PRISCILA GERMANY CORRÊA DA SILVA

ANÁLISE INTERESPECÍFICA DA EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS À PLURIPOTÊNCIA DURANTE O DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO

RECIFE/PE
2017

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA

PRISCILA GERMANY CORRÊA DA SILVA

ANÁLISE INTERESPECÍFICA DA EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS À PLURIPOTÊNCIA DURANTE O DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciência Veterinária.

Orientador: Prof. Marcos Antonio Lemos de Oliveira
Co-Orientador: Marcelo Tigre Moura

RECIFE/PE
2017

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA

ANÁLISE INTERESPECÍFICA DA EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS À PLURIPOTÊNCIA DURANTE O DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO

Dissertação de Mestrado elaborada por

PRISCILA GERMANY CORRÊA DA SILVA

Aprovada em ...../...../.....

BANCA EXAMINADORA

_____

Prof. Marcos Antonio Lemos de Oliveira
Orientador – Departamento de Medicina Veterinária da UFRPE

_____

Dr. Marcelo Tigre Moura
Coorientador - Departamento de Medicina Veterinária da UFRPE

_____

Dra. Roberta Lane de Oliveira Silva
Departamento de Genética da UFPE

_____

Dr. Sérgio Alves do Nascimento
Departamento de Medicina Veterinária da UFRPE

Dedico ao meu irmão Carlos Eduardo (kadu) e meu eterno Sr. Gato Leo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por tudo que me proporcionou nessa vida, pela minha família, amigos, animais e todos os obstáculos que enfrentei e que estão a vir. Me mostra em cada detalhe da vida a sua força e luz. Eterna gratidão por me apresentar cada riqueza dessa força divina.

A minha família, pais e irmãos, sempre ao meu lado em todos altos e baixos dessa jornada pessoal e acadêmica. Sei que sempre vou ter todo o apoio, carinho e amor deles pra tudo que precisar (mesmo com discórdias).

Aos meus irmãos que tanto amo. Luís com sua calma e bondade eterna, mesmo em silêncio, sempre está com o coração ligado e em alerta, independente onde esteja,sinto seu amor. Ao meu irmão Kadu, o ciumento, a qual lembro de sua maturidade, seu sorriso, sua força, seus abraços. Kadu sempre me mostrou a força interna e acadêmica que tenho, hoje reconheço tudo oque sempre dizia e em cada detalhe de vida que enfrento e alegrias, sinto saudade da sua presença física. Meu irmão Luiz Guilherme, veio ao mundo bem depois, sinto o grande carinho e amor que tem dentro de você, acompanhado de muita pureza em seu coração, sempre estarei ao seu lado te levantando e dando força.

Ao meu orientador – professor Marcos Antonio Lemos de Oliveira, a muitas oportunidades acadêmicas recebidas e assim aproveitadas, desde a graduação. Abrindo portas e oportunidades que a vida acadêmica me proporciona.

Ao meu co-orientador e amigo- professor Marcelo Tigre Moura. Entre confrontos e acertos, sempre mostrou o melhor e o meu melhor, seja na vida acadêmicas, seja no pessoal. Sou eternamente grata por me mostrar o caminho da luta pessoal, assim sinto a força interna que tenho.

As meninas do laboratório de Reprodução,a Ludymila, Pábola e Maiana, pela força e ajuda na construção desse trabalho.

Aos membros do Laborátorio de Genética e Biotecnologia Vegetal - LGBV, na UFPE, pela paciência e grande ajuda na conclusão dessa jornada.

Aos funcionários da UFRPE, sempre proporcionando ajuda e alegria durante toda essa jornada.

A minha amiga de infância Paloma Saldanha, não importa a nossa diferença, seus cuidados e amor sempre estarão presentes. Minha amiga Ingrid Pascoal, sempre atenciosa e amada desde da graduação e em um momento muito crucial de minha vida acadêmica e pessoal.

A todos que me ajudaram de forma direta e indireta na formação desse trabalho e a trilhar mais um novo caminho em minha vida.

“ Tupo posso naquele que me fortalece”
Filipenses 4: 13

"Ser feliz não é ter uma vida perfeita. Mas usar as lágrimas para irrigar a tolerância. Usar as perdas para refinar a paciência. Usar as falhas para esculpir a serenidade. Usar a dor para lapidar o prazer. Usar os obstáculos para abrir as janelas."
Augusto Cury

RESUMO

A embriogênese inicia com a junção dos gametas. O embrião é formado por células semelhantes em morfologia e que possuem a condição de totipotência, ou seja, a capacidade de formar todos os tecidos do feto e a placenta. A diferenciação morfológica do embrião no estádio de blastocisto resulta na formação do embrioblasto e trofoblasto. O embrioblasto é formado por células pluripotentes, que tem potencial de formação de tecidos do feto, enquanto que o trofoblasto é multipotente e formará a placenta. Os genes relacionados à pluripotência (GRP) atuam como importantes fatores de manutenção da totipotência e pluripotência de embriões de diferentes espécies. No entanto, o entendimento sobre a atividade de GRP em ruminantes permanece limitado a poucos genes e estádios do desenvolvimento. A comparação da expressão dos GRP pode determinar o perfil de expressão temporal destes genes, identificando possíveis diferenças entre as espécies. Dessa forma, o objetivo foi comparar a expressão de oito GRP durante o desenvolvimento embrionário de ovinos e bovinos. Para tanto, embriões ovinos e bovinos foram produzidos *in vitro* e avaliados em quatro estádios de desenvolvimento (ovócitos, embriões clivados - duas a oito células, mórula e blastocisto) quanto à sua detecção por PCR em tempo real (RT-qPCR). Com o intuito de estimar possíveis diferenças no perfil de expressão e atividades dos GRP em ruminantes, análises através da bioinformática foram realizadas quanto à conservação das sequências de proteína. Os genes OCT4, RONIN, ZFP281, ZFX e KLF5 foram detectados em todos os estádios nas duas espécies. CMYC foi detectado em todas as amostras de bovinos, embora em ovinos seja expresso a partir da fase de clivagem. Em contrapartida, DAX1 foi detectado em todas as amostras de ovinos, e em bovinos, não foi verificada detecção apenas em mórula. GLIS1 apresentou a maior variação entre as espécies, sendo detectado apenas em ovócitos de bovinos e em embriões clivados e blastocistos de ovinos. O grau de conservação dos GRP em nível de proteína mostrou-se alto, embora com diferenças entre os genes. Portanto, as análises *in silico* sugerem que a função dos GRP é conservada em ruminantes. Em conclusão, a expressão temporal dos GRP difere entre bovinos e ovinos, sugerindo possíveis diferenças na utilização destes genes como marcadores moleculares de embriões entre espécies.

Palavras- chaves: bioinformática, *Bos taurus*, embriogênese embriologia, expressão gênica, oócito, *Ovis aries*, RNA mensageiro.

ABSTRACT

Embryogenesis begins with gamete fusion. The embryo is formed by morphologically similar cells that hold the condition of totipotency, that is, the capacity to give rise to all tissues that make up the fetus and the placenta. The morphological differentiation in the embryo results in formation of embryoblast and trophoblast. The embryoblast is formed by pluripotent cells, that have potential to give rise to all tissues that make up the fetus, while the trophoblast is multipotent and forms the placenta. Pluripotency-associated genes (PAG) play key roles in maintenance of embryo totipotency and pluripotency in different species. However, the understanding of PAG activity in ruminants remains restricted to few genes and embryonic developmental stages. The comparison of PAG gene expression among species would allow to determine the temporal expression profile of these genes, further allowing to define putative differences in gene expression patterns within *species*. The work was aimed to compare the expression of eight PAG during embryonic development in sheep and cattle. Embryos from sheep and cattle were produced *in vitro* and gene expression analysis was carried out in four developmental stages (oocytes, cleavages-stage - 2 to 8 cells, morula and blastocyst) for their detection by Real Time PCR (RT-qPCR). In order to estimate possible diferences in expression profile and activity of PAG between ruminants, *in silico* analysis was performed addressing structural conservation at the and protein level. OCT4, RONIN, ZFP281, ZFX and KLF5 were detected in all developmental stages of both species. CMYC was detected in all cattle samples, although it was expressed in sheep from cleavage stage onwards. However, DAX1 was detected in all sheep samples, while in cattle, it was not found at the morula stage. GLIS1 showed the greatest variation between species, since it was only detected in cattle oocytes and in sheep cleavage-stage embryos and blastocysts. The PAG conservation at the protein level was high, despite differences among genes. Moreover, *in silico* analysis suggested that PAG function is conserved between ruminants. In conclusion, temporal expression of PAG differs between sheep and cattle, suggesting possible differences in their usage as molecular markers for embryos across species.

Keywords: Bioinformatics, *Bos taurus*, egg, embryogenesis, embryology, messenger RNA, gene expression, messenger RNA, *Ovis aries.*

LISTA DE ILUSTRAÇÃO

Figura 1. Gametogênese em ruminantes. 18

Figura 2. Desenvolvimento embrionário em ruminantes. 20

Figura 3. Clonagem de animais por transferência nuclear (TN) 21

Figura 4. Produção de células-tronco embrionárias induzidas (CTEI).....24

Figura 5. Fluxograma das atividades para avaliação da expressão temporal de genes relacionados à pluripotência em embriões de ovinos e bovinos 45

Figura 6. Curvas de amplificação para oito GRP em ovócitos e embriões de ovinos e bovinos 53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Expressão dos genes relacionados à pluripotência em ruminantes 26

Tabela 2. Primers utilizado para detecção dos genes relacionados à pluripotência em gametas e embriões de ovinos e bovinos por RT-qPCR.....51

Tabela 3. Produção *in vitro* de embriões ovinos e bovinos.....52

Tabela 4. Expressão temporal dos genes relacionados à pluripotência em gametas e embriões ovinos e bovinos.....54

Tabela 5. Valores de Cq e melting obtidos por PCR tempo real (RT-qPCR) para oito GRP em ovócitos e embriões de ovinos e bovinos.....55

LISTA DE ANEXOS

Anexo A. Valores de melting para oito GRP em ovócitos e embriões de ovinos e bovinos. 68

Anexo B. Tamanho da proteína, ponto isoelétrico, peso molecular e localização subcelular para oito GRP em ovinos e bovinos.....69

Anexo C. Alinhamento múltiplo protéico das treze isoformas de ZFX em ovinos.....70

Anexo D. Análise fenética de oito genes relacionados à pluripotência 72

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA – Análise de variância

BLAST- Basic Local Alignmemt Search Tool

CIV - Cultivo *in vitro*

CPG- Célula primordial germinativa

CTE- Células-tronco embrionária

CTEI- Células-tronco embrionária induzidas

FIV- Fertilização *in vitro*

FSH- Hormônio folículo estimulante

GRP- Genes relacionados à pluripotência

LH- Hormônio luteinizante

MII- Metáfase II

MIV- Maturação *in vitro*

PBS- Phosfatase Buffered Saline

PCR- Reação em Cadeia da Polimerase

PIV- Produção *in vitro*

RT- PCR- Reação transcriptase reversa seguida de reação em cadeia da polimerase

RT- qPCR- Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real

SFB- Soro fetal bovino

SOE- Soro de ovelha em estro

SOFaa- Fluido sintético do oviduto suplementado com aminoácidos

TCM199- Tissue Culture Medium 199

SUMÁRIO

1. Introdução 15

2. Revisão de Literatura 17

2.1. Gametogênese 17

2.2. Fecundação 18

2.3. Desenvolvimento embrionário 19

2.4. Totipotência 21

2.5. Pluripotência 22

2.5.1. Controle da pluripotência 23

2.5.2. Genes relacionados à pluripotência (GRP) 24

2.5.2.1. C-MYC 25

2.5.2.2. Dosage-sensitive sex reversal, adrenal hypoplasia critical region, chromosome X, gene1 (DAX1) 25

2.5.2.3. Glis family zinc finger 1 (GLIS1) 27

2.5.2.4. Kruppel- Like Factor 5 (KLF5) 27

2.5.2.5. Octamer- binding transcription factor 4 (OCT4) 27

2.5.2.6. RONIN 28

2.5.2.7. Zinc Finger Protein (ZFP281) 29

2.5.2.8. Zinc Finger Protein (ZFX) 29

2.6. Avaliação da expressão gênica em gametas e embriões 29

3. Referências 31

4. Artigo Científico 41

4.1 Expressão Temporal de genes relacionados à pluripotência em embriões de ovinos e bovinos 42

5. Considerações Finais 67

6. Anexos 68

1. INTRODUÇÃO

A embriogênese inicial em mamíferos representa os primeiros sete dias de desenvolvimento destas espécies (ROSSANT, 2007; COCKBURN; ROSSANT, 2010). Do momento da fecundação e formação do zigoto ao estádio de blastocisto, o embrião apresenta diversas mudanças morfológicas (ROSSANT, 2007). Após a fecundação, o embrião passa por ciclos de divisão celular, denominados de clivagens. As células do embrião conhecidas como blastômeros, ainda possuem forma semelhante e pouca adesão entre suas membranas (FRANKENBERG et al., 2016).

Em seguida, o embrião passa por uma etapa de compactação, onde as células mais internas mantém a morfologia esférica, enquanto que as células externas mudam para uma morfologia epitelial (COCKBURN; ROSSANT, 2010). Uma região do embrião começa a acumular líquido, resultando na formação da blastocele. A expansão da blastocele acontece paralelamente ao processo de diferenciação celular no embrião no estádio de blastocisto, quando há a formação do embrioblasto e trofoblasto (ROSSANT, 2007). Existem diferenças significativas na morfologia dos embriões nas diversas espécies de mamíferos (FRANKENBERG et al., 2016), embora as propriedades das células que compõem o embrião sejam semelhantes.

Este é o único período do desenvolvimento dos mamíferos em que existem células com a capacidade de formar todos os tecidos do organismo e da placenta (ROSSANT, 2016; FRANKENBERG et al., 2016). Esta capacidade foi inicialmente demonstrada pelo isolamento blastômeros de embriões de anfíbios e resultou no nascimento de múltiplos girinos (TAGARELLI et al., 2004). Experimentos semelhantes foram realizados em mamíferos (MOORE et al., 1968; WILLADSEN, 1981), demonstrando que esta capacidade é conservada em vertebrados. Entretanto, apenas embriões com até oito blastômeros apresentam a capacidade de formar o feto e a placenta, denominado de totipotência (ROSSANT, 2016).

A introdução de blastômeros de embriões em compactação em embriões receptores demonstrou que estas células possuem a capacidade de contribuir para a formação dos diversos tecidos que formam o feto. Esta capacidade de diferenciação é definida como pluripotência (ROSSANT, 2007). Entretanto, estas células não possuem a capacidade para contribuir para a formação da placenta (ROSSANT, 2016).

A produção *in vitro* (PIV) de embriões consiste na maturação dos ovócitos, fecundação e desenvolvimento dos embriões fora do trato reprodutor feminino (GALLI et al., 2003). O desenvolvimento da PIV facilitou o acesso aos embriões de mamíferos e aumentou sua disponibilidade para pesquisa científica. Dentre as espécies de produção, embriões PIV de equinos, suínos, caprinos, ovinos e búfalos são produzidos com eficiência variável (SURESH et al., 2009; GIL et al., 2010; LEEMANS et al., 2016; PARAMIO; IZQUIERDO, 2016), enquanto que em bovinos a técnica tornou-se comercial e utilizada em larga escala em diversos países (HASLER, 2014). A variabilidade da eficiência da PIV entre as espécies se deve a exigências espécie-especificas, principalmente para a fecundação e cultivo dos embriões (LEEMAN et al., 2016; ROMAR et al., 2016). O desenvolvimento dos protocolos de PIV tem contribuído para o entendimento das exigências de gametas e embriões das diferentes espécies.

A tecnologia da PIV de embriões contribuiu para o estabelecimento da clonagem por transferência nuclear (TN). A clonagem por TN permite a produção de animais geneticamente idênticos a partir de células embrionárias, fetais ou de animais adultos (WILMUT et al., 1997; KEEFER, 2015). A técnica de TN consiste na remoção dos cromossomos do ovócito e introdução do núcleo da célula de um animal de interesse (WILMUT et al., 1997; 2002; MOURA, 2012). A clonagem por TN demonstrou que células pluripotentes ou somáticas podem ser convertidas em totipotentes (BORTVIN et al., 2003; MOURA, 2012). Apesar disso, a eficiência da clonagem por TN permanece baixa e os animais obtidos pela tecnologia podem apresentar malformações ou baixa viabilidade neonatal (WILMUT et al., 2002; KEEFER, 2015).

As avaliações de gametas e embriões em nível molecular contribuem para estimar o potencial de diversos processos biológicos como a competência ovocitária e capacidade de estabelecer gestações após a transferência dos embriões (HALL et al., 2005; BEYHAN et al., 2007; KIM et al., 2013; URREGO et al., 2015). Mais especificamente, os genes relacionados a pluripotência (GRP) têm sido caracterizados em células totipotentes e pluripotentes e apresentam expressão restrita as células germinativas primordiais, gametas e embriões antes da implantação (BOYER et al., 2005; MOURA, 2012). Além disso, os GRPs são necessários para manutenção da viabilidade de blastômeros e células pluripotentes. Células pluripotentes que apresentam GRPs inativos entram em morte celular programada por apoptose ou sofrem diferenciação celular expontânea (MOURA, 2012).

Evidências em nível celular e molecular mostram que as espécies apresentam variação quanto a eficiência em tecnologias como PIV e a clonagem por TN (WILMUT et al., 2002;

KEEFER, 2015), bem como diferenças menos intensas como flutuações na expressão gênica ou susceptibilidade as condições *in vitro* (WILMUT et al., 2002; BERG et al., 2011; ROSSANT, 2011). Além disso, variações nas condições experimentais dificultam a comparação entre diferentes espécies ou na mesma espécie. Por isso, análises interespecíficas sob condições experimentais semelhantes permitirão determinar o perfil temporal de expressão gênica em ovinos e bovinos de forma mais precisa. A determinação do perfil de expressão de GRPs em ovinos e bovinos deverá auxiliar no desenvolvimento de melhores protocolos de PIV e clonagem por TN e indicar possíveis diferenças na regulação destes genes entre as espécies.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Gametogênese

A gametogênese é o processo pelo qual são formados os gametas da espécies (MATSUI, 2010). As células primordiais germinativas (CPG) são as primeiras células que apresentam potencial para formação da linhagem germinativa no embrião. As CPGs são formadas a partir do epiblasto e migram para as cristas gonadais do feto (SASAKI; MATSUI, 2008). Neste local, as CPGs passam por diversos ciclos de mitose, por um ciclo final de duplicação dos cromossomos e se diferenciam em ovogônias ou espermatogônias, dependendo do sexo do feto (SASAKI; MATSUI, 2008; MATSUI, 2010). Em seguida, as ovogônias ou espermatogônias entram em meiose, um processo com diversos eventos em nível celular e molecular para formação dos gametas viáveis (Figura 1). Na primeira divisão meiótica, as células germinativas se tornam haplóides, mas com os cromossomos duplicados (2C). Na segunda divisão meiótica ou equacional, as células filhas permanecem haplóides e apenas uma cromátide, enquanto que os gametas apresentam sua morfologia definitiva (Figura 1).

Durante a PIV de embriões, os ovócitos são recuperados em Prófase I e terminam a primeira divisão meiótica após a maturação *in vitro* (MIV), semelhante aos eventos que acontecem durante o pico pré-ovulatório de hormônio luteinizante (LH) e ovulação que ocorrem *in vivo* (Figura 1). Após a ovulação ou MIV, o ovócito em metáfase II está apto ao processo de fecundação.

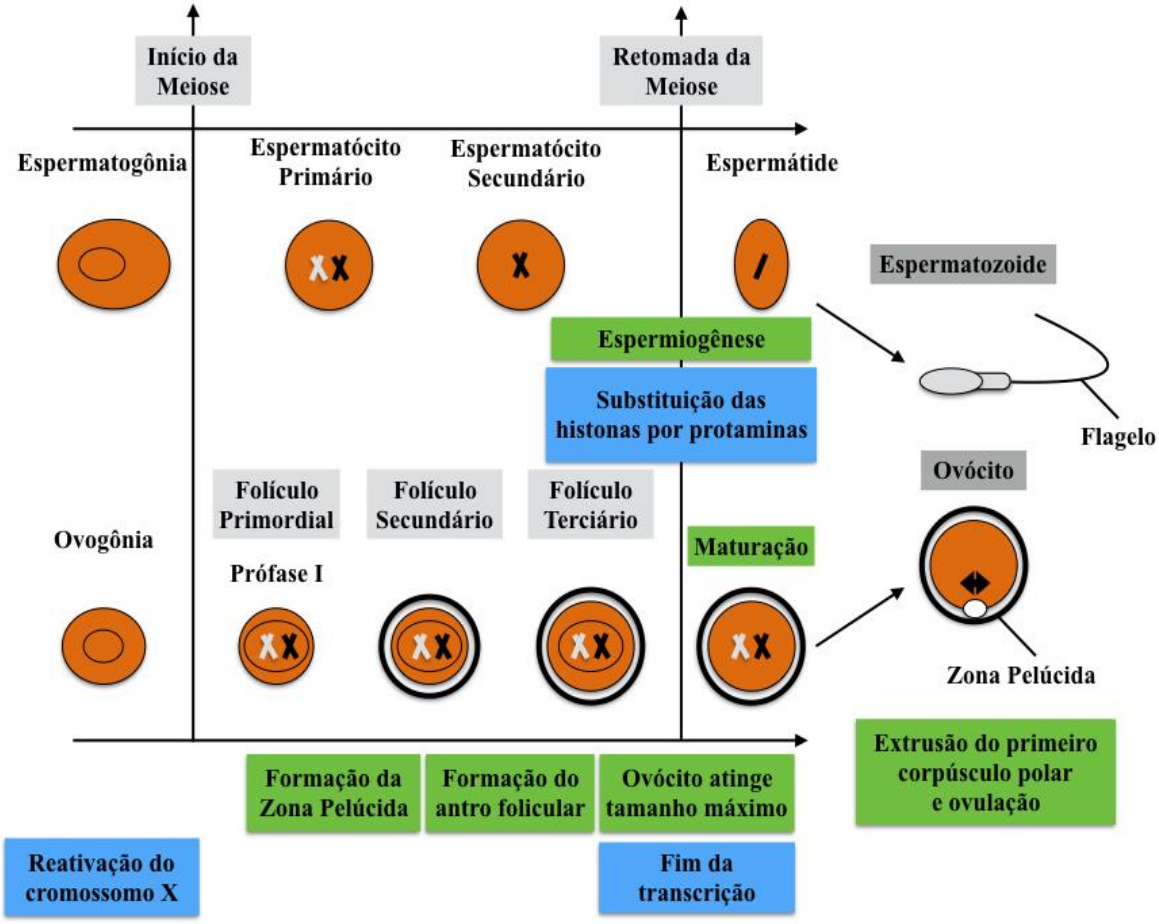


Figura 1. Gametogênese em ruminantes.

2.2 Fecundação

O espermatozoide no momento da ejaculação não é capaz de fecundar o ovócito (JIN; YANG, 2017). Durante o trajeto no trato reprodutivo da fêmea, os espermatozoides perdem fatores associados à membrana como o colesterol, num processo denominado capacitação (GERVASI; VISCONTI, 2016). O processo de capacitação ocorre *in vivo* e torna o espermatozoide capaz de fecundar o ovócito, embora pouco se conheça sobre os fatores responsáveis por esse processo (LEEMANS et al., 2016; ROMAR et al., 2016). Os fatores capacitantes permanecem desconhecidos em ovinos, suínos e equinos (SURESH et al., 2009; GIL et al., 2010; LEEMANS et al., 2016; PARAMIO; IZQUIERDO, 2016), embora em bovinos a heparina tenha sido identificada e seja eficiente para capacitação espermática (PARRISH, 2014).

O espermatozoide atravessa as camadas de células do cumulus e degrada o ácido hialurônico produzido por estas células com auxílio da hialuronidase, enzima produzida no testículo (BUFFONE et al., 2014). O contato entre a zona pelúcida e o espermatozoide inicia a reação do acrossoma, que dissolve a membrana e permite ao gameta acessar o ovócito (BUFFONE et al., 2014). A fusão do espermatozoide com a membrana do ovócito culmina a fecundação, que resulta na migração dos grânulos corticais e reinicio da meiose no ovócito (YANAGIMACHI, 2005).

2.3 Desenvolvimento embrionário

Após o processo de fecundação e ativação do ovócito, ocorre o início da replicação do DNA dos genomas haplóides, seguido da singamia dos pró-núcleos e divisão mitótica para formação do embrião com duas células ou blastômeros (ROSSANT, 2007; SILVA et al, 2016). Em seguida, o embrião passa por diversas divisões celulares, denominadas de clivagens, que resultam na diminuição do volume dos blastômeros (Figura 2). Durante esta etapa do desenvolvimento embrionário, não há transcrição nos blastômeros e o controle dos eventos no embrião são regulados por fatores maternos estocados no ovócito. Por isso, as clivagens são rápidas, como fases G1 e G2 curtas durante o ciclo celular.

No período de transição entre os estádios de oito e dezesseis células, os embriões passam pelo processo de ativação do genoma embrionário (MEMILI; FIRST, 2000; SILVA et al, 2016). A partir deste momento, o embrião aumenta gradativamente a sua atividade transcricional e no momento da implantação os embriões são responsáveis pelo RNAm presente nas células.

Quando a ativação do genoma embrionário é concluída, o embrião passa por um período de compactação (FRANKENBERG et al., 2016), quando os blastômeros apresentam maior adesão entre si e a camada mais externa de células começa a apresentar uma morfologia epitelial, em contraste com a morfologia oval dos blastômeros mais internos do embrião (COCKBURN; ROSSANT, 2010). Esta diferença na morfologia dos blastômeros se torna mais evidente no estádio de mórula (Figura 2), quando já são observadas variações na expressão de genes entre os dois tipos de células (ROSSANT, 2016).

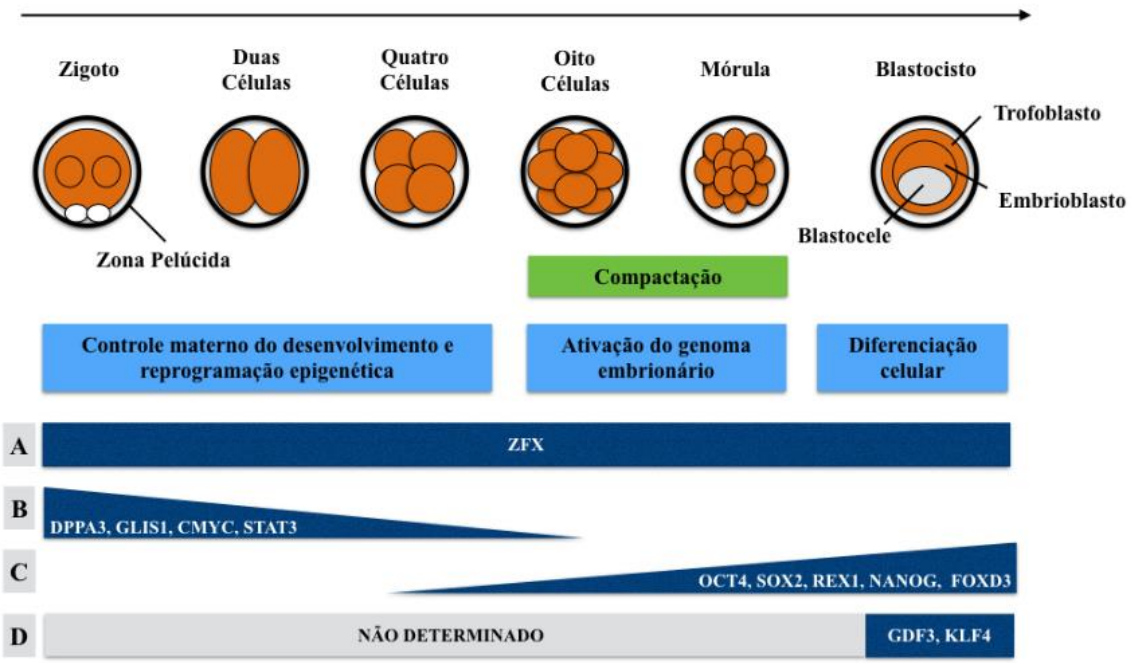


Figura 2. Desenvolvimento embrionário em ruminantes.

Quando a ativação do genoma embrionário é concluída, o embrião passa por um período de compactação (FRANKENBERG et al., 2016), os blastômeros apresentam maior adesão entre si e a camada mais externa de células começa a apresentar uma morfologia epitelial, em contraste com a morfologia oval dos blastômeros mais internos do embrião (COCKBURN; ROSSANT, 2010). Esta diferença na morfologia dos blastômeros se torna mais evidente no estádio de mórula (Figura 2), quando já são observadas variações na expressão de genes entre os dois tipos de células (ROSSANT, 2016).

O processo de diferenciação celular que se iniciou no período de compactação termina com a formação do blastocisto (COCKBURN; ROSSANT, 2010; SILVA et al, 2016). As células mais externas do blastocisto formam o trofoblasto, que apresenta morfologia epitelial achatada e delimitam a forma tridimensional do embrião. As células do embrioblasto apresentam morfologia oval e se apresentam agregadas e aderidas ao trofoblasto. As mudanças morfológicas evidenciam que os dois tipos celulares apresentam funções e capacidades de diferenciação distintas. O trofoblasto tem a capacidade de dar origem aos tipos celulares que formam a placenta e seus anexos, enquanto que o embrioblasto tem o potencial de se diferenciar nos tipos celulares que formam o feto e anexos fetais (COCKBURN; ROSSANT, 2010; ROSSANT, 2016).

2.4 Totipotência

A grande capacidade de diferenciação celular dos embriões foi foco de experimentação desde o século XIX (TAGARELLI et al., 2004). Estudos iniciais utilizaram embriões de anfíbios, pois são fáceis de cultivar em soluções com poucos sais, são de tamanho considerável em relação aos embriões de mamíferos e resistentes a manipulação (GURDON, 2006).

O isolamento mecânico de dois blastômeros de um embrião de *Xenopus laevis* resultou na formação de dois girinos, mostrando que estes blastômeros apresentavam a capacidade de formar todo o organismo. Experimentos semelhantes com embriões com até oito blastômeros mostraram que, esta capacidade de diferenciação celular denominada de totipotência, permanece em embriões até este estádio. Relatos semelhantes foram descritos em mamíferos, demonstrando a totipotência em blastômeros de embriões no período de clivagem (MOORE et al., 1968; WILLADSEN, 1981).

Após a ativação do genoma embrionário, nenhuma célula do organismo possui a capacidade de totipotência. A única forma artificial de obter células totipotentes é através da clonagem por transferência nuclear (TN) (Figura 3).

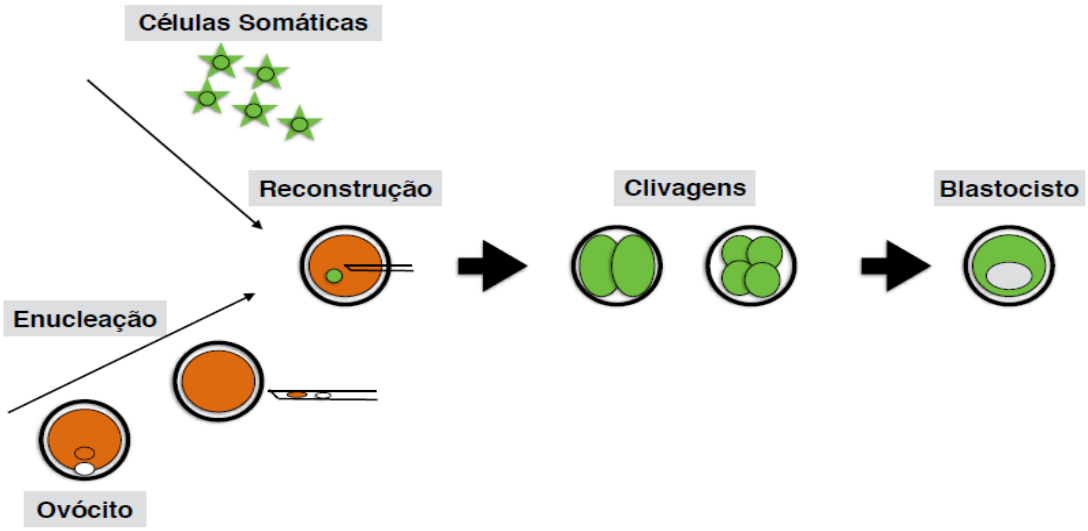


Figura 3. Clonagem de animais por transferência nuclear (TN).

A introdução do núcleo de uma célula diferenciada no citoplasma de um ovócito inicia um mecanismo denominado de reprogramação celular, que resulta na formação de um zigoto equivalente ao obtido pelo processo de fecundação. No entanto, a eficiência da clonagem por

TN permanece entre 1 a 5% dos embriões resultam em nascimentos nas espécies de mamíferos (WILMUT et al., 2002; KEEFER, 2015).

2.5 Pluripotência

A pluripotência é definida como a capacidade da célula de se diferenciar em todos os tecidos dos três folhetos germinativos, endoderma, mesoderma e ectoderma (SMITH, 2001). As células pluripotentes apresentam alta relação núcleo-citoplasma, múltiplos nucléolos e ciclos celulares curtos. As células do embrioblasto se diferenciam no epiblasto e hipoblasto, que formarão o feto e o saco vetilínico, respectivamente (COCKBURN; ROSSANT, 2010; ROSSANT, 2016). As células do epiblasto também dão origem as células germinativas primordiais (CGP) (MCLAREN, 2000), que migram para as cristas gonadais e formam os gametas (BARTON et al., 2016).

A introdução de células pluripotentes em embriões receptores demonstra que as células introduzidas contribuem para formação dos diversos tecidos do feto (PICARD et al., 1990). Em embriões modificados que formam apenas a placenta, a introdução de células pluripotentes permite a formação de fetos viáveis (NAGY et al., 1990).

O isolamento e cultivo *in vitro* de embrioblastos sob condições definidas permite estabelecer cultivos de células pluripotentes, denominadas células-tronco embrionárias (CTE) (EVANS; KAUFFMAN, 1981; SMITH, 2001). As CTEs em cultivo mantém a morfologia característica de células pluripotentes e podem ser propagadas indefinidamente (SMITH, 2001; MOURA, 2012). Quando expostas a substâncias indutoras de diferenciação celular, como fatores de crescimento e citocinas, elas perdem a condição pluripotente e formam células com características de diferentes tecidos. Além disso, quando submetidas a protocolos específicos, as CTE são capazes de formar populações homogêneas de células definidas, como neurônios ou células cardíacas (SMITH, 2001). A introdução de CTE em embriões receptores resulta na formação de quimeras, ou seja, animais com tecidos originados a partir das CTE e das células do embrião receptor (BRADLEY et al., 1984). No entanto, por serem pluripotentes, as CTE necessitam de um embrião receptor para formação da placenta (NAGY et al., 1990; EGGAN et al., 2002).

2.5.1 Controle da pluripotência

A investigação do controle da pluripotência em embriões durante o período antes da implantação apresenta dificuldades biológicas e técnicas. Do ponto de vista biológico, os embriões apresentam rápidas divisões celulares, períodos sem transcrição durante o controle materno do desenvolvimento e formação de diferentes tipos celulares no blastocisto (Figura 2). O número restrito de células que os embriões apresentam, mesmo no estádio de blastocisto (~100-150 células) dificultam as análises moleculares, exigindo por exemplo, a amplificação linear do transcriptoma (KOCABAS et al., 2006), que por sua vez pode interferir na avaliação da expressão relativa dos genes. Por estes fatores, as investigações em CTE tem contribuído mais para o entendimento do controle da pluripotência (MOURA, 2012; BOYER et al., 2005; KIM et al., 2008; YEO e NG, 2013). O desenvolvimento de novas metodologias para avaliação da cromatina e expressão gênica em pequenas quantidades de células (~100) ou até uma única célula poderão contribuir para elucidar o controle da pluripotência em embriões (DAHL; COLLAS, 2009, BOIANI; CIBELLI, 2016).

As primeiras investigações sobre o controle da pluripotência buscaram analisar as exigências para a propagação das CTE, evitando assim a diferenciação celular espontânea em cultivo (WILLIAM et al., 1988; HUANG et al., 2015). A identificação do fator inibitório da leucemia (LIF) para propagação das CTE de camundongos mostrou uma via de sinalização celular que impede a ativação de genes indutores de diferenciação (SMITH, 2001; MOURA, 2012; CHEN et al., 2016). Além da LIF, que atua pela modulação da via Janus quinase, outras vias de sinalização celular foram identificadas para propagação de CTE de camundongos (SMITH, 2001; HUANg et al., 2015; CHEN et al., 2016). Em humanos, as CTE necessitam da modulação de vias de sinalização diferentes das necessárias em camundongos (AMIT et al., 2000; CHEN et al., 2016).

Fatores intrínsecos também contribuem para a manutenção da pluripotência de embriões e CTE (NICHOLS et al., 1998; KIM et al., 2008; TAKAHASHI et al., 2015). A partir da identificação dos genes necessários para manutenção da pluripotência, começou-se a caracterizar a função dos mesmos (NICHOLS et al., 1998; NIWA et al., 2000; CHAMBERS et al., 2003; DEJOSEZ et al., 2008). Dentre os fatores identificados como necessários para manutenção da pluripotência, destacam-se fatores de transcrição, genes componentes de mecanismos epigenéticos e fatores de controle pós-transcricional (BOYER et al., 2005; SURANI et al., 2007; YEO; NG, 2013). A classe de genes predominante dentre os caracterizados para o controle da pluripotência é de fatores de transcrição (YEO; NG, 2013).

Estes genes atuam na regulação gênica, aumentando ou reduzindo a expressão dos genes alvos (BOYER et al., 2005; WANG et al., 2006). Diversos fatores de transcrição são necessários para estabelecer o fenótipo das células, atuando de forma isolada ou em conjunto para regulação dos genes alvos (BOYER et al., 2005; KIM et al., 2008; YEO; NG, 2013).

2.5.2 Genes relacionados à pluripotência

Os genes necessários para manutenção da pluripotência ou que apresentam funções centrais em células pluripotentes são denominados de genes relacionados à pluripotência (GRP)s (LI; BELMONTE, 2017). Inicialmente, os GRPs identificados apresentavam expressão restrita à células pluripotentes ou totipotentes, ou seja, linhagens germinativas, ovócitos, embriões e CTE (SCHÖLER et al., 1989; CHAMBERS et al., 2003; MITSUI et al., 2003). Com o aumento do número de GRPs caracterizados (SURANI et al., 2007; KIM et al, 2008; HENG et al., 2010), ficou evidente que poucos apresentam este perfil restrito de expressão.

Uma importante demonstração da importância dos GRPs para pluripotência foi obtida por meio da expressão destes genes em células somáticas de camundongos e humanos (TAKAHASHI; YAMANAKA, 2006, 2016). As células reprogramadas pelos GRPs são denominadas de células-tronco embrionárias induzidas (CTEI) **(**Figura 4). Estas células são semelhantes às CTE obtidas de embriões, pois são pluripotentes *in vitro* e *in vivo* (OKITA et al., 2007; WERNIG et al., 2007).

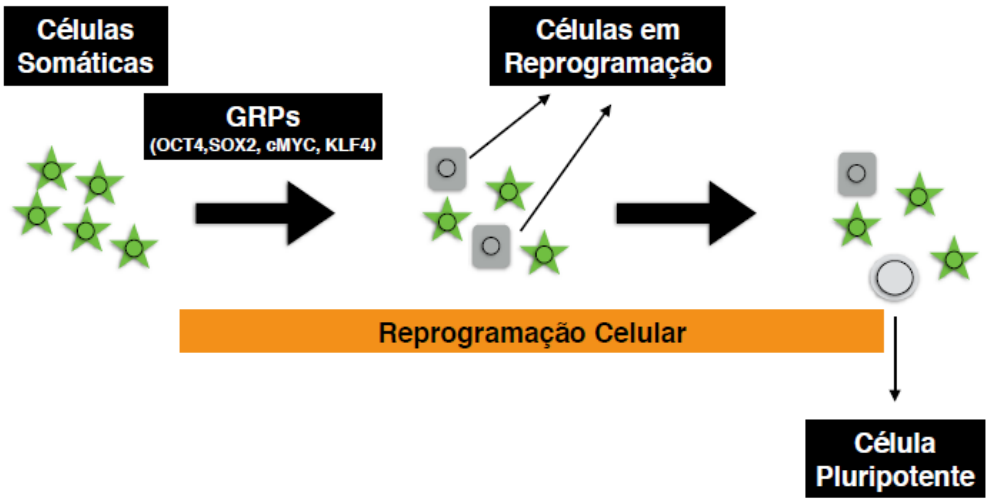


Figura 4. Produção de células-tronco embrionárias induzidas (CTEI).

O número de GRPs caracterizados continua crescendo em camundongos e humanos, sugerindo que ainda existem mais genes para serem caracterizados (SUBRAMANIAN et al., 2009; ZHENG; HU, 2014). Por isso, os mecanismos pelos quais GRPs controlam a pluripotência devem continuar crescendo e mais detalhado no futuro próximo. Este conhecimento deve contribuir para melhor entender os mecanismos de totipotência, pluripotência, desenvolvimento embrionário e auto-renovação de CTE (SMITH, 2001; HENG et al., 2010). Em ruminantes, as investigações sobre GRPs têm caracterizado a expressão em gametas, embriões e outros tecidos (Tabela 1).

2.5.2.1 C-MYC

CMYC faz parte de uma família de fatores de transcrição composta por CMYC, NMYC e LMYC (FAGNOCCHI; ZIPPO, 2017). Os genes CMYC apresentam diversas funções em células pluripotentes, como controle do ciclo celular, metabolismo, modulação de vias de sinalização, controle epigenético de genes alvos e outros fatores de transcrição que controlam diferenciação celular como genes homeóticos da classe HOX (FAGNOCCHI; ZIPPO, 2017). CMYC e NMYC apresentam expressão semelhantes durante o desenvolvimento embrionário de camundongos e pelo menos um deles é necessário para manutenção da pluripotência (SMITH et al., 2010).

A expressão de CMYC já foi analisada em diversos tecidos de bovinos e búfalos entre os ruminantes, conforme observado na Tabela 1. CMYC foi detectado apenas em ovócitos e blastocistos de bovinos (MILES et al., 2012; MADEJA et al., 2013). Em búfalos, CMYC foi detectado com níveis de expressão maiores em ovócitos e sua expressão diminui durante o desenvolvimento embrionário (SINGH et al., 2014).

2.5.2.2 Dosage-sensitive sex reversal, adrenal hypoplasia critical region, chromosome X, gene1 (DAX1)

O gene DAX1 é um membro órfão da superfamília dos receptores nucleares e foi renomeado como NR0B1 de acordo com a nomeclatura vigente para esta classe de gene (NIAKAN; McCABE, 2005). A caracterização dos camundongos sem DAX1 (NR0B1) demonstrou que o gene é dispensável para a formação dos ovócitos e embriões (YU et al., 1998). Em contrapartida, células germinativas de machos sem DAX1 não completam a

espermatogênese devido a progressiva degeneração do epitélio germinativo testicular (YU et al., 1998). DAX1 foi detectado em ovócitos e durante todo o desenvolvimento embrionário de camundongos (CLIPSHAM et al., 2004; STICKELS et al., 2015). DAX1 contribui no processo de reprogramação celular ao facilitar a reativação de outros GRPs (ZHANG et al., 2014; LUJAN et al., 2015), embora a necessidade da atividade de DAX1 para manutenção da pluripotência em CTE seja controversa (KHALFALLAH et al., 2009; ZHANG et al., 2014).

Tabela 1. Expressão dos genes relacionados à pluripotência em ruminantes.

GENE	MODO DE AÇÃO	LOCALIZAÇÃO E FUNÇÃO
CMYC	**Fator de transcrição**	**CTE[bu], células amnióticas[bu], embriões[b,bu]; células germinativas[b], CTM[b], CTAM[b], glândula mamária[b], linfócitos[b], músculo liso[b], epitelio pulmonar[b], glândula pituitária[b], linhagem celular imortalizada[b]; expressão aumentada pela via de sinalização wnt e pelo IGF-I[b]; Expressão varia durante o crescimento folicular[b]; Permite imortalizar fibroblastos[o]; Expressão aumenta em meio ácido[b]**
DAX1 (NR0B1)	**Fator de transcrição**	**Células adrenocorticais[b]**
GLIS1	**Fator de transcrição**	**Ovócitos[b] e embriões[b]; Atividade é necessária para o desenvolvimento embrionário[b];**
KLF5	**Fator de transcrição**	**Endométrio[b]**
OCT4 (POU5F1)	**Fator de transcrição**	**Células germinativas[b,bu], ovócitos[o]; embriões[c,o,b,bu], CMS[c], CTA[c], CTE[c,b,bu], CTFP[c], CTMