's-New England). Todas as reações foram incubadas à 37°C durante a noite. Antes da transfecção, os vetores foram purificados pelo kit QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen). Todos os plasmídeos contêm sítios de resistência ao antibiótico Blastidina (Sigma). Vinte e quatro horas após a transfecção, o meio de cultivo foi removido. Adicionou-se o meio seletivo contendo o meio de cultivo com o antibiótico Blastidina (5µg/mL). Esse meio seletivo foi trocado a cada dois dias. A observação das colônias resistentes positivas a expressão do GFP foi feita no quinto e nono dia pós-transfecção sob microscopia de fluorescência (Figura 7). Foram realizadas 3 repetições para a transfecção transitória e apenas uma repetição para a transfecção estável.

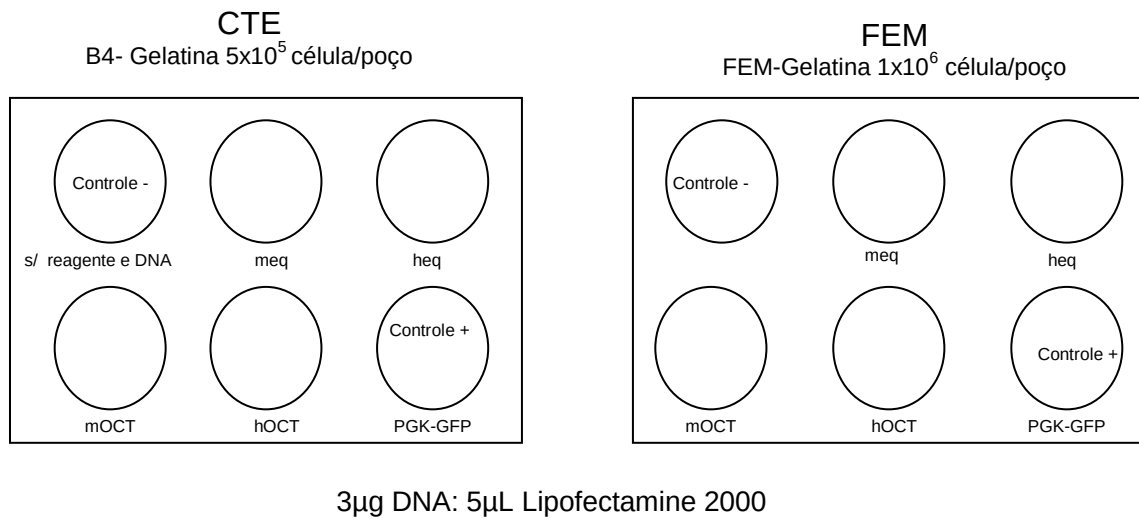


Figura 6. Delineamento da transfecção transitória e estável em CTE de murinos e FEM, pelos vetores pLZ2-mOCT-EGFP, pLZ2-hOCT-EFP, pLZ2-ecOCT-EFP(meq), pLZ2-ecOCT-EFP(heq). mOCT (mouse Oct-4 promoter); hOCT (human Oct-4 promote"); ecOCT (*eqqus caballus* Oct-4 promoter); meq (mouse equivalent); heq ("human equivalent).

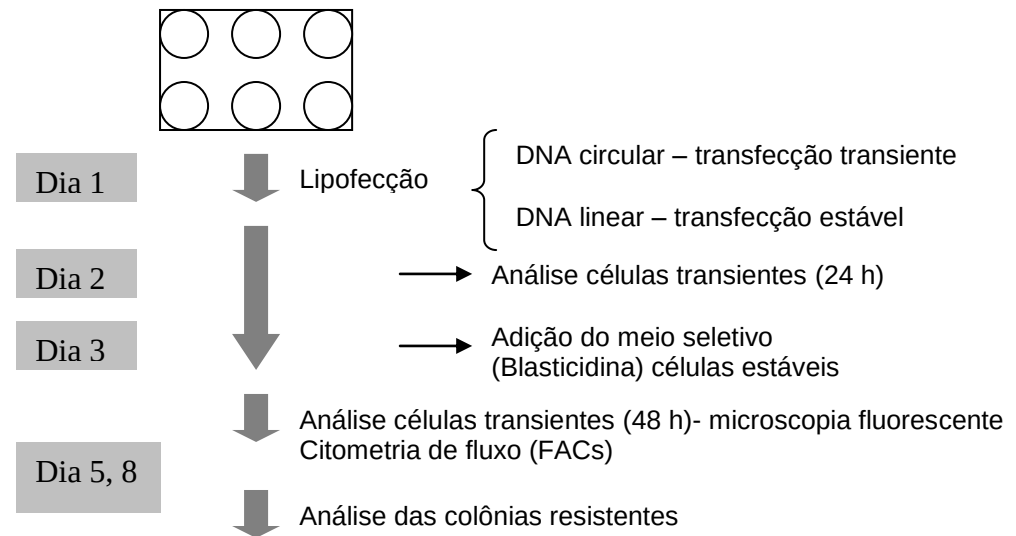


Figura 7. Esquema da transfecção em CTE de murinos usando os plasmídeos circular e lineralizado.

4.6. Formação das partículas virais

O processo de produção dos lentivírus levou em média quatro dias, conforme descrito abaixo.

4.6.1. Semeadura das células HEK 293 T (“human embryonic kidney”) (Dia 1).

Os vetores lentivirais foram produzidos em células HEK 293T geradas pela transformação de rim embrionário humano (“human embryonic kidney”- HEK) de culturas celulares com o adenovírus 5DNA (GRAHAM et al., 1977).

Foram cultivadas $1,6 \times 10^6$ células HEK 293T em garrafas de cultivo 25 cm² em meio de cultura Dulbecco's modificado (DMEM GlutaMaxI 1x) (Sigma) contendo 10% de soro fetal bovino (Gibco) (denominado meio de cultura-CV) à 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. Essas células possuem uma rápida taxa de crescimento. Ao atingirem 70-85% de confluência, geralmente no dia seguinte à semeadura, foram destinadas à produção dos lentivetores.

Quando as células não foram utilizadas para a produção das partículas virais foram lavadas com 10ml de PBS (Sigma) repicadas com 1,5 mL de tripsina (TrypLE® Express- Sigma), neutralizadas com o meio CV. Desta maneira, as células foram sucessivamente pipetadas até o total desprendimento da camada celular. A seguir, a suspensão celular foi colocada em volume apropriado ao tamanho das garrafas a serem utilizadas para novos cultivos para aplicar neste experimento ou em outros.

4.6.2. Empacotamento dos vetores lentivirais (“Packaging”)

Em tubos de 1,5 mL foi preparada a solução de transfecção. Foi adicionado o sistema plasmídico: 2 µg de psPAX2, 1 µg VSV-G e 1,5 µg do plasmídeo recombinante e, 17 µL de Eugene HD (Roche) diluídos em 145 µL de OptiMEM I ® (Invitrogen). Homogeneizou-se a solução de transfecção. Após esse procedimento, a solução foi incubada à temperatura ambiente por 20 minutos. Posteriormente, a solução de transfecção foi adicionada ao meio CV das células de encapsulação, sendo

estas incubadas à 37°C durante 24 horas (Dia 2). Após esse período (Dia 3) o meio foi removido e colocado em tubo de polipropileno de 15mL e estocado a 4°C. Foram adicionados 5 mL de meio CV fresco às células transfectadas e estas foram novamente incubadas a 37°C durante 24 horas. No dia seguinte (Dia 4), o meio foi removido novamente da garrafa de cultivo e acrescentado em tubos de 15 mL juntamente com o meio estocado do dia anterior (Dia 3). Essa mistura foi filtrada em membrana de nitrocelulose de 0,45 µm (Millipore). A mistura viral foi transferida para ultra tubos refrigerados e centrifugados (XL70 ultracentrífuga) a 20.000 rpm durante 2 horas. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi resuspenso em 100 µL de tampão TSSM cloreto de sódio (100 mM), Tris, pH 7,3 (20 mM), sacarose (10 mg/ml) e manitol (10 mg/ml). Alíquotas de 10 µL de suspensão foram armazenadas à -80°C.

Nas células empacotadoras contendo a mistura viral com os vetores pLZ2-ecOCT-EGFP (meq) e (heq), 48 horas após a transfecção (Dia 4), o meio foi coletado e centrifugado a 1000g por 5 minutos. O sobrenadante separado do sedimento foi filtrado em membrana de nitrocelulose de 0,45 µm (Millipore), alíquotado em 1 mL de suspensão e armazenado à -80°C.

4.6.3. Titulação viral

Para este experimento, 24 horas antes da titulação (Dia 1), células HT1080 (D17) foram semeadas em placas de 12 poços na concentração de 4×10^4 células /poço cobertas com meio de cultura CV (item 4.6.1.) e incubadas à 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂ (Dia 1). No dia da titulação, foi adicionado a 10 µL da suspensão viral (item 4.6.2.), 990 µL de meio CV homogeneizando a mistura. Em placas de 12 poços contendo 800 µL de meio CV foram feitas as diluições seriadas (10^{-3} a 10^{-8}) do vírus. As células D17 foram infectadas e incubadas à 37°C por 4 horas. Foram então, acondicionadas por 10 dias em estufa contendo 5% de CO₂ à 37°C. A cada dois dias o meio de cultura foi trocado e foram adicionados 2 mL de meio seletivo contendo meio CV e o antibiótico blasticidina (10 mg/mL). Após 10 dias de cultivo, foram verificadas e quantificadas a presença de colônias Blasticidina positivas, contando o número de colônias resistentes nos poços e multiplicando pelos respectivos

fatores de diluição. O título (p.i./ml) foi de 6×10^6 p.i./ml para pLZ2-mOCT-EGFP e $1,4 \times 10^7$ p.i./ml pLZ2-hOCT-EGFP.

4.7. Transdução das células tronco embrionárias de murinos com vetores lentivirais.

Foram feitos dois experimentos de transdução, os quais estão descritos abaixo.

Experimento I: As CTE foram infectadas com os vetores lentivirais pLZ2-mOCT-EGFP e pLZ2-hOCT-EGFP em diluições seriadas (10^2 - 10^4) e as colônias GFP positivas foram isoladas pela adição de meio seletivo contendo o antibiótico blasticidina ($7,5 \mu\text{g/mL}$) (Figura 8). A expressão do gene reporter GFP foi analisada por microscopia de fluorescência a partir do terceiro dia até o décimo dia pós-transdução.

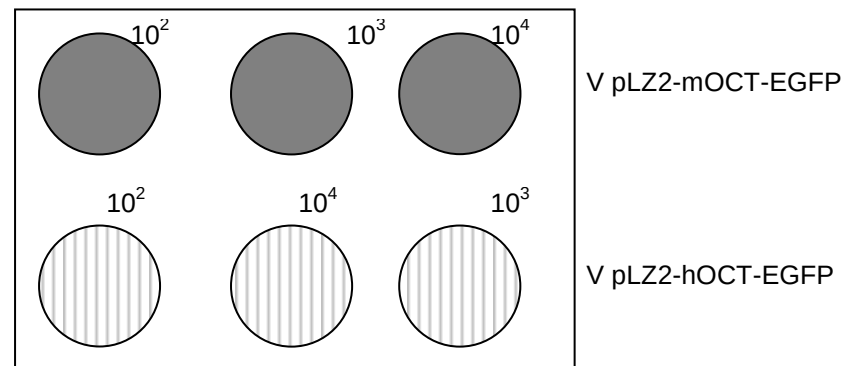


Figura 8. Delineamento transdução em CTE de murinos pelos vetores pLZ2-mOCT-EGFP e pLZ2-hOCT-EFP. mOCT (mouse Oct-4 promoter); hOCT (human Oct-4 promoter).

Experimento II: Foram infectados CTE e FEM com os vetores lentivirais pLZ2-ecOCT-EGFP (meq) e (heq) utilizando 1 mL de vírus diluídos em 1 mL de meio de cultura de CTE. (Figura 9). Os FEM foram usados como controle negativo para a expressão do GFP. Foi verificada a expressão do GFP, pelo microscópio de fluorescência do terceiro dia até o décimo dia pós-transdução.

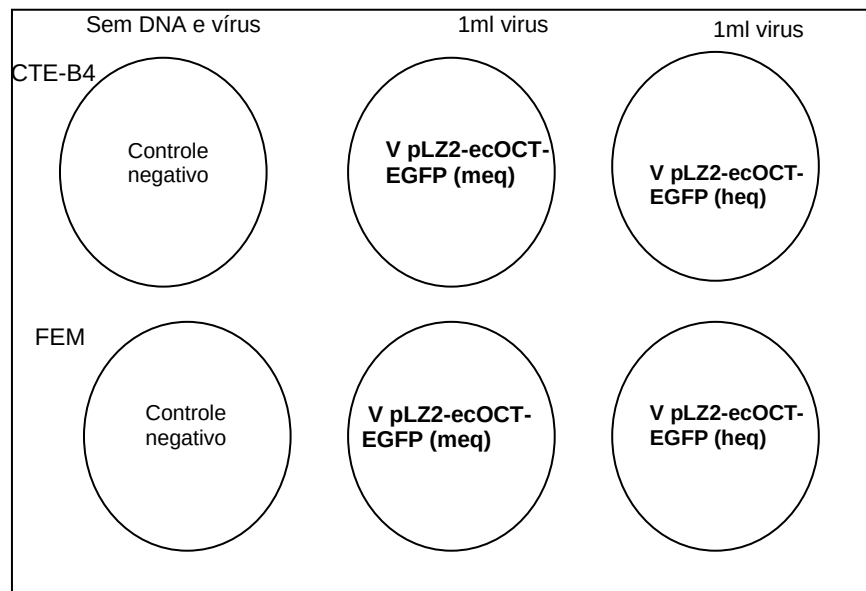


Figura 9. Delineamento da transdução em CTE de murinos e FEM, pelos vetores pLZ2-ecOCT-EGFP(meq) e pLZ2-ecOCT-EGFP(heq). ecOCT (*eqqus caballus* Oct-4 promoter); meq (mouse equivalent); heq (human equivalent).

4.7.1. Lentivetores com Oct-4/GFP de camundongo e humanos.

As CTE foram semeadas 24 horas antes da transdução em placas de 6 poços banhadas em gelatina de pele de suíno a 0,1% (Sigma) na concentração de 5×10^5 células/poço e incubadas em estufa à 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. Foram feitas diluições seriadas do vírus (10^2 a 10^4) que foi adicionado a 500 µL de meio de cultivo de CTE suplementado com Polibreno (8 µg/mL). As células foram infectadas por 4 horas, sendo então removida a suspensão viral e adicionado meio de cultura fresco. As células foram incubadas em estufa à 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂ (Dia -1). No dia seguinte a esse procedimento (Dia +1), o meio foi novamente removido da placa e foi adicionado o meio seletivo contendo 7,5 µg/mL de Blastidina (Invitrogen). Este meio seletivo foi trocado a cada dois dias até o décimo dia de cultivo. Do terceiro ao décimo dia de cultivo, as células foram observadas para a verificação da porcentagem de células que sobreviveram e para a análise da expressão das colônias GFP positivas resistentes à Blastidina.

4.7.2. Lentivetores com Oct-4/GFP de eqüino.

Para a transdução *in vitro*, as CTE (5×10^5 células/poço) e os FEM (1×10^5 células/poço) foram semeados na mesma placa de 6 poços. No dia da transdução, 1 mL de suspensão contendo partículas virais foi previamente diluído em meio de cultivo de CTE e FEM, respectivamente acrescidos de Polibreno (8 ug/mL). As células foram incubadas a 37°C e 5% de CO₂ em ar e umidade com suspensão viral por 4 horas. Após este período, o meio contendo a suspensão viral foi retirado e substituído por meio de cultivo de CTE e FEM, respectivamente. A partir do terceiro ao décimo dia pós-transdução, foi observada a expressão da GFP nas células.

4.8. Análise de microscopia

Suspensões simples de células foram preparadas com a remoção do meio de cultura e adição de 500 µL/poço de PBS (Sigma) para melhor visualização das células. Posteriormente, as células foram preparadas para análise em citômetro de fluxo (item 4.9.).

A fluorescência do gene reporter GFP foi avaliada 48 horas após transfecção em células transitórias. Nas células estáveis, a expressão do GFP foi observada nos dias cinco e oito pós-transfecção. Foi utilizado o microscópio de fluorescência (Nikon, TE2000 – Japão) com filtro-excitação 488 nm e filtro de emissão de 510 a 560 nm.

4.9. Análise pelo citômetro de fluxo (“FACs”).

As células foram tripsinizadas em 100 µL 0,4% tripsina/EDTA (Sigma) e resuspendidas em 1 mL de PBS (Sigma). As células não-fluorescentes e as células que expressaram o GFP foram isoladas usando o Becton Dickinson FACS Vantage (Becton–Dickinson - USA).

4.10. Análise estatística

Para avaliar o efeito dos promotores Oct-4 de camundongo, humano e eqüino sobre as células tronco embrionárias de murinos transfectadas, os dados foram analisados pela fração de células que expressaram o GFP 48 horas pós-transfecção, reportadas em termos de percentagem. Foi aplicada análise de variância (ANOVA). Posteriormente, foi aplicado o teste de Tukey para a comparação múltipla das médias. A análise estatística foi efetuada empregando-se o programa “Statistical Analysis System” (SAS Institute Inc., 1989), SAS/STAT Software, Release 8.2 Cary: SAS Institute Inc. (LITTELL et al., 1996).

5. Resultados

5.1. Construção dos vetores plasmidiais e clonagem.

Na Figura 10 pode ser observado o produto da digestão do vetor pLZ2-hOCT-EGFP (1 µg/µL) pelas enzimas de restrição *EcoRV* e *Sall*. Foi usado, na primeira canaleta, um controle (sem enzima). Na segunda canaleta mostra o vetor não digerido pela ação da *EcoRV*, pois este não apresenta sítio de corte para esta enzima e assim, possui o mesmo padrão do controle. A terceira canaleta confirma linearização do vetor pela *Sall* (11.040 pb) de acordo com único sítio de restrição para esta enzima no mapa do vetor (Apêndice – Figura 1).

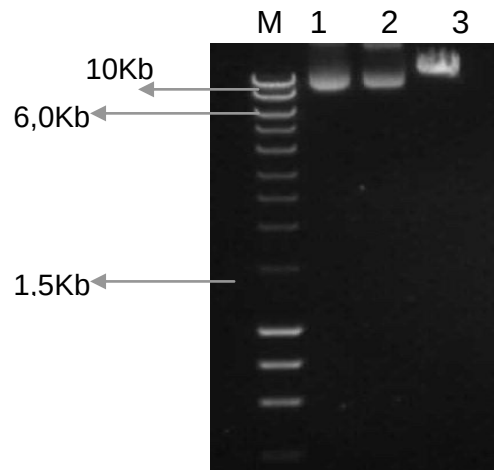


Figura 10. Eletroferograma em gel de agarose a 1% corado com “SYBR-safe® DNA gel strain” (Invitrogen), demonstrando a digestão resultante do vetor pLZ2-hOCT-EGFP (11.040 pb) pela enzima de restrição *EcoRV* (não digerido) e identificado pela ação da enzima de restrição *Sall*. M = marcador molecular: Hyper Ladder I (Bioline) 10.000 pb; 1 = sem enzima; 2 = digestão com a enzima *EcoRV* e 3 = digestão com a enzima *Sall*;

O plasmídeo pLZ2-EGFP foi analisado após retirada do fragmento do promotor de humanos e reação de acoplamento com o ligante (“linker”). Foi realizada a digestão de três clones (número 1, 2 e 3). Identificando o vetor pLZ2-linker-EGFP nos clones de número 1 e 2 (Figura 11), de acordo com os sítios de cortes da sequência do vetor analisados previamente (Apêndice – Figura 2).

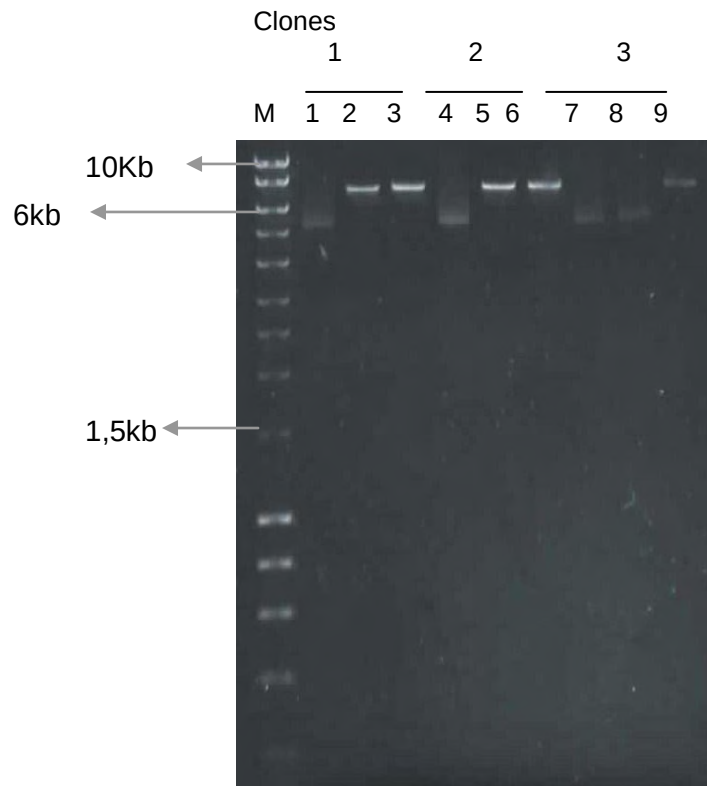


Figura 11. Eletroferograma em gel de agarose a 1% corado com “SYBR-safe® DNA gel strain” (Invitrogen), demonstrando a digestão dos três clones positivos (1, 2 e 3) resultantes do vetor pLZ2-linker-EGFP (7.088 pb) pelas enzimas de restrição *EcoRV* e *SalI*. M = Marcador molecular: Hyper Ladder I (Bioline) 10.000pb. 1, 2 e 3 = clones. Cada clone possui três canaletas: a primeira (sem enzima), a segunda (*EcoRV*) e a terceira (*SalI*).

Após ser subclonado, o clone do vetor recombinante pLZ2-mOCT-EGFP foi analisado pela ação da endonuclease *BamHI* (Figura 12) Foram identificados os fragmentos do plasmídeo (7693pb) e do promotor mOCT (1296pb), de acordo com os dois sítios de corte ambos situados na sequência do promotor mOCT (Apêndice – Figura 3).

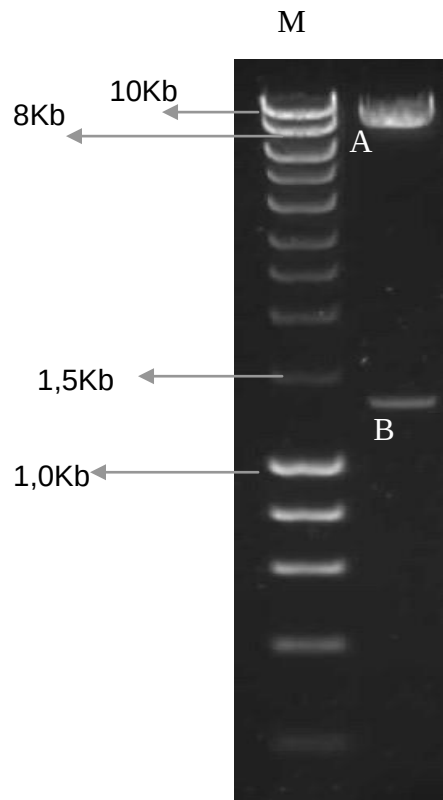


Figura 12. Eletroferograma em gel de agarose a 1% corado com “SYBR-safe® DNA gel strain” (Invitrogen), demonstrando a digestão de um clone do vetor recombinante pLZ2-mOCT-EGFP (8.989 pb) pela enzima de restrição *BamHI*. M = Marcador molecular: Hyper Ladder I (Bioline) 10.000pb. Fragmento A = plasmídeo (pLZ2-EGFP); fragmento B = inserto (promotor mOCT).

Os clones do vetor recombinante pLZ2-ecOCT-EGFP (meq) foram verificados pela ação da endonuclease de restrição *BamHI* e *Clal*. O recombinante possui apenas um sítio de restrição para *BamHI* em sua sequência, localizado no promotor ecOCT(meq) (1735pb). Desta forma, o clone 1 parece ser compatível com a sequência desejada (Figura 13). Da mesma maneira, os clones do plasmídeo recombinante pLZ2-ecOCT-EGFP (heq) foram analisados pela ação de *BamHI*, que também possui apenas um sítio de corte situado no promotor ecOCT (heq) (3237pb). Os clones 2 e 3 se mostram positivos para a sequência de interesse (Figura 13). Foram

feitas duas reações de digestão: *BamHI* e *BamHI/ClaI*. Ambos vetores possuem apenas um sítio de corte para *ClaI* localizado no plasmídeo - pLZ2-EGFP (4pb) (Apêndice – Figuras 4 e 5).

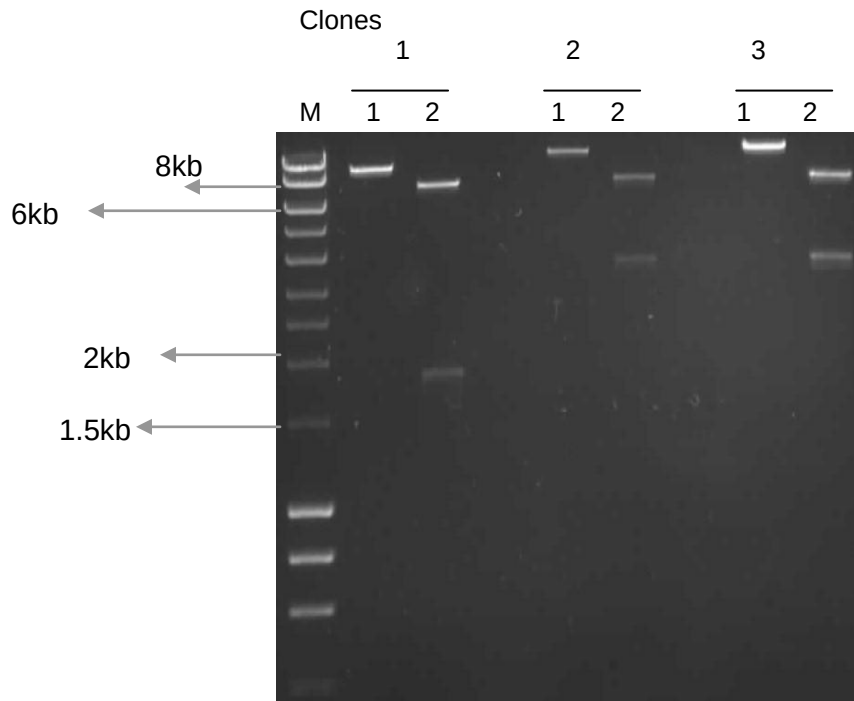


Figura 13. Eletroferograma em gel de agarose a 1% corado com “SYBR-safe® DNA gel strain” (Invitrogen), demonstrando avaliação do clone 1 para o vetor pLZ2-ecOCT-EGFP (meq); e dos clones 2 e 3 para o vetor pLZ2-ecOCT-EGFP (heq). Cada clone possui duas canaletas: a primeira representa a digestão pela enzima de restrição *BamHI* e a segunda mostra a digestão pelas endonucleases de restrição *BamHI* e *ClaI*. M = Marcado molecular: Hyper Ladder I (Bioline) 10.000 pb.

5.2. Transfecção em Células Tronco Embrionárias de Murinos.

5.2.1. Otimização da transfecção.

Para a padronização da transfecção, na tentativa de se obter uma maior eficiência na transfecção de células tronco embrionárias de murinos da linhagem B4, foram testados dois reagentes, Eugene HD (Roche) e Lipofectamine 2000 (Invitrogen), juntamente com o vetor pHS 4 PGK-GFP. Pode-se verificar (Figura 14) que para CTE transfectadas pelo Eugene HD na proporção 2:6 e 2:7 houve melhor expressão da GFP. Da mesma maneira, foi avaliada melhor proporção do reagente Lipofectamina 2000 nas CTE transfectadas. Observou uma grande quantidade de células GFP positivas nas proporções 1:5 e 3:5 (Figura 15). No entanto, a citometria de fluxo revelou uma melhor taxa de transfecção quando se utilizou a proporção 2 µg de DNA : 7 µL de Eugene HD e a proporção de 3 µg de DNA : 5 µL de Lipofectamine 2000 (Figura 16).

Depois de analisadas as taxas de transfecção de cada reagente, comparou-se a maior percentagem de expressão da GFP entre as melhores proporções. Desta forma, o reagente Lipofectamina 2000 se mostrou mais eficiente (33,3%) que o reagente Eugene HD (28,2%) (Figura 16). Devido a isto, o reagente Lipofectamina 2000 foi utilizado para a transfecção das CTE com os plasmídeos recombinantes.

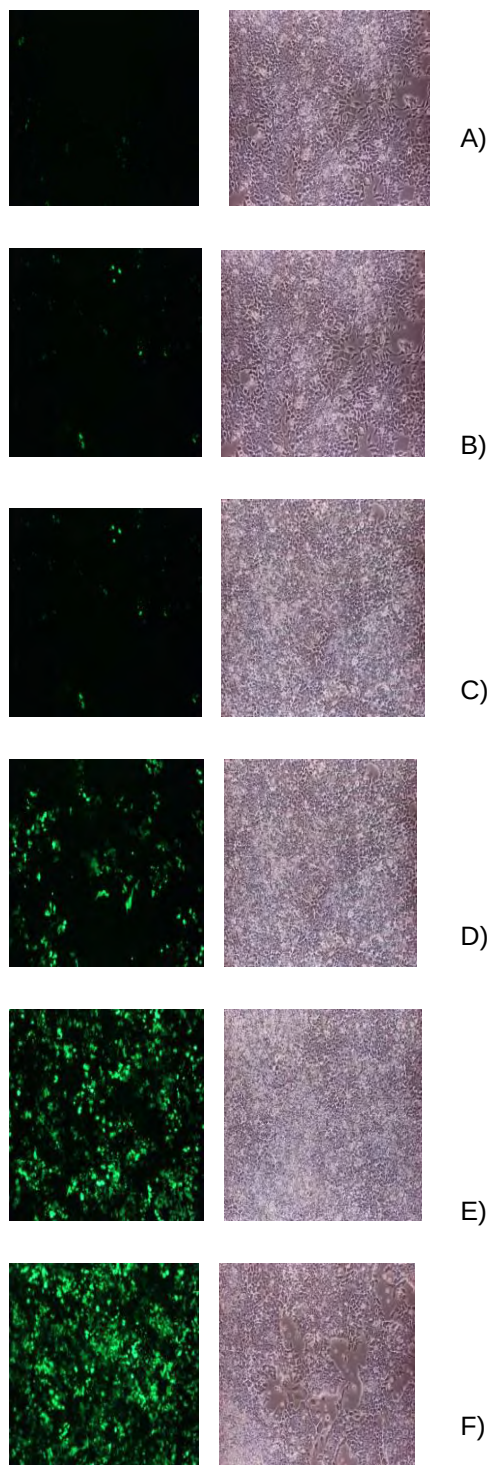


Figura 14. Transfecção transitória em CTE de murinos usando Fugene HD (Roche) com vetor pHS4 PGK-GFP. A) controle (sem DNA e reagente). Várias diluições de μg DNA: μL reagente. B) 2:3, C) 2:4, D) 2:5, E) 2:6 e F) 2:7. Acima visualização das células GFP positivas 48 horas pós-transfecção em microscopia de epifluorescência. Abaixo corresponde a visualização das CTE em contraste de fase. Aumento de 40x.

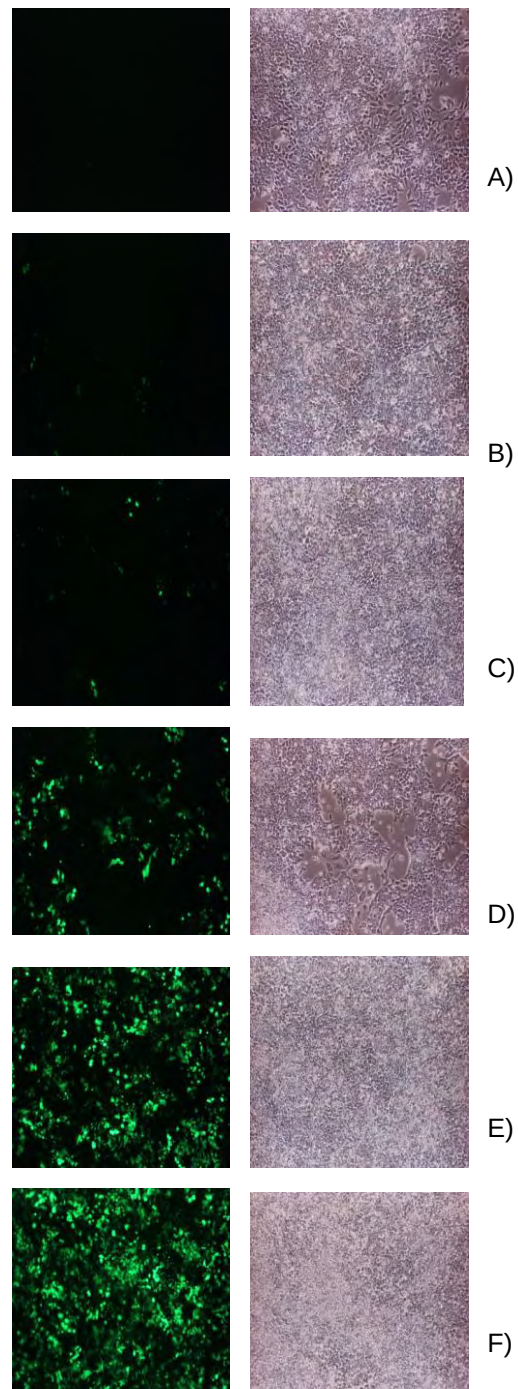


Figura 15. Transfecção transitória em CTE de murinos usando Lipofectamine 2000 (Invitrogen) com vetor PGK-GFP. A) controle (sem DNA e reagente). Várias diluições de $\mu\text{g DNA} : \mu\text{L reagente}$. B) 1:2, C) 1:3, D) 1:5, E) 3:3 e F) 3:5. Acima visualização das células GFP positivas 48 horas pós-transfecção em microscopia de epifluorescência. Abaixo corresponde a visualização das CTE em contraste de fase. Aumento de 40x.

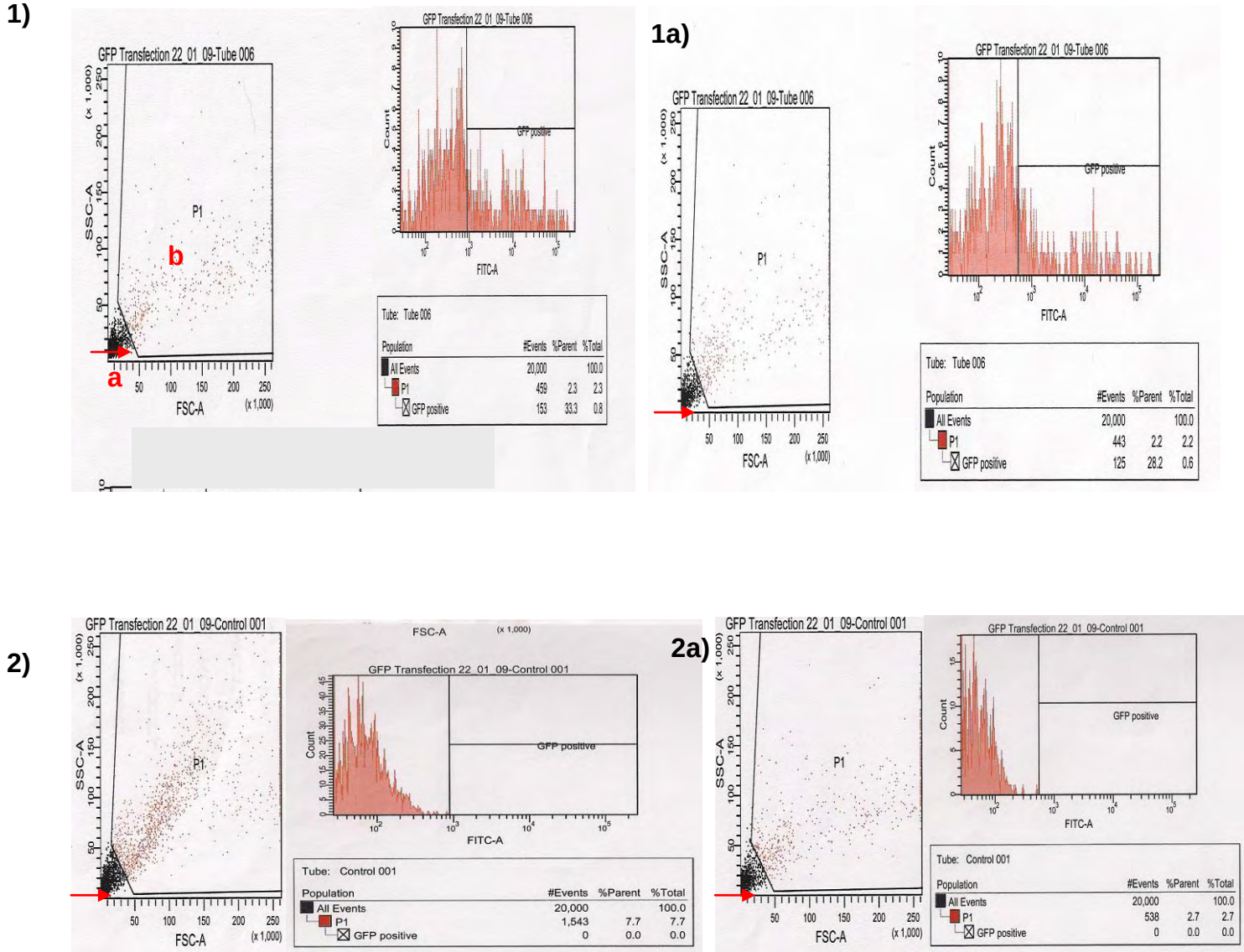


Figura 16. Citometria de fluxo para direcionar a expressão do gene da GFP (CTE), mostrando a melhor taxa de expressão da GFP: 1) quando foi usada a proporção 2 µg DNA: 7µL de Fugene HD e 1a) controle; 2) quando foi usada a proporção 3 µg DNA: 5 µL de Lipofectamine 2000 e 2a) controle. a) população de células não analisadas para a expressão da GFP - debris (seta); b) população de células analisadas para expressão da GFP. Figura escaneada.

5.2.2. Transfecção transitória em CTE usando vetores plasmídiais sob o controle do promotor Oct-4 de camundongo e humano.

Após padronização do melhor reagente a ser utilizado na transfecção das CTE de murinos, foram testadas como controle as construções dos vetores plasmídicos contendo o promotor Oct-4 de camundongo e humanos. Ainda não havia sido verificada a eficiência do plasmídeo derivado HIV-1 (pLZ2-EGFP) como carreador de genes para o interior das CTE de murinos.

Dois dias após a transfecção (48 horas) verificou-se uma excelente taxa de expressão de células GFP positivas tanto para CTE transfectadas pelo vetor pLZ2-mOCT-EGFP (18,8%) quanto para o vetor pLZ2-hOCT-EGFP (21,9%), quando comparadas com o controle positivo (55,6%) (Figura 17). Adicionalmente, pode-se visualizar grande quantidade de células GFP positivas tanto para pLZ2-mOCT-EGFP quanto para pLZ2-hOCT-EGFP. Assim, os resultados demonstraram uma grande eficiência dos plasmídeos pLZ2-mOCT-EGFP e pLZ2-hOCT-EGFP em transfectar CTE de murinos da linhagem B4.

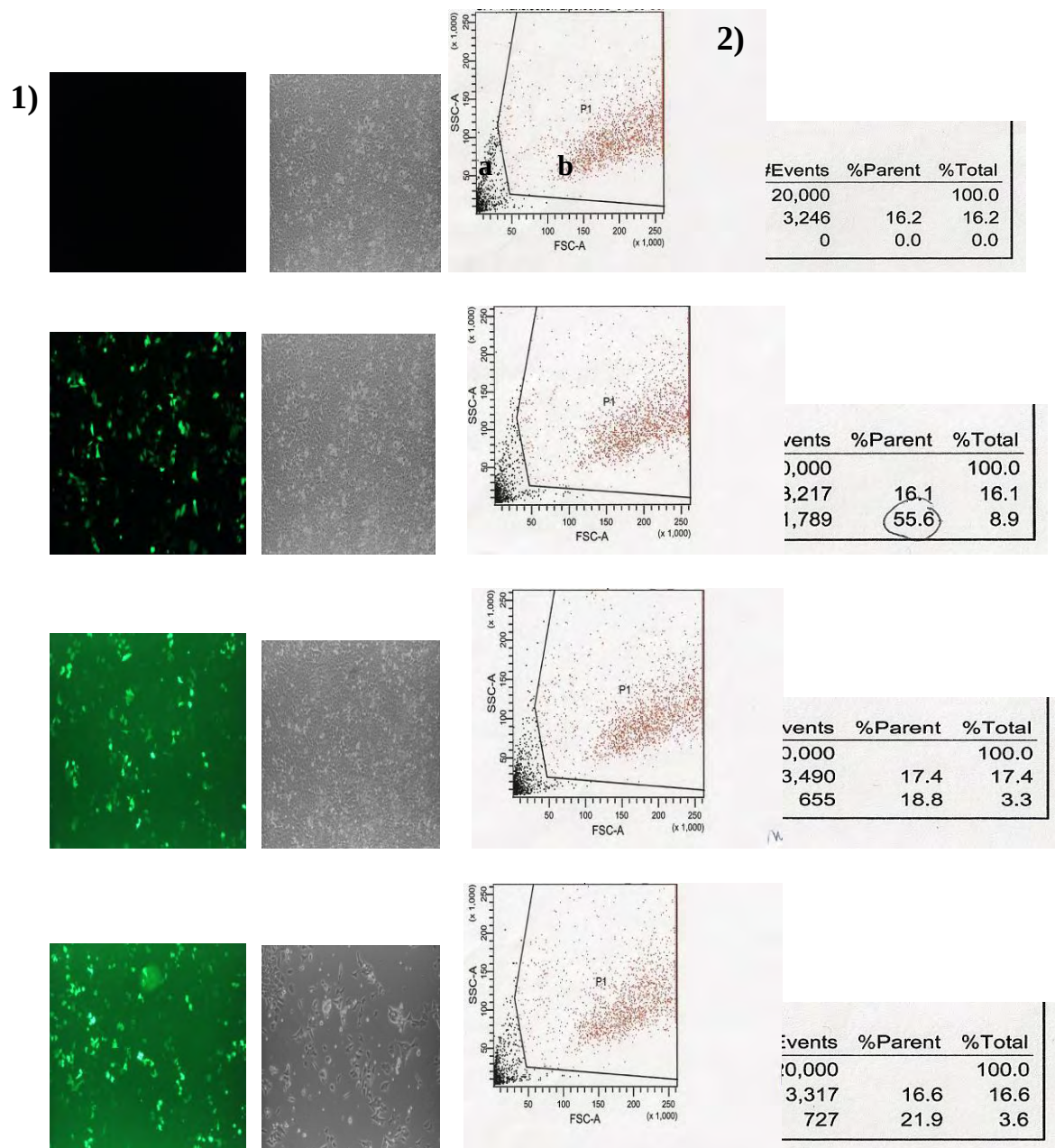


Figura 17. Transfecção transitória em CTE de murinos usando Lipofectamine 2000 (Invitrogen) 3 µg DNA: 5 µL reagente: 1) Visualização das células GFP positivas 48 horas pós-transfecção em microscopia de epifluorescência. Aumento de 40x. Acima fluorescência e abaixo contraste de fase. A) controle negativo (sem DNA e reagente), B) controle positivo (PGK-GFP), C) vetor pLZ2-mOCT-EGFP e D) vetor pLZ2-hOCT-EGFP. 2) Citometria de fluxo para direcionar a expressão do gene da GFP (CTE). a) debris; b) população de células positivas para expressão da GFP. Figura escaneada

5.2.3. Transfecções transitória e estável em CTE usando vetores plasmídiais sob o controle do promotor Oct-4 de eqüinos.

Para a análise e comparação das quatro construções de vetores, pLZ2-mOCT-EGFP, pLZ2-ecOCT-EGFP (meq) e pLZ2-ecOCT-EGFP (heq) e (pLZ2-hOCT-EGFP), foram feitos dois experimentos.

No experimento I, tanto a análise de microscopia e citometria não revelou uma grande quantidade e expressão das células GFP positivas para todos os vetores (Figuras 18 e 19). Para o vetor pLZ2-ecOCT-EGFP (heq), nenhuma célula GFP positiva foi visualizada. Na análise de citometria de fluxo não houve diferença significativa ($P > 0,05$) entre os grupos (meq, mOCT e hOCT) em relação ao controle positivo, porém estes o grupo heq diferiu significativamente ($P < 0,05$) do e controle positivo (Tabela 1). Não foram encontradas diferenças estatísticas ($P > 0,05$) pela análise de citometria de fluxo entre os grupos em relação ao controle negativo quando foram transfectados FEM, da mesma forma nenhuma expressão da GFP foi visualizada com os promotores e o controle negativo (Tabela 1 e Figura 20, respectivamente).

No experimento II, foi possível a observação de poucas colônias resistentes GFP positivas 7 dias após transfecção nos grupos: controle positivo - PGK-EGFP; vetor pLZ2-hOCT-EGFP; vetor pLZ2-mOCT-EGFP e vetor pLZ2-ecOCT-EGFP (meq) (Figura 22). O promotor ecOCT(heq) não direcionou a expressão da GFP (Figura 21).

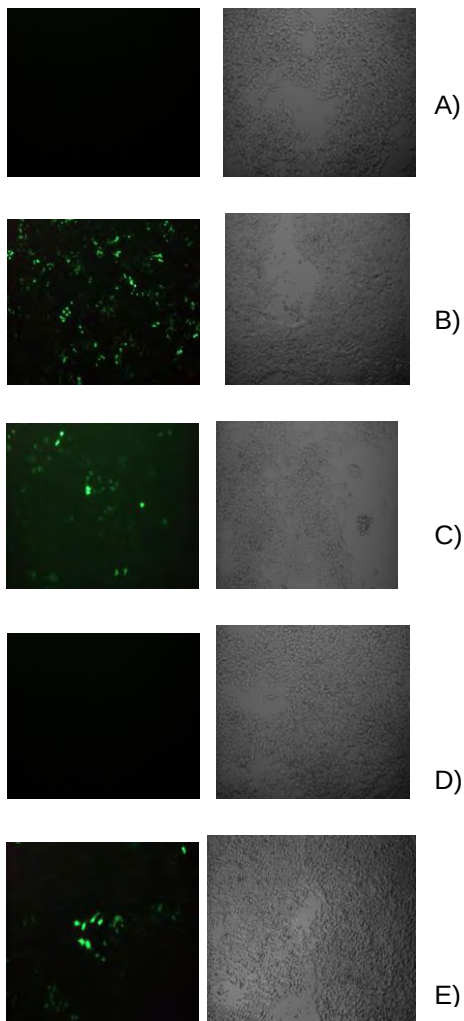


Figura 18. Transfecção transitória em CTE de murinos usando Lipofectamine 2000 (Invitrogen) 3 μ g DNA: 5 μ L reagente. A) controle negativo (sem DNA e reagente), B) controle positivo PGK-EGFP, C) vetor pLZ2-ecOCT-EGFP (meq), D) vetor pLZ2-ecOCT-EGFP (heq), E) vetor pLZ2-mOCT-EGFP e F) vetor pLZ2-hOCT-EGFP. Visualização das células GFP positivas 48 horas pós-transfecção em microscopia de epifluorescência. Aumento de 40x. Acima: fluorescência, abaixo: contraste de fase.

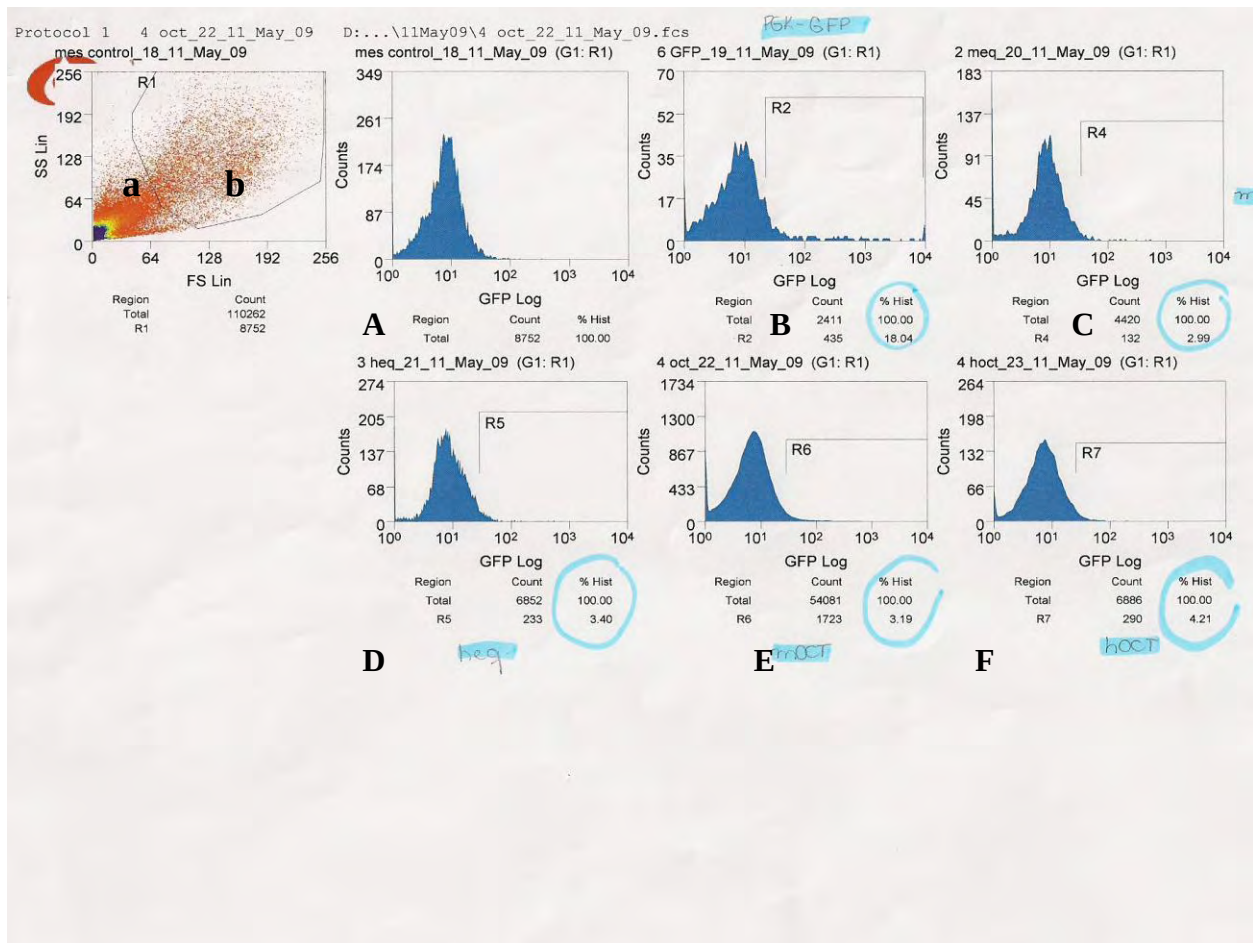


Figura 19. Citometria de fluxo para direcionar a expressão do gene da GFP (CTE). a) debris; b) população de células analisadas para expressão da GFP. A) controle negativo (sem DNA e reagente), B) controle positivo (PGK-EGFP), C) vetor pLZ2-ecOCT-EGFP (meq), D) vetor pLZ2-ecOCT-EGFP (heq), E) vetor pLZ2-mOCT-EGFP, F) vetor pLZ2-hOCT-EGFP. Região delimitada por R2, R4, R5, R6 e R7: mostra a intensidade de expressão da GFP. Figura escaneada.

Tabela 1. Percentagem de células GFP positivas 48 horas pós-transfecção em células tronco embrionárias de murinos (CTE) e fibroblasto embrionário de murino (FEM) pela citometria de fluxo.

Grupos	Expressão GFP em CTE (% Média $\pm$ EPM)	Expressão GFP em FEM (% Média $\pm$ EPM)
Neg. (Controle)	0,04 $\pm$ 0,4 ^b	0,21 $\pm$ 2,1 ^b
PGK-GFP	18,22 $\pm$ 12,6 ^a	16,80 $\pm$ 26,5 ^a
ecOCT(meq)	6,07 $\pm$ 42,2 ^{ab}	0,52 $\pm$ 3,8 ^b
ecOCT(hcq)	3,25 $\pm$ 16,8 ^b	0,48 $\pm$ 2,7 ^b
mOCT	6,09 $\pm$ 27,8 ^{ab}	0,53 $\pm$ 4,0 ^b
hOCT	6,67 $\pm$ 34,5 ^{ab}	0,52 $\pm$ 3,5 ^b

^{ab} médias seguidas de letras minúsculas diferentes, na coluna, diferem entre si pelo teste de Tukey ($P > 0,05$). Contr. Neg. = controle negativo (sem DNA e reagente); PGK-GFP = controle positivo; ecOCT(meq) = pLZ2-ecOCT-EGFP (mouse equivalent sequence); ecOCT(hcq) = pLZ2-ecOCT-EGFP (human equivalent sequence); mOCT = pLZ2-mOCT-EGFP (Oct-4 mouse promoter); hOCT = pLZ2-hOCT-EGFP (Oct-4 human promoter).

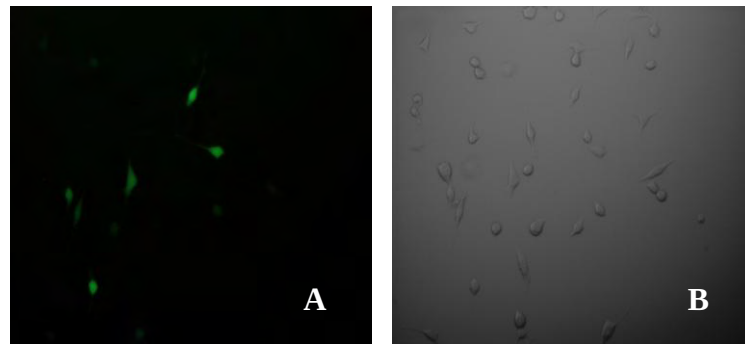


Figura 20. Transfecção transitória em FEM usando Lipofectamine 2000 (Invitrogen) 3 μ g DNA: 3 μ L reagente. Controle positivo - pHS 4 PGK-EGFP; visualização das células GFP positivas 48 horas pós-transfecção em microscopia de epifluorescência. Aumento de 40x. A) fluorescência; B) contraste de fase; FEM (fibroblasto embrionário de murinos).

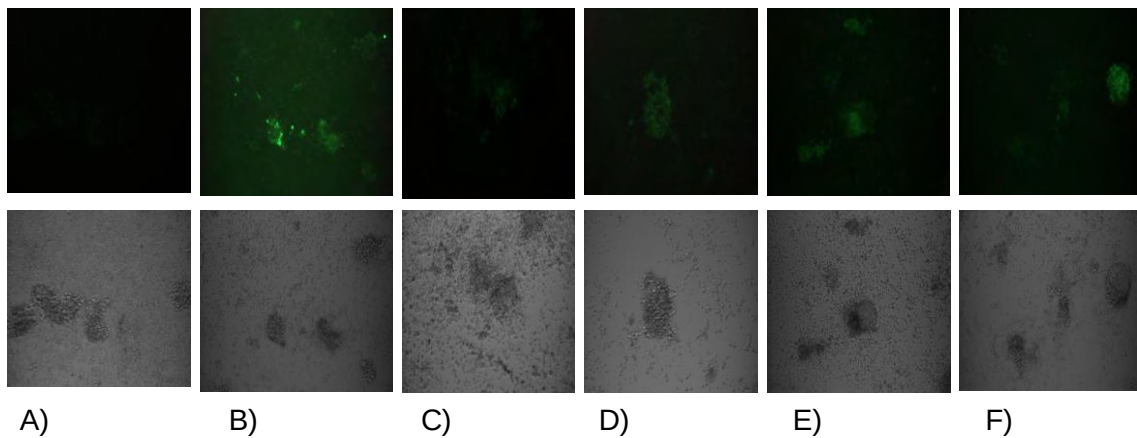


Figura 21. Transfecção estável em CTE de murinos usando Lipofectamine 2000 (Invitrogen) 3 μ g DNA : 5 μ L reagente. A) controle negativo (sem reagente e DNA); B) controle positivo (PGK-EGFP); C) pLZ2-ecOCT-EGFP (meq); D) vetor pLZ2-ecOCT-EGFP (heq); E) pLZ2-mOCT-EGFP e F) vetor pLZ2-hOCT-EGFP. Visualização das colônias Blastidina-resistentes GFP positivas 7 dias pós-transfecção em microscopia de epifluorescência. Aumento de 100x. Acima: fluorescência; abaixo: contraste de fase.

5.3. Transdução em CTE com os vetores lentivirais recombinantes promotor mOCT e hOCT.

Após a transdução, as células da linhagem Bruce 4 foram avaliadas por microscopia de fluorescência (aumento de 40 e 100X) a partir do terceiro dia pós-infecção. Foram observadas as primeiras colônias GFP positivas a partir do sexto dia pós-transfecção nas células infectadas com a maior concentração viral (diluição 10^2). Somente as células transduzidas pelo vetor pLZ2-mOCT-EGFP ao sexto dia pós-infecção mostraram a expressão do GFP (Figura 23). Sete dias pós-infecção foram verificadas a formação de reduzido número colônias positivas para o vetor pLZ2-hOCT-EGFP. Enquanto, que se observou a presença maior de colônias GFP positivas para o vetor pLZ2-mOCT-EGFP (Figura 23). No entanto, a expressão do GFP aumentou ao longo do tempo em que as células foram cultivadas quando as células foram transfectadas com o lentivírus pLZ2-hOCT-EGFP (Figuras 24 e 25). Este mesmo padrão pode ser visto até o décimo dia pós-transdução, pois as células contaminaram-se células e estas tiveram que ser descartadas.

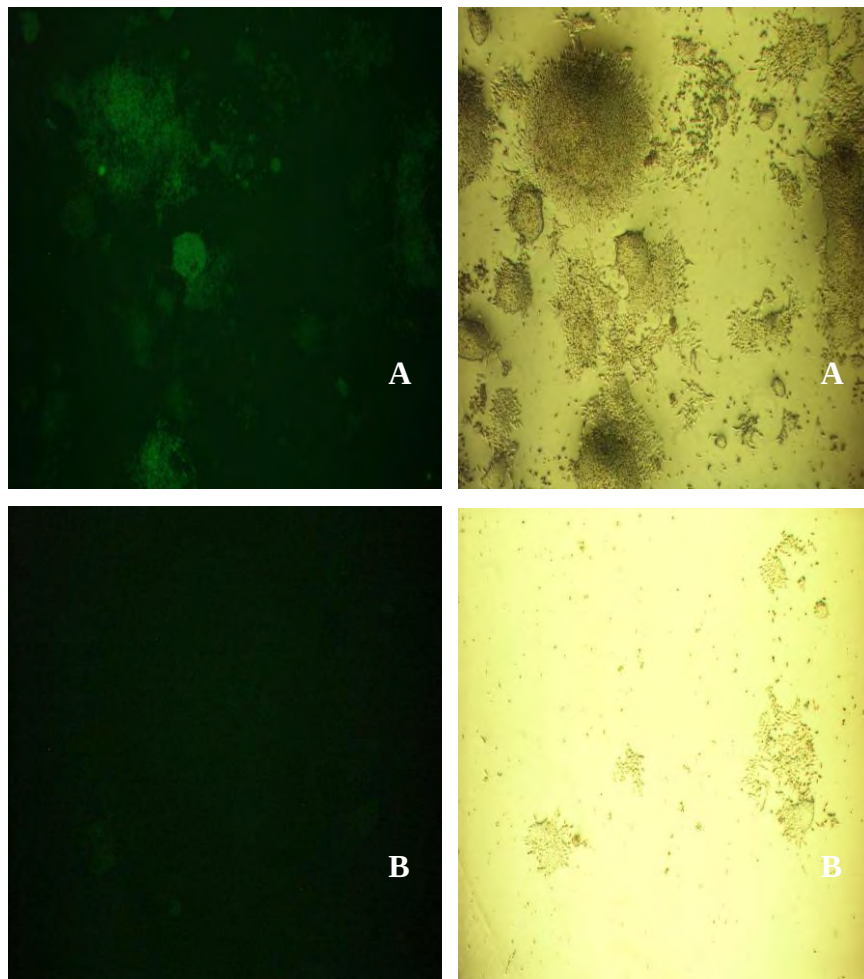


Figura 22. Células tronco embrionárias de murinos 6 dias pós-transdução: A) lentivírus pLZ2-mOCT-EGFP, B) lentivírus pLZ2-hOCT-EGFP. Visualização das colônias resistente GFP positivas sob microscopia de epifluorescência. Aumento de 40x. Esquerda: fluorescência, direita: contraste de fase.

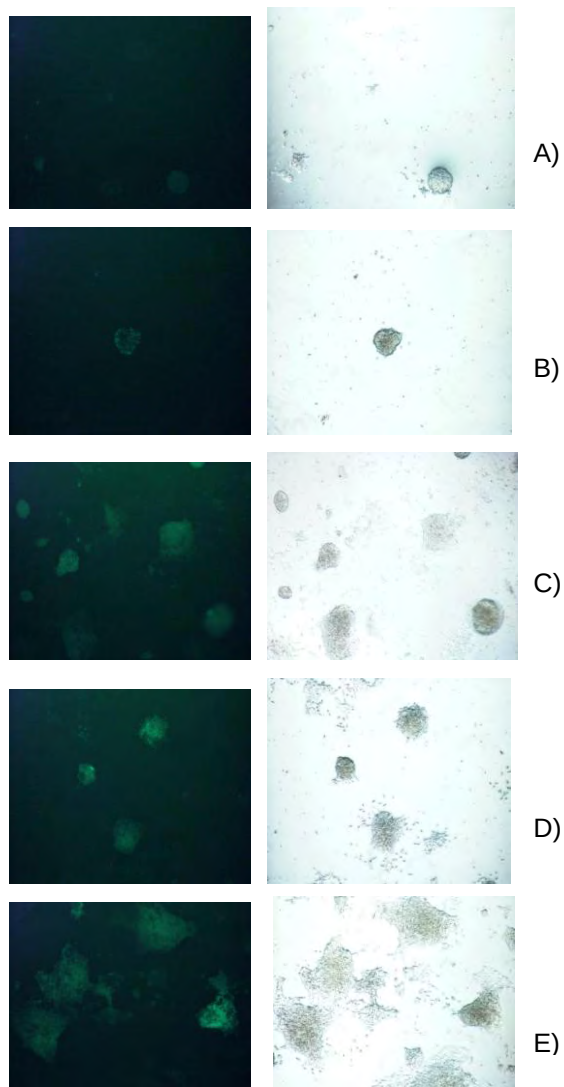


Figura 23. CTE 7 dias pós-transdução: A e B) lentivírus pLZ2-hOCT-EGFP, C, D e E) lentivírus pLZ2-mOCT-EGFP. Visualização das colônias resistente GFP positivas em microscopia de epifluorescência. Aumento de 100x. Acima: fluorescência, abaixo: contraste de fase.

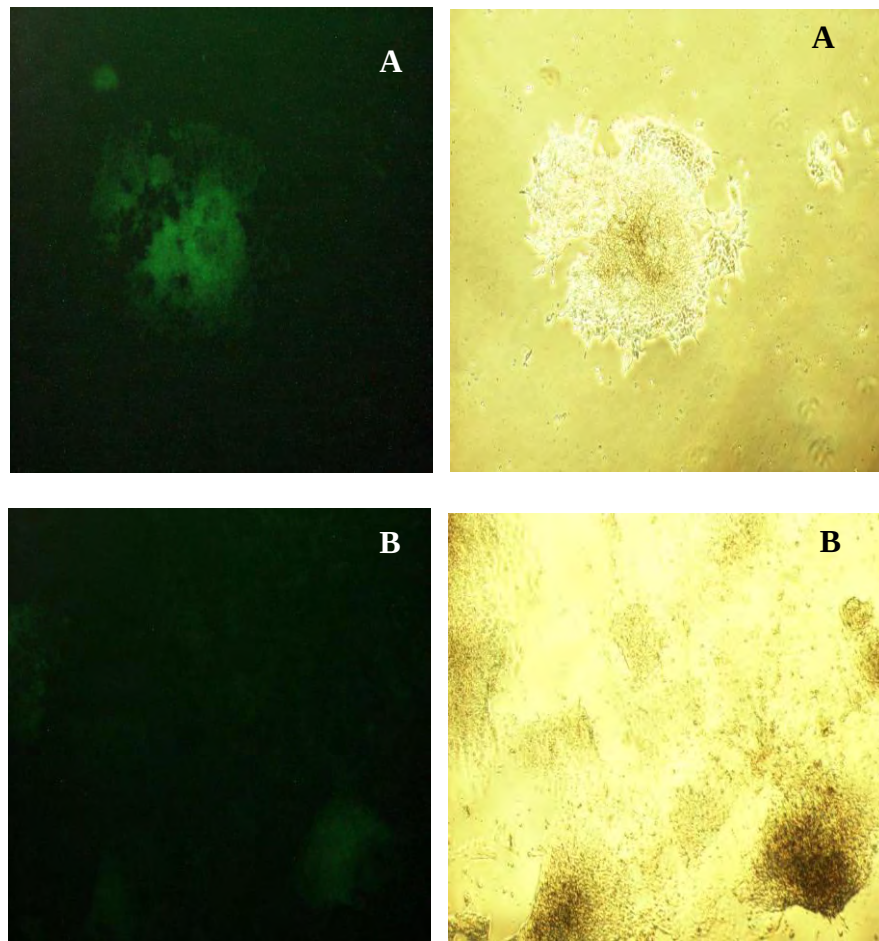


Figura 24. CTE 8 dias pós-transdução: A) lentivírus pLZ2-hOCT-EGFP, B) lentivírus pLZ2-mOCT-EGFP. Visualização das colônias resistente GFP positivas em microscopia de epifluorescência. Aumento de 100x. Esquerda: fluorescência, direita: contraste de fase.

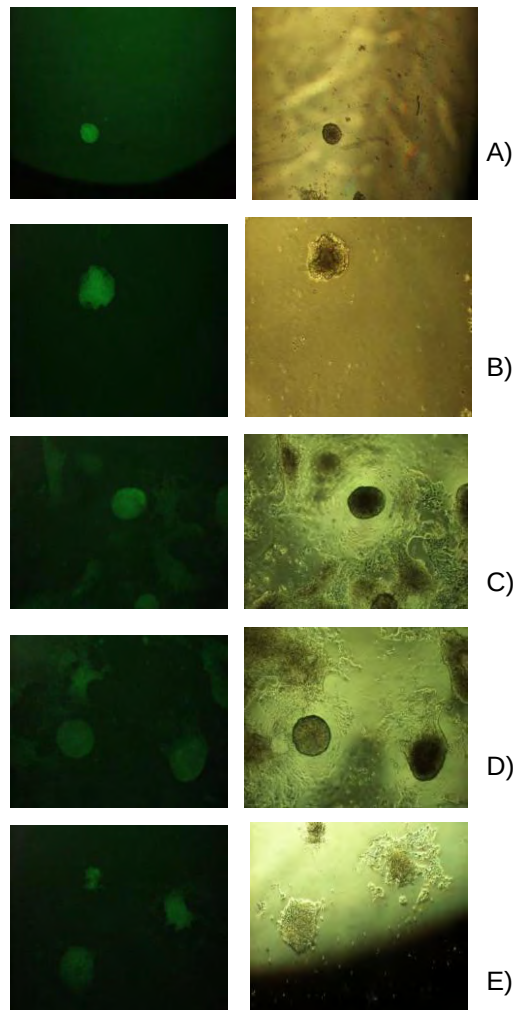


Figura 25. Células tronco embrionárias de murinos 10 dias pós-transdução: A e B) lentivírus pLZ2-hOCT-EGFP, C, D e E) lentivírus pLZ2-mOCT-EGFP. Visualização das colônias resistente GFP positivas em microscopia de epifluorescência. Aumento de 100x. Acima: fluorescência, abaixo: contraste de fase.

5.4. Transdução em CTE com os vetores lentivirais recombinantes promotor ecOCT (meq) e (heq).

Não foi observada a expressão do GFP tanto pelo lentivírus pLZ2-ecOCT-EGFP (m eq) quanto para o lentivírus pLZ2-ecOCT-EGFP (h eq) (Figura 26).

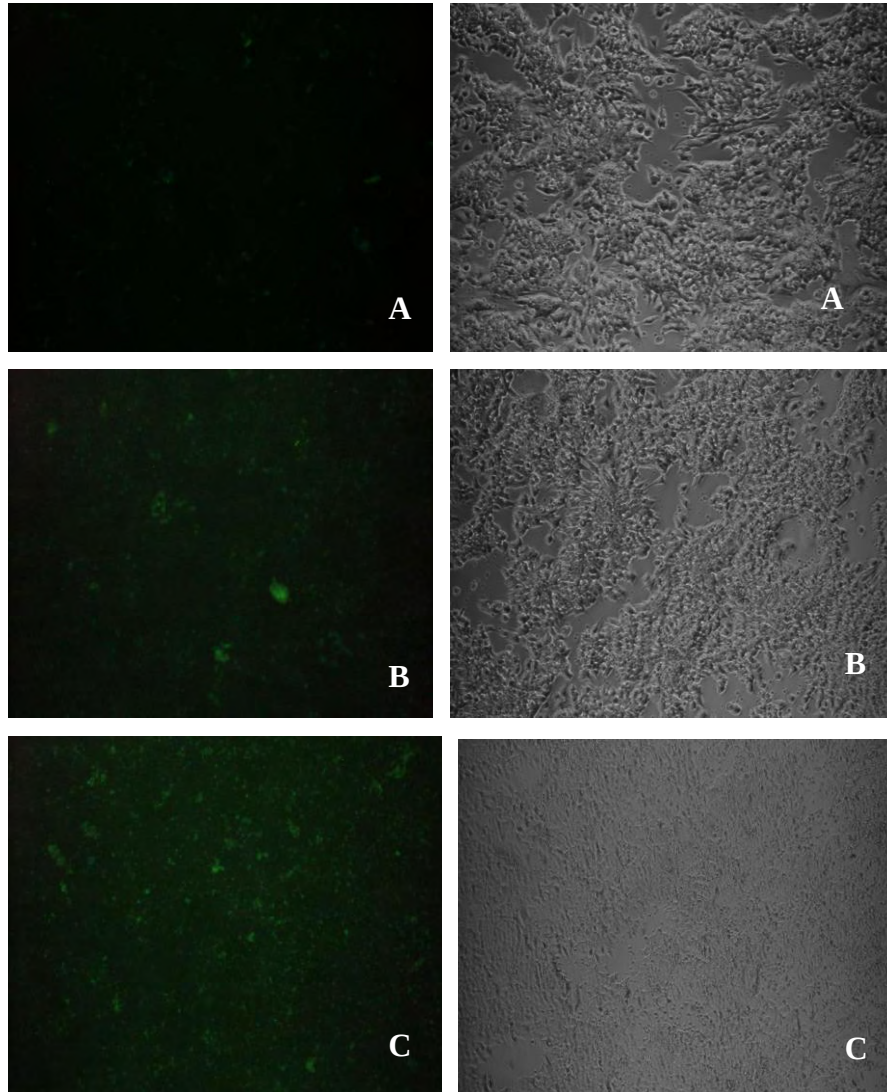


Figura 26. CTE 6 dias após-transdução: A) controle (sem lentivírus), B) lentivírus pLZ2-ecOCT-EGFP (m eq). C) lentivírus pLZ2-ecOCT-EGFP (h eq). Visualização da expressão do GFP em microscopia de epifluorescência. Aumento de 40x. Esquerda: fluorescência, direita: contraste de fase.

Como controle negativo os FEM foram transfectados com os mesmos lentivírus com os promotores de equino. Porém, houve a formação de um “background” ou alguma falha da técnica onde pode se observar células com fluorescência verde (Figura 28).

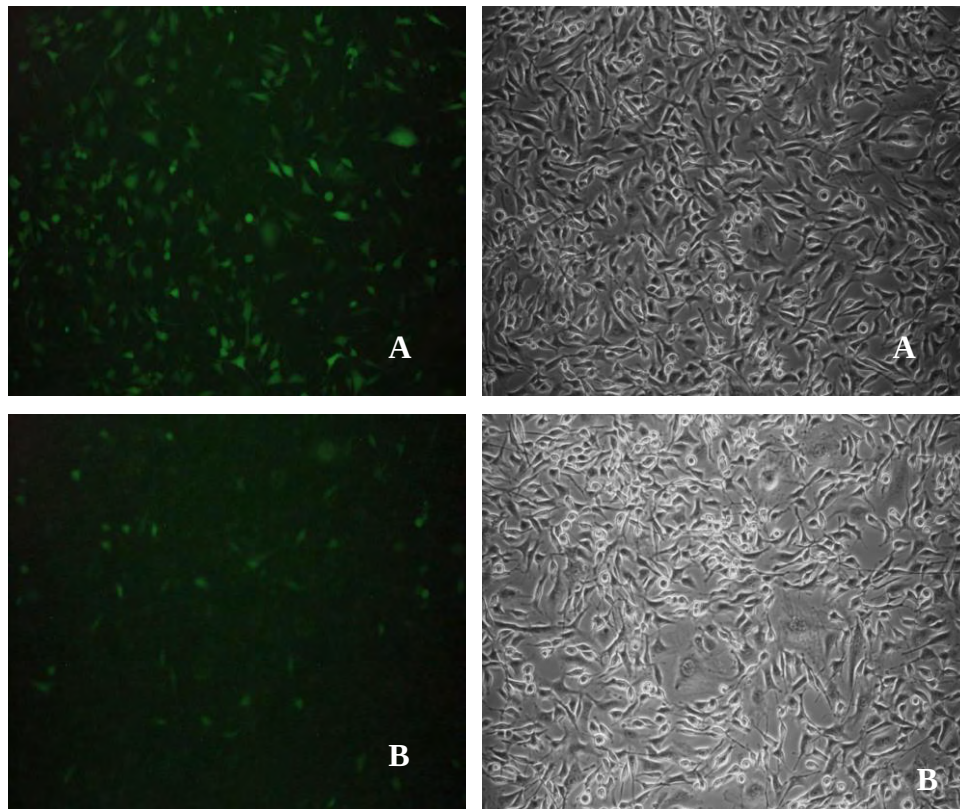


Figura 27. Fibroblasto embrionário murino 6 dias pós-transdução: A) lentivírus pLZ2-ecOCT-EGFP (meq). B) lentivírus pLZ2-ecOCT-EGFP (heq). Visualização da expressão do GFP em microscopia de epifluorescência. Aumento de 40x. Esquerda: fluorescência, direita: contraste de fase.

6. DISCUSSÃO

Neste trabalho foi abordada a utilização de um método transgênico pela introdução de vetores plasmidiais e lentivirais contendo um gene reporter GFP sob o controle do promotor Oct-4 de camundongo, humano e equino em CTE de murinos para gerar uma ferramenta para a identificação de células-tronco pluripotentes. Os resultados obtidos demonstraram que a atividade do promotor Oct-4, avaliada pela expressão da GFP na transfecção transitória e estável não diferiu entre os promotores diferentes. Os lentivetores contendo os promotores de camundongo e humano mostraram eficiência em transduzir as CTE de murinos a partir do sexto dia pós-infecção. Porém, o promotor Oct-4 de equinos não foi suficiente para a transdução e seleção de linhagem de CTE de murinos. Análises quantitativas de Oct-4 de CTE de murinos mostrou que alto níveis de Oct-4 induzem a diferenciação destas células em linhagens endodermais e mesodermas, considerando que baixos níveis resultam na diferenciação do trofotoderma, definindo o Oct-4 como regulador chave da pluripotência e diferenciação das CTE (NIWA et al., 2000). Desta forma, Oct-4 se torna um bom candidato para direcionar a expressão do gene reporter. A GFP é uma proteína autofluorescente que propicia o monitoramento da sua expressão em células *in vivo* e *in vitro* e pode ser quantificada pela citometria de fluxo e microscopia confocal (GERRARD et al., 2005).

Estudos com o promotor Oct-4 de camundongo identificaram importantes elementos situados nesta região que são responsáveis pela expressão gênica tecido-específica do Oct-4 (OKAZAWA et al., 1991). Em linhagens de CTE, Oct-4 ativa a transcrição de sítios específicos da região promotora (“octamer motifs”) localizados distal ou proximalmente do início do sítio de transcrição. Quando ocorre a superexpressão do Oct-4 em células diferenciadas, ele atua nos sítios proximais da região promotora (SCHÖLER et al., 1991). Porém, a capacidade do Oct-4 atuar na região distal do promotor é devida a um conjunto de fatores ainda desconhecidos, que recrutam limitado número de moléculas de Oct-4 do maquinário transcricional (PESCE & SCHÖLER, 2000). O alto grau de conservação da estrutura genômica e sequência do gene Oct-4 foi identificada entre algumas espécies de mamíferos, incluindo o homem,

murinos, suínos e bovinos (PESCE & SCHÖLER, 2000). Um estudo prévio revelou, pela comparação da região promotora do gene Oct-4 de mamíferos, uma organização comum de elementos *cis* regulatórios que supostamente funcionam de forma similar durante o desenvolvimento embrionário (NORDHOFF et al., 2001). Portanto, análises quantitativas da expressão do transgene sob o controle do promotor Oct-4 de diferentes espécies foi realizada neste estudo. Os sistemas de transfecção transitória com os promotores Oct-4, de camundongo (mOCT), de humanos (hOCT) e de equinos (sequência equivalente de camundongo – ecOCT (meq)) mostraram similar e consistente expressão do gene reporter. Porém, a expressão da GFP induzida pelo promotor Oct-4 de equino (sequência equivalente de humano– ecOCT (meq)) não foi igualmente eficiente quando testado em CTE de murinos. No entanto, a expressão da GFP foi relativamente baixa quando comparada com os dados da primeira transfecção (padronização), realizada somente com os promotores mOCT e hOCT. Uma falha na capacidade de lipofecção pode ocorrer e a transfecção pode ser muito baixa para avaliar o efeito do gene promotor pela atividade do gene reporter (TANG et al., 2004). É possível que, mesmo em condições de saturação, as células transfectadas com vetores de grandes tamanhos levam apenas um único plasmídeo transfectado ao citoplasma (McLENACHAN et al., 2007). Apesar da exposição à concentrações molares equivalentes de cada vetor, a lipofecção das CTE de murinos foi altamente tamanho dependente. No caso dos promotores Oct-4 de eqüinos, quando o tamanho das sequência promotora aumentou, a eficiência da tansfecção declinou. Foram observados baixos níveis da expressão da GFP/célula quando foi utilizado o promotor ecOCT (sequência equivalente de humanos). Estes dados são consistentes com a possibilidade de que a transfecção de vetores recombinantes com sequências grandes de um gene exógeno pode ser limitada pelas dificuldades de movimento pelo citoplasma celular (McLENACHAN et al., 2007).

A separação de Oct-4 em células totipotentes pode ser reflexo de conjuntos de ativadores transcrpcionais e fatores de remodelamento da cromatina. A proteína de murinos *mbrm*, que é homóloga a proteína humana *brm* (LeGOUY et al., 1998), é responsável em remodelar complexos de cromatina, as quais facilitam o

acesso do promotor aos ativadores que realizam a transcrição do gene (PESCE & SCHÖLER, 2000). Uma possibilidade para a manutenção de um contínuo estado de expressão do Oct-4 em células totipotentes pode ser consequência do estabelecimento de um estado geral de configuração da cromatina que resulta na função de ativadores específicos do Oct-4. Por outro lado, o aumento na expressão dos níveis de Oct-4 pode reduzir a habilidade do Oct-4 em ativar genes alvo e resultar a princípio em um fenótipo similar das células onde elas suprimem a regulação da proteína Oct-4 (PESCE & SCHÖLER, 2000).

A expressão de genes exógenos estáveis requer uma expressão eficiente do promotor transportado pelo vetor, sendo que este promotor tem que resistir ao silenciamento gênico (LIEW et al., 2007). Foi observado que o resultado não efetivo da transfecção estável das CTE de murinos pode ter ocorrido pelo silenciamento dos promotores (mOCT, hOCT, ecOCT (meq) e ecOCT (heq)). Neste trabalho, verificou-se que a expressão do gene reporter (GFP), utilizando-se o cassete de resistência ao antibiótico blasticidina, não foi vigorosa. Algumas células que foram drogas-resistentes não expressaram o transgene, portanto resultaram em falsos clones positivos. O mecanismo de silenciamento gênico ainda não é claro, porém este silenciamento não foi observado na transfecção transitória. Em CTE de humanos, o silenciamento do promotor depende da integração do plasmídeo dentro do genoma da célula hospedeira, como é observado na transfecção viral (XIA et al., 2007). Uma ou múltiplas modificações epigenéticas do DNA exógeno, mesmo seguido de integração dentro do genoma das células hospedeiras, foi demonstrado e isto pode causar o silenciamento gênico. Porém, PESCE & SCHÖLER, (2000) demonstraram a utilização de um vetor Oct-4-EGFP (com o promotor Oct-4 de humanos) em células parenterais H1 em transfecção estável e, desta forma, todas as colônias exibiram vários níveis de expressão da GFP depois da seleção e nenhum silenciamento gênico foi observado.

Vetores lentivirais são competentes transportadores de genes exógenos para o interior de CTE de murinos e células tronco hematopoéticas, principalmente linhagens celulares transgênicas que empregaram lentivetores baseados no vírus HIV-1 (OKA et al., 2006). Neste estudo, a transdução de lentivetores em CTE de murinos com

os promotores Oct-4 de camundongo e humano mostrou a expressão da GFP a partir do sexto dia pós-infecção. O número de colônias foi maior quando as células foram infectadas com pLZ2-mOCT-EGFP do que com pLZ2-hOCT-EGFP. No entanto, os vetores lentivirais sob o controle do promotor Oct-4 de equinos não foram capazes de transduzir CTE de murinos. As maiores limitações na transdução gênica são a ineficiência no transporte do gene exógeno e a supressão da expressão do gene depois da integração dentro da célula hospedeira. Atualmente, não há nenhum controle sobre o número ou a localização dos eventos de integração. O mais eficiente sistema de transferência para genes reporter estáveis dentro de células humanas primárias são vetores retrovirais e lentivirais, mas estes sofrem frequente silenciamento transcricional em células tronco pluripotentes (OKITA et al., 2008; WERNIG, 2007). Foi verificado neste experimento que a expressão do GFP foi maior quando as células foram transduzidas com pLZ2-hOCT-EGFP. Adicionalmente, a expressão de GFP foi aumentada durante o tempo, especialmente em células transduzidas com pLZ2-hOCT-EGFP. Estes dados corroboram o tempo de expressão da proteína Oct-4 em cada espécie em embriões produzidos *in vitro* (PIV). Em eqüinos, o Oct-4 está presente nos primeiros estádios de desenvolvimento embrionário e em blastocistos até o décimo dia de desenvolvimento. Os padrões de expressão são variáveis nos primeiros estágios e vão se tornando gradualmente regulares durante o desenvolvimento embrionário. Desta forma, 100% do núcleo do embrião expressa a proteína do sexto dia em diante do desenvolvimento embrionário (HARDING, 2005). Em embriões humanos produzidos *in vitro*, o Oct-4 maternal é distribuído dentro do citoplasma, embora o Oct-4 embrionário esteja localizado no núcleo (CAUFFMAN et al., 2005). Dados em ratos, camundongos e macaco *rhesus* indicam que o mRNA do Oct-4 é produzido no genoma embrionário no tempo da transição maternal zigótica (BUEHR et al., 2003; MITALIPOV et al., 2003). Embriões de roedores e de macacos *rhesus* produzidos *in vitro* expressam a proteína Oct-4 em estágios mais avançados do desenvolvimento embrionário primário (começando em 5 células e 16 células, respectivamente); também nestas espécies, a proteína pode ser isolada da MCI de blastocistos eclodidos. Nesse estágio, os padrões de expressão de mRNA são idênticos aos padrões de expressão da proteína. Em

embriões produzidos *in vitro*, tanto na espécie bovina como em suínos, a proteína Oct-4 está presente durante todo o desenvolvimento embrionário primário, podendo ser encontrada tanto no trofoblasto como na MCI de blastocistos (HARDING, 2005). Na pré-implantação de embriões humanos, estes expressam a proteína Oct-4 em apenas algumas de suas células. Por exemplo, embriões de 5 células expressam Oct-4 em 40% de suas células, embriões de 9 células expressam Oct-4 em apenas 11,1% e embriões de 10 células em 80% de suas células (CAUFFMAN et al., 2005). Na fase de blastocisto de embriões PIV humano, o mRNA do Oct-4 (baseados na análise de PCR) e as proteínas são encontradas tanto na massa celular interna quanto no trofoblasto. Esta grande variabilidade, tanto entre as espécies e dentro dos embriões, levanta dúvidas quanto ao verdadeiro papel de Oct-4 na manutenção ou sinalização da pluripotência nestas espécies.

7. CONCLUSÕES

O sistema pLZ2-Oct-EGFP, juntamente com promotores Oct-4 de camundongo, de humanos e de equinos nas sequências camundongo e humano equivalentes mostraram habilidade em transfectar CTE de murinos.

Os vetores lentivirais carreando o gene reporter GFP sob o controle dos promotores Oct-4 de camundongo e de humanos revelaram grande capacidade em transduzir CTE de murinos.

Adicionalmente, os promotores Oct-4 de equinos transportados pelos vetor lentiviral derivado do vírus HIV-1 não foram eficientemente competentes em atuar como marcadores da pluripotência em CTE de murinos.

O uso do vetor pLZ2-Oct-EGFP para permitir a imagem de células para a expressão da GFP ou pela seleção pela resistência a blasticidina pode ser um valioso sistema para a otimização de novas tecnologias de reprogramação.

Todavia, a melhor opção de promotor Oct-4 e vetores a ser empregada para a expressão do gene repórter GFP em CTE de murinos precisa continuar a ser investigada.

Na tentativa de implantar e melhorar a tecnologia para um sistema eficiente de transferência gênica para células iPS, o qual é essencial para a diferenciação delas em células funcionais. Desta maneira, ampliando os horizontes para a aplicação das células tronco pluripotentes induzidas na medicina regenerativa.

8. Referências¹

ABDEL-RAHMAN, B.; FIDDLER, M.; RAPPOLEE, D.; PERGAMENT, E. Expression of transcription regulating genes in human preimplantation embryos. **Human Reproduction**, Oxford, v. 10, p. 2787–2792, 1995.

ALAM, J.; COOK, J.L. Reporter genes: application to the study of mammalian gene transcription. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 188, p. 245-254, 1990.

BERKOWITZ, R.D.; ILVES, H.; PLAVEC, I.; VERES, G. Gene transfer systems derived from Visna virus: Analysis of virus production and infectivity. **Virology**, New York, v. 279, p. 116-129, 2001.

BOHELER, K.R.; CZYZ, J.; TWEEDIE, D.; YANG, H.T.; ANISIMOV, S.V.; WOBUS, A.M. Differentiation of pluripotent embryonic stem cells into cardiomyocytes. **Circulation Research**, United State, v. 91, p. 189–201, 2002.

BRONSTEIN, I. Chemiluminescent and bioluminescent reporter gene assays. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 219, n.2, p. 169-81, 1994.

BUCHSCHACHER, G.L.; WONG-STAAAL, F. Development of lentiviral vectors for gene therapy diseases. **Blood**, New York, v. 95, p. 2499-2504, 2000.

BUEHR, M.; NICHOLS, J.; STENHOUSE, F.; MOUNTFORD, P.; GREENHALGH, C.J.; KANTACHUVESIRI, S.; BROOKER, G.; MULLINS, J.; SMITH, A.G. Rapid loss of Oct-4 and pluripotency in cultured rodent blastocysts and derivative cell lines. **Biology of Reproduction**, New York, v. 68, p. 222-229, 2003.

¹ ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 6023: informação e documentação, referência e elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BUKRINSKY, M.I.; HAFFAR, O.K. HIV-1 nuclear import in search of a leader. **Frontiers of Bioscience**, Searington, NY, v. 4, p. 772-781, 1999.

CARSTANJEN, B.; DESBOIS, C.; HEKMATI, M.; BEHR, L. Successful engraftment of cultured autologous mesenchymal stem cells in a surgically repaired soft palate defect in an adult horse. **Canadian Journal of Veterinary Research**, Ottawa, v. 70, p. 143–147, 2006.

CAUFFMAN, G.; VAN DE VELDE, H.; LIEBAERS, I.; VAN STEIRTEGHEM, A. Oct-4 mRNA and protein expression during human preimplantation development. **Molecular Human Reproduction**, Oxford, v. 11, p. 173-181, 2005.

CHALFIE, M. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. **Science**, Washington, v. 263, n. 5148, p. 802-5, 1994.

CHERRY, S. R.; BINISZKIEWICZ, D.; VAN PARIJS, L.; BALTIMORE, D.; JAENISCH, R. Retroviral expression in embryonic stem cells and hematopoietic stem cells. **Molecular and Cellular Biology**, Washington, v. 20, p. 7419 – 7426, 2000.

COSSET, F.L.; TAKEUCHI, Y.; BATTINI, J.L.; WEISS, R.A.; COLLINS, M.K. High-titer packaging cells producing recombinant retroviruses resistant to human serum. **Journal of Virology**, Baltimore, v. 169, p. 7430-7436, 1995.

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

CROVACE, A.; LACITIGNOLA, L.; DE SIENA, R.; ROSSI, G.; FRANCIOSO, G. Cell therapy for tendon repair in horses: An experimental study commun. **Veterinary Research**, Paris, v. 31, Suppl. 1, p. 281–283, 2007.

DA SILVA, F.H. **Produção de vetores lentivirais baseados em HIV-1 em linhagem de células tronco mesenquimal murina**. 2005. 116p. Dissertação (Genética e Biologia Molecular) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, 2005.

DOETSCHMAN, T.C.; EISTETTER, H.; KATZ, M.; SCHMIDT, W.; KEMLER, R. The in vitro development of blastocyst-derived embryonic stem cell lines: formation of visceral yolk sac, blood islands and myocardium. **Journal of Embryology and Experimental Morphology**, Cambridge, v. 87, P. 27-45, 1985.

DUNCAN, S.A.; NAVAS, M.A.; DUFORT, D.; ROSSANT, J.; STOFFEL, M. Regulation of a transcription factor network required for differentiation and metabolism. **Science**, New York, v. 281, p. 692-695, 1998.

EVANS, M.J., KAUFMAN, M.H. Establishment in culture of pluripotent cells from mouse embryos. **Nature**, London, v. 292, p. 154-156, 1981.

GEARHART, J.; PASHOS, E.E.; PRASAD, M.K. Pluripotency Redux. Advances in Stem-Cell Research. **The New England Journal of Medicine**, Boston, n. 357, n. 15, p. 1469-1471, 2007.

GERRARD, L.; ZHAO, D.; CLARK, A.J.; CUI, W. Stably transfected human embryonic stem cell clones express specific fluorescent green protein and maintain self-renewal and pluripotency. **Stem Cell**, New York, v. 23, p. 124-133, 2005.

GRAHAM, F.L.; SMILEY, J.; RUSSELL, W.C.; NAIRN, R. Characteristics of human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. **The Journal of General Virology**, England, v. 36, n. 1, p. 59-74, 1977.

GUEST, D.J.; SMITH, M.R.; ALLEN, W.R. Monitoring the fate of autologous and allogeneic mesenchymal progenitor cells injected into the superficial digital flexor tendon of horses: Preliminary study. **Equine Veterinary Journal**, London, v.40, p. 178-181, 2008.

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

HARDING, H.D. **OCT-4 Expression in equine embryonic cells**. 2005. 90p. Thesis (Master of Science – Veterinary Physiology) – College of Veterinary Medicine & Biomedical Science, Texas A&M University, College Station, Texas, 2005.

HILL, A.E.; CARPENTER, T.E.; GARDNER, I.A.; STOVER, S.M. Evaluation of a stochastic Markov-chain model for the development of forelimb injuries in Thoroughbred racehorses. **American Journal Veterinary Research**, United State, v. 64, n. 3, p. 328-337, 2003.

HOCHEDLINGER, K., JAENISCH, R. Nuclear transplantation, embryonic stem cells, and the potential for cell therapy. **Journal Medicine**, New England, v. 349, p. 275–286, 2006.

HOOPER, M.; HARDY, K.; HANDYSIDE, A.; HUNTER, S.; MONK, M. HPRT-deficient (Lesch–Nyhan) mouse embryos derived from germline colonization by cultured cells. **Nature**, London, v. 326, p. 292–295, 1987.

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

KAWABATA, K.; SAKURAI, F.; YAMAGUCHI, T.; HAYAKAWA, T.; MIZUGUCHI, H. Efficient Gene Transfer into Mouse Embryonic Stem Cells with Adenovirus Vectors. **Molecular Therapy**, San Diego, CA, v. 12, n.3, p. 547-554, 2005.

KAY, M.A.; GLORIOSO, J.C.; NALDINI, L. Viral vectors for gene therapy the art of turning infectious agents into vehicles of therapeutics. **Nature Medicine**, New York, v.7, p. 33-40, 2001.

KELLER, H. Transgene expression, but not gene delivery, is improved by adhesion-assisted lipofection of hematopoietic cells. **Gene Therapy**, Hampshire, UK, v. 6 p. 931–938, 1999.

KIRCHHOF, N.; CARNWATH, J.W.; LEMME, E; ANASTASSIADIS, E.; SCHÖLER, H.; NIEMANN, H. Expression pattern of Oct-4 in preimplantation embryos of different species. **Biology of Reproduction**, New York, v. 63, p. 1698-1705, 2000.

KOBAYASHI, N.; RIVAS-CARRILLO, J.D.; SOTO-GUTIERREZ, A.; FUKAZAWA, T.; CHEN, Y.; NAVARRO-ALVAREZ, N.; TANAKA, N. Gene delivery to embryonic stem cells. **Birth Defects Research. Part C, Embryo Today**, v. 75, n. 1, p. 10-8, 2005.

KOSAKA, Y.; KOBAYASHI, N.; FUKAZAWA, T.; TOTSUGAWA, T.; MARUYAMA, M.; YONG, C.; ARATA, T.; IKEDA, H.; KOBAYASHI, K.; UEDA, T.; KURABAYASHI, Y.; TANAKA, N. Lentivirus-based gene delivery in mouse embryonic stem cells. **Artificial Organs**, Cambridge, v. 28, n. 1, p. 271-277, 2004.

KUROSAKA, S.; ECKARDT, S.; MCLAUGHLIN, K.J. Pluripotent lineage definition in bovine embryos by Oct4 transcript localization. **Biology of Reproduction**, New York, v. 71, p. 1578-1582, 2004.

LAKER, C.; MEYER, J.; SCHOPEN, A. Host cis-mediated extinction of a retrovirus permissive for expression in embryonal stem cells during differentiation. **Journal of Virology**, Washington, v. 72, p. 339-348, 1998.

LEGOUY, E.; THOMPSON, E.M.; MUCHARDT, C. Differential preimplantation regulation of two mouse homologues of the yeast SWI2 protein. **Devopmental Dynamics**, United States, v. 212, p. 38-48, 1998.

LEVER, A.L.M.; STRAPPE, P.M.; ZHAO, J. Lentiviral vectors. **Journal of Biomedical Science**, Cambridge, v. 1, p. 439-449, 2004.

LIEW, C.G; DRAPER, J.S; WALSH, J.; MOORE, H.; ANDREWS, P.W. Transient and stable transgene expression in human embryonic stem cells. **Stem Cells**, New York, v.25, p.1521–1528, 2007.

LITTELL, R.C.; MILLIKEN, G.A.; STROUP, W.W.; WOLFINGER, R.D. **SAS system for mixed models**. Cary, NC, USA: SAS: Institute Inc., 1996, 633p.

LOWRY, W.E. Generation of human induced pluripotent stem cells from dermal fibroblasts. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, United States, v. 105, p. 2883–2888, 2008.

MA, H.; DIAMOND, S.L. Nonviral gene therapy and its delivery systems. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, Netherlands, v. 2 p. 1-17, 2001.

MAHERALI N. Directly reprogrammed fibroblasts show global epigenetic remodeling and widespread tissue contribution. **Cell Stem Cell**, Cambridge, v.1, p. 55–70, 2007.

MARTIN, G. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, United State, v. 78, p. 7634-7638, 1981.

McLENACHAN, S.; SARSERO, J.S; IOANNOU, P.A. Flow-cytometric analysis of mouse embryonic stem cell lipofection using small and large DNA constructs. **Genomics**, United States, v. 89, p. 708-720, 2007.

McWHIR, J.; SCHNIEKE, A.E.; ANSELL,R.; WALLACE, H.; COLMAN, A.; SCOTT,R.A.; KIND, A. Selective ablation of differentiated cells permits isolation of embryonic stem cell lines from murine embryos with a non-permissive genetic background. **Nature Genetics**, New York, v. 14, p. 223-226, 1996.

MICKLÓS, I. MCMC Genome rearrangement. **Bioinformatics**, Oxford, Supl.2 ii, p. 130-137, 2003.

MILLER, A.D. Retrovirus packaging cells. **Human Gene Therapy**, United States, v.1, p. 5-14, 1990.

MILLER, A.D. Human gene therapy comes of age. **Nature**, London, v. 357, p. 455-460, 1992.

MITALIPOV, S.M.; KUO, H.C.; HENNEBOLD, J.D.; WOLF, D.P. Oct-4 expression in pluripotent cells of the rhesus monkey. **Biology of Reproduction**, New York, v. 69, p. 1785-1792, 2003.

MITROPHANOUS, K.; YOON, S.; ROHLL, J.; PATIL, D.; WILKES, F.; KIM, V.; KINGSMAN, S.; KINGSMAN, A.; MAZARAKIS, N. Stable gene transfer to the nervous

system using a non-primate lentiviral vector. **Gene Therapy**, Hampshire, UK, v. 6, p. 1808-1818, 1999.

MIYOSHI, H.; SMITH, K.A.; MOSIER, D.E.; VERNA, I.M.; TORBETT, B.E. Transduction of human CD34⁺ cells that mediated long-term engraftment of NOD/SCID mice by HIV vectors. **Science**, Washington, v. 283, p. 682-686, 1999.

MOON, S.Y.; PARK, Y.B.; KIM, D.S.; OH, S.K.; KIM, D.W. Generation, culture, and differentiation of human embryonic stem cells for therapeutic applications. **Molecular Therapy**, San Diego, CA, v. 13, p. 5–14, 2006.

MONTIGNY, W.J.; PHELPS, S.F.; ILLENYE, S.; HEINTZ, N.H. Parameters influencing high-efficiency transfection of bacterial artificial chromosomes into cultured mammalian cells, **BioTechniques**, England, v. 35, p. 796–807, 2003.

MSELLI-LAKHAL, L.; FAVIER, C.; DA SILVA TEIXEIRA, M.F.; CHETTAB, K.; LEGRAS, C.; RONFORT, C.; VERDIER, G.; MORNEX, J.F.; CHEBLOUNE, Y. Defective RNA packaging is responsible for low transduction efficiency of CAEV-based vectors. **Archives of Virology**, New York, v. 143, p. 681-695, 1998.

NALDINI, L.; BLOMER, U.; GALLAY, P.; ORY, D.; MULLIGAN, P.; GAGE, F.H.; VERMA, I.M.; TRONO, D. In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. **Science**, Washington, v. 272, p. 263-267, 1996.

NAKAGAWA, M. Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. **Nature Biotechnology**, United States, v. 26, p. 101–106, 2008.

NIENHUIS, A.W.; DUNBAR, C.E.; SORRENTINO, B.P. Genotoxicity of retroviral integration in hematopoietic cells. **Molecular Therapy**, San Diego, CA, v. 13, p. 1031-1049, 2006.

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

NORDHOFF, V.; HÜBNER, K.; BAUER, A.; ORLOVA, I.; MALAPETSA, A.; SCHÖLER, H.S. Comparative analysis of human, bovine, and murine Oct-4 upstream promoter sequences. **Mammalian Genome**, United States, v. 12, p. 309-317, 2001.

OKA, M.; CHANG, L.J.; COSTANTINI, F.; TERADA, N. Lentiviral vector-mediated gene transfer in embryonic stem cell. **Methods in Molecular Biology**, United States, p. 273-281, v. 329, 2006.

OKAMOTO, K.; OKAZAWA, H.; OKUDA, A.; SAKAI, M.; MURAMATSU, M.; HAMADA, H. A novel octamer binding transcription factor is differentially expressed in mouse embryonic cells. **Cell**, Cambridge, v. 60, p. 461–472, 1990.

OKAZAWA, H.; OKAMOTO, K.; ISHINO, F.; ISHINO-KANEKO, T.; TAKEDA, S. The oct3 gene, a gene for an embryonic transcription factor, is controlled by a retinoic acid repressible enhancer. **The EMBO Journal**, Oxford, v. 10, p. 2997–3005, 1991.

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

OLSEN, J.C. Gene transfer vectors derived from equine infectious anemia virus. **Gene Therapy**, Hampshire, UK, v. 5, p. 1481-1487, 1998.

OVITT, C.E; SCHÖLER, H.R. The molecular biology of Oct-4 in the early mouse embryo. **Molecular Human Reproduction**, Oxford, v. 4, p.1021–1031, 1998.

PALÙ, G.; BONAGURO, R.; MARCELLO, A. In pursuit of new developments for genes therapy of human diseases. **Journal of Biotechnology**, Netherlands, v. 68, p. 1-13, 1999.

PARHAM, G. **Steps toward the generation of patient specific equine pluripotent cells**. 2008. 90p. Thesis (Master of Science). The Royal (Dick) School of Veterinary Studies, University of Edinburgh, Edinburgh, UK, 2008.

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

PFEIFER, A.; IKAWA, M.; DAYN, Y.; VERMA, I. M. Transgenesis by lentiviral vectors: Lack of gene silencing in mammalian embryonic stem cells and preimplantation embryos. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, United State, v. 99, p. 2140–2145, 2002.

PRASHER, D.C. Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. **Gene**, Amsterdam, v. 111, n. 2, p. 229-33, 1992.

PESCE, M.; SCHÖLER, H.R. Oct-4; Control of totipotency and germline determination. **Molecular Reproduction and Development**, United States, v. 55, p. 452-457, 2000.

PIKARSKY, E.; SHARIR, H.; BEN-SHUSHAN, E.; BERGMAN, Y. Retinoic acid represses Oct-3/4 gene expression through several retinoic acidresponsive elements located in the promoter-enhancer region. **Molecular and Cell Biology**, Washington, v. 14, p. 1026-1038, 1994.

POESCHLA, E.; GILBERT, J.; LI, X.; HUANG, S.; HO, A.; WONG-STALL, F. Identification of a human immunodeficiency virus type 2 (HIV-2) encapsidation

determinant and transduction of nondividing human cells by HIV-2-based/entivirus vectors. **Journal of Virology**, Baltimore, v. 172, p. 6527-6536, 1998.

RIPPON, H.J; BISHOP, A.E. Embryonic stem cells. **Cell Proliferation**, England, v.37, n. 1, p. 23-34, 2004.

ROBERTSON, E.J. Embryo-derived stem cell lines. In: **Teratocarcinomas and embryonic stem cells: a practical approach**. Oxford, p. 71-112, 1986.

ROSNER, M.H.; VIGANO, M.A.; OZATO, K.; TIMMONS, P.M.; POIRIER, F.; RIGBY, P.W.; STAUDT, L.M. A POU-domain transcription factor in early stem cells and germ cells of the mammalian embryo. **Nature**, London, v. 345, p. 686-692, 1990.

SAITO, S.; UGAI, H.; SAWAI, K.; YAMAMOTO, Y.; MINAMIHASHI, A.; KUROSAKA, K.; KOBAYASHI, Y.; MURATA, T.; OBATA, Y.; YOKOYAMA, K. Isolation of embryonic stemlike cells from equine blastocysts and their differentiation in vitro. **FEBS Letters**, Netherlands, p. 389-396, v. 531, 2002.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATS, T. Molecular cloning a laboratory manual. New York, v. 3, 2001.

SCHÖLER, H.R. Octamania: the POU factors in murine development. **Trends in Genetics**, England, v. 7, p. 323-329, 1991.

SCHÖLER, H.R; BALLING, R.; HATZOPOULOS, A.K; SUZUKI, N.; GRUSS, P. Octamer binding proteins confer transcriptional activity in early mouse embryogenesis. **The EMBO Journal**, England, v. 8, p. 2551-2557, 1989.

SCHÖLER, H.R.; RUPPERT, S.; SUZUKI, N.; CHOWDHURY, K.; GRUSS, P. New type of POU domain in germ line-specific protein Oct-4. **Nature**, London, v. 344, p.435-439, 1990.

SCHOORLEMMER, J.; VAN PUIJENBROEK, A.; VAN DEN EIJNDEN, M.; JONK, L.; PALS, C.; KRUIJER, W. Characterization of a negative retinoic acid response element in the murine Oct4 promoter. **Molecular and Cell Biology**, Washington, v. 14, p. 1122–1136, 1994.

SMITH, A.G. Embryo-derived stem cells: of mice and men. **Annual review of cell and developmental biology**, United States, p. 435–462, v. 17, 2001.

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

STEWART, C.L.; VANEK, M.; WAGNER, E.F. Expression of foreign genes from retroviral vectors in mouse teratocarcinoma chimaeras. **The EMBO Journal**, Oxford, v. 4, n. 13B, p. 3701-3709, 1985.

STOVER, J. New equine ambulances for racetracks. **Modern veterinary practice**, United State, v. 62, n. 11, p. 852-855, 2003.

SWANSTROM, R.; WILLS, J.W. **Synthesis, assembly and processing of viral protein**. In: COFFIN, J.M.; HUGHES, S.H.; VARMUS, H.E, eds. *Retroviruses*. Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Press, p. 263-334; 1997.

SYLVESTER, I.; SCHÖLER, H.R. Regulation of the Oct-4 gene by nuclear receptors. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 22, p. 901–911, 1994.

TADA, M.; MORIZANE, A.; KIMURA, H.; KAWASAKI, H.; AINSCOUGH, J.F.; SASAI, Y.; NAKATSUJI, N.; TADA, T. Pluripotency of reprogrammed somatic genomes in embryonic stem hybrid cells. **Developmental Dynamics**, United States, v. 227, n. 4, p. 504-510, 2003.

TAGAWA, T. Characterisation of LMD virus-like nanoparticles selfassembled from cationic liposomes, adenovirus core peptide mu and plasmid DNA, **Gene Therapy**, Hampshire, UK, v. 9, p. 564–576, 2002.

TAKAHASHI, K., YAMANAKA, S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. **Cell**, Cambridge, v. 126, p. 663-676, 2006.

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

TAKEDA, J.; SEINO, S.; BELL, G.I. Human Oct3 gene family: cDNA sequences, alternative splicing, gene organization, chromosomal location, and expression at low levels in adult tissues. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 20, p. 4613-4620, 1992.

TALBOT, N.C.; BLOMBERG, A. The pursuit of ES cell lines of domesticated ungulates. **Stem Cell Reviews**, Totowa, NJ, v. 4, n. 3, p. 235-54, 2008.

TANG, F.C.; MENG, G.L.; YANG, H.B.; LI, C.J.; SHI, Y.; DING, M.X.; SHANG, K.G.; ZHANG, B.; XUE, Y.F. Stable suppression of gene expression in murine embryonic stem cells by RNAi directed from DNA vector-based short hairpin RNA. **Stem Cells**, New York, v. 22, p. 93-99, 2004.

TASHIRO, K.; INAMURA, M.; KAWABATA, K.; SAKURAI, F.; YAMANISHI, K.; HAYAKAWA, T.; MIZUGUCHI, H. Efficient Adipocyte and Osteoblast Differentiation from Mouse Induced Pluripotent by Adenoviral Transduction. **Stem Cells**, New York, v. 27, n. 8, p. 1802-1811, 2009.

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

TOMILIN, A.; REMÉNYI, A.; LINS, K.; BAK, H.; LEIDEL, S. Synergism with the co-activator OBF-1 (OCA-B, BOB-I) is mediated by a specificPOU dimer configuration. **Cell**, Cambridge, v. 103, p. 853-864, 2000.

TOMPERS, D. M.; LABOSKY, P. A. Electroporation of murine embryonic stem cells: a step-by-step guide. **Stem Cells**, Washington, v. 22, p. 243- 249, 2004.

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

VAN EIJK, M.J.T; VAN ROOIJEN, M.A; MODINA, S.; SCESI, L.; FOLKERS, G.; VAN TOL, H.T.A; BEVERS, M.M; FISHER, S.R; LEWIN, H.A; RAKACOLLI, D.; GALLI, C.; DE VAUREIX, C.; TROUNSON, A.O; MUMMERY, C.L; GANDOLFI, F. Molecular cloning, genetic mapping, and developmental expression of bovine POU5F1. **Biology of Reproduction**, New York, v. 60, p. 1093-1103, 1999.

VODICKA, M.A.; KOEPP, D.M.; SILVER, P.A.; EMERMAN, M. HIV-1 Vpr interacts with the nuclear transport pathway to promote macrophage infection. **Gene Development**, United States, v. 12, p. 175-185, 1998.

WATT, F.M.; HOGAN, B.L. Out of Eden: Stem cells and their niches. **Science**, Washington, v. 287, p. 1427-1430, 2000.

WATTIAUX, R.; LAURENT, N.; WATTIAUX-DE, S.; JADOT, M. Endosomes, lysosomes: their implication in gene transfer, **Advanced Drug Delivery Reviews**, Netherlands, v. 41, p.201-208, 2000.

WERNIG, M. In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state. **Nature**, London, v. 448, p. 318-324, 2007.

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

WOBUS, A.M; BOHELER, K.R. Embryonic stem cells: prospects for developmental biology and cell therapy. **Physiological reviews**, Washington, v. 85, n.2, p. 635-678, 2005.

XIA, X.; ZHANG, Y.; ZIETH, C.; ZHANG, S.C. Transgenes delivered by lentiviral vector are suppressed in human embryonic stem cells in a promoter-dependent Manner. **Stem Cells and Development**, United State, v. 16, p. 167-176, 2007.

YAMANAKA, S. Strategies and new developments in the generation of patient-specific pluripotent stem cells. **Cell Stem Cell**, Cambridge, v. 1, n. 1, p. 39-49, 2007.

YATES, F.; DALEY, G.Q. Progress and prospects: gene transfer into embryonic stem cells. **Gene Therapy**, Hampshire, UK, v. 13, p.1431-1439, 2006.

YEOM, Y.I.; FUHRMANN, G.; OVITT, C.E; BREHM, A.; OHBO, K. Germline regulatory element of Oct-4 specific for the totipotent cycle of embryonal cells. **Development**, Cambridge, v. 122, p. 881-894, 1990.

YU, J.; VODYANIK, M.A.; SMUGA-OTTO, K.; ANTOSIEWICZ-BOURGET, J.; FRANE, J.L.; TIAN, S.; NIE, J.; JONSDOTTIR, G.A.; RUOTTI, V.; STEWART, R. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. **Science**, Washington, v. 318, p. 917-1920, 2007.

ZABNER, J.; FASBENDER, A.J.; MONINGER, T.; POELLINGER, K.A.; WELSH, M.J. Cellular and molecular barriers to gene transfer by a cationic lipid, **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, MD, v. 270 p.18997-19007, 1995.

ZUFFEREY, R.; DULL, T.; MANDEL, R. J.; BUKOVSKY, A.; QUIROZ, D.; NALDINI, L.; TRONO, D. Self - inactivating lentivirus vector for safe and efficient in vivo gene delivery. **Journal of Virology**, Washington, v. 72, p. 9873-9880, 1988.

APÊNDICE

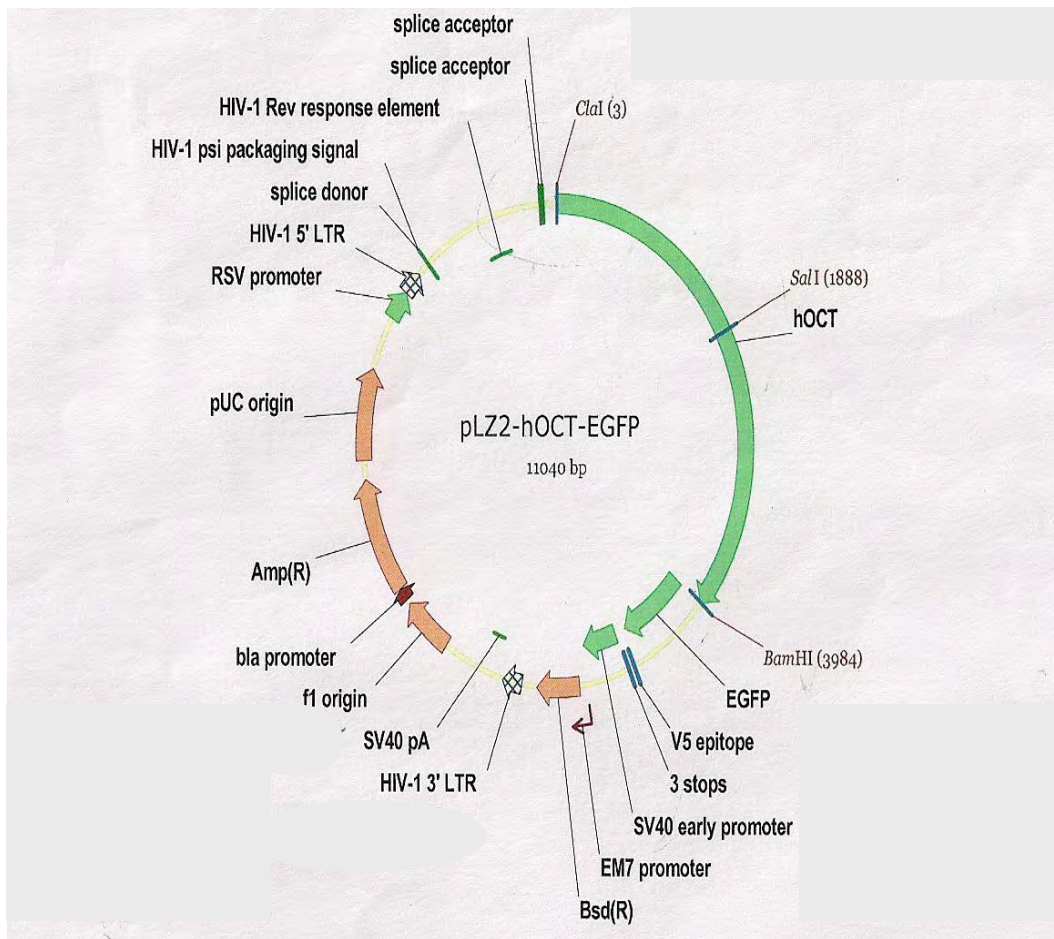


Figura 1. Mapa do vetor doador pLZ2-hOCT-EGFP. Em vermelho, enzimas de restrição com apenas um sítio de corte. (Vector NTI® Advanced 10 software- Invitrogen, Roslin Institute, 2008). hOCT (human Oct-4); Bsd (site de resistência a Blasticidina). Figura escaneada.

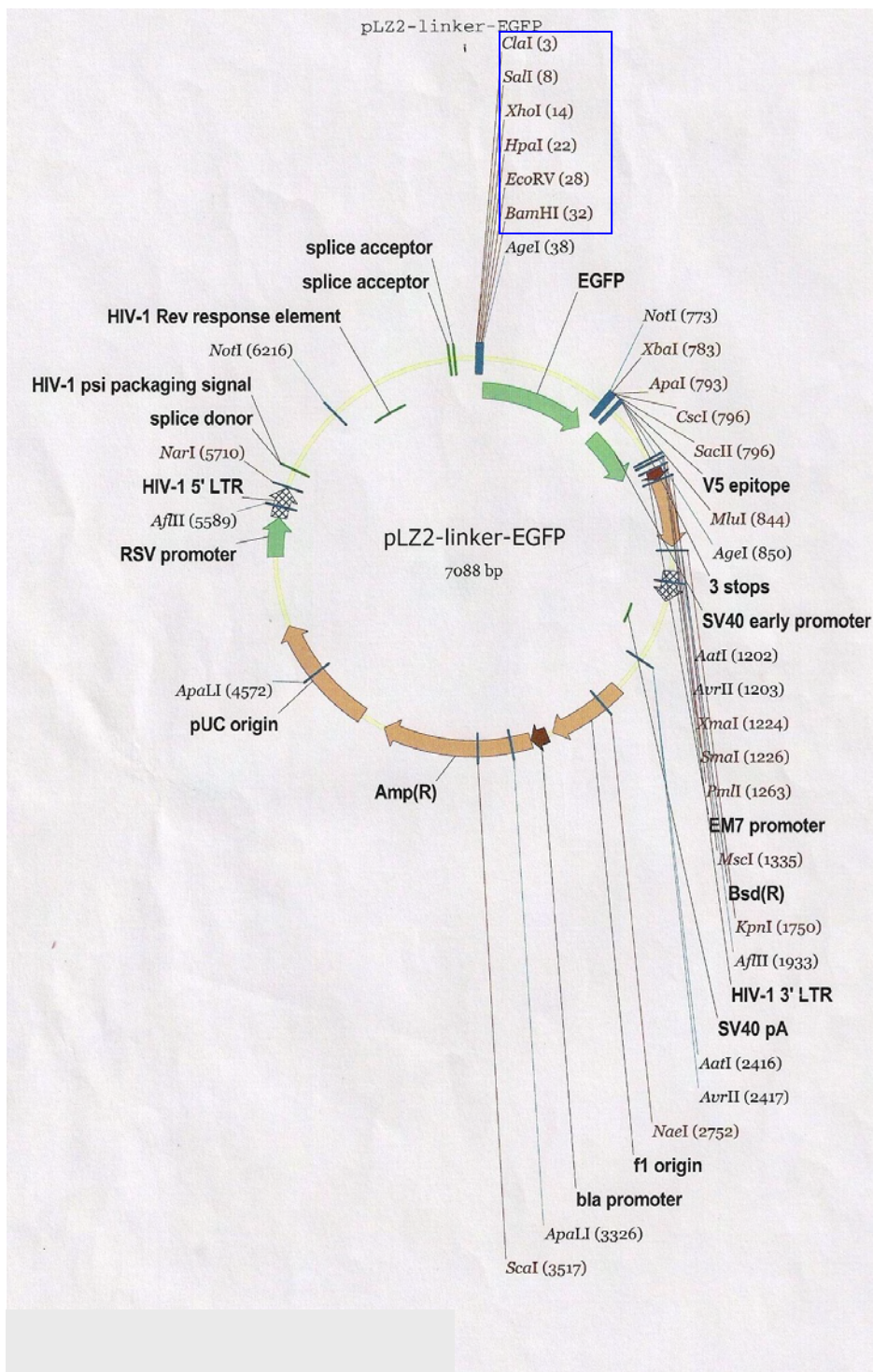


Figura 2. Mapa do vetor sem a sequência promotora e a região ligante (pLZ2-linker-EGFP). Em vermelho, enzimas de restrição com apenas um sítio de corte; circulado em azul enzimas usadas para com ligantes (Vector NTI® Advanced 10 software- Invitrogen, Roslin Institute, 2008). Bsd (site de resistência a Blasticidina). Figura escaneada.

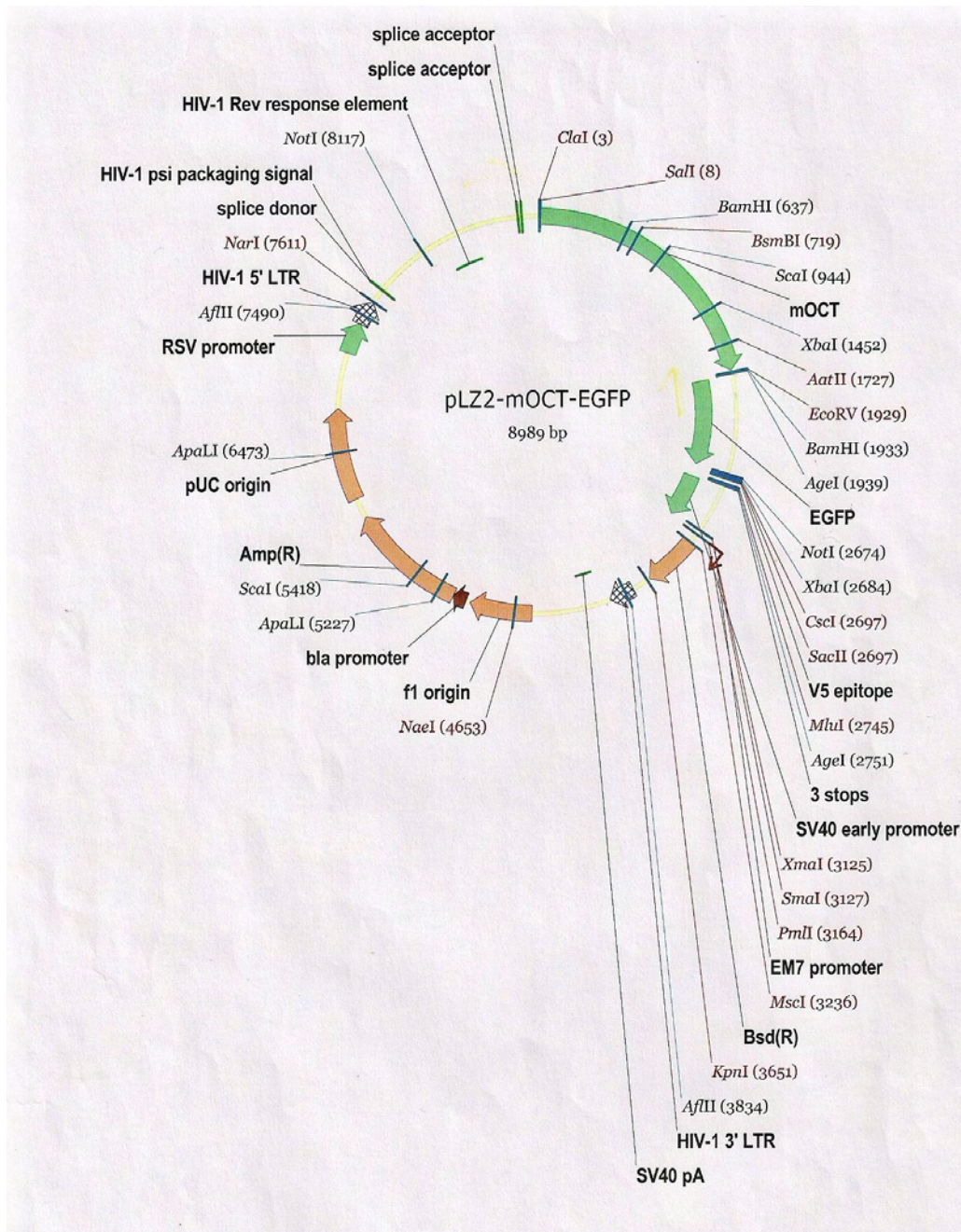


Figura 3. Mapa do vetor recombinante pLZ2-mOCT-EGFP. Em vermelho, enzimas de restrição com apenas um sítio de corte. (Vector NTI® Advanced 10 software- Invitrogen, Roslin Institute, 2008). mOCT (mouse Oct-4); Bsd (site de resistência a Blasticidina). Figura escaneada.

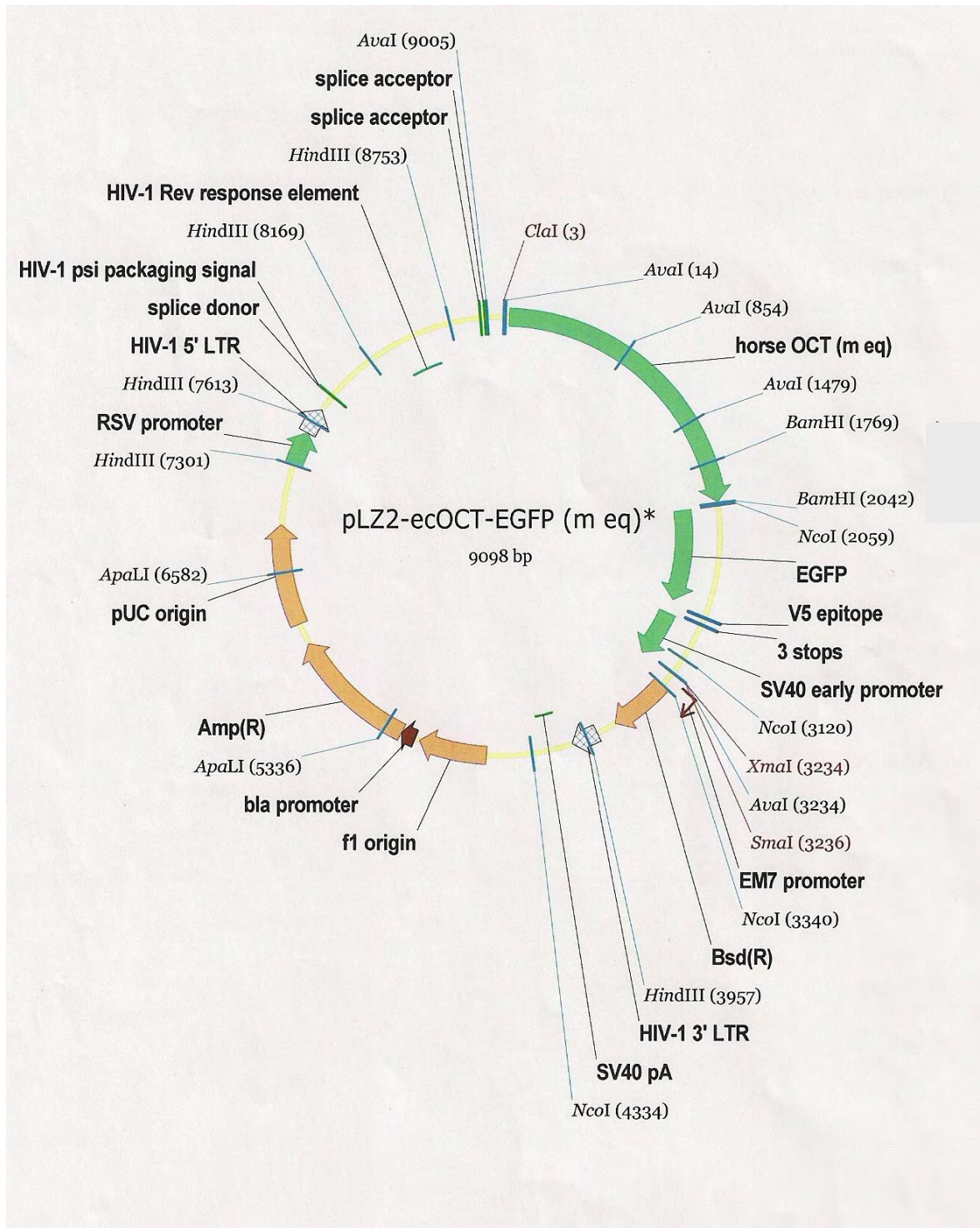


Figura 4. Mapa do vetor recombinante pLZ2-ecOCT-EGFP (meq). Em vermelho, enzimas de restrição com apenas um sítio de corte. (Vector NTI® Advanced 10 software- Invitrogen, Roslin Institute, 2008). ecOCT (meq) (*eqqus caballus* (horse) Oct-4 promoter-mouse equivalent); Bsd (site de resistência a Blasticidina). Figura escaneada.

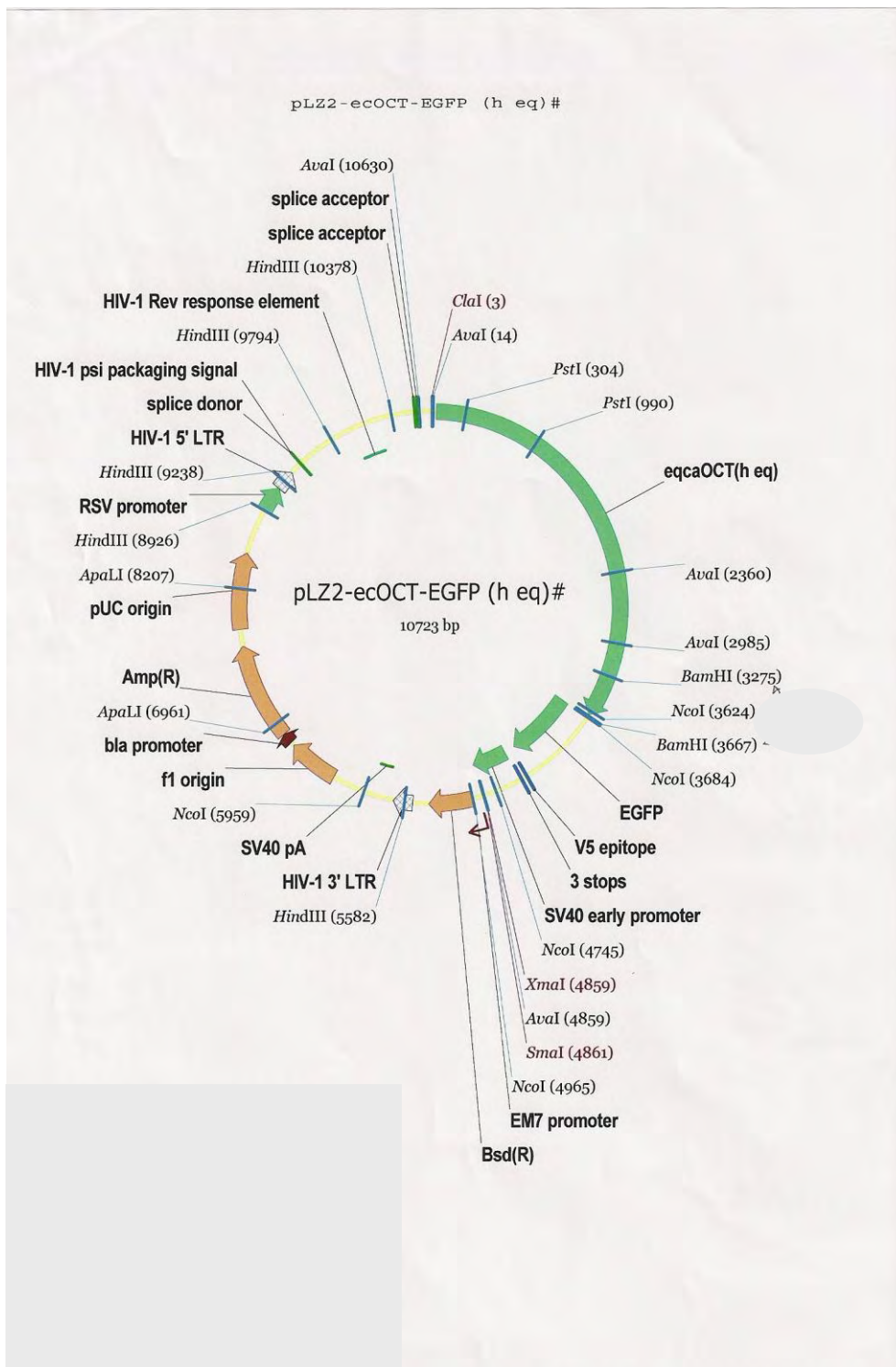


Figura 5. Mapa do vetor recombinante pLZ2-ecOCT-EGFP (heq). Em vermelho, enzimas de restrição com apenas um sítio de corte. (Vector NTI® Advanced 10 software- Invitrogen, Roslin Institute, 2008). ecOCT (heq) (*eqqus caballus* (horse) Oct-4 promoter-human equivalent); Bsd (site de resistência a Blastocidina). Figura escaneada.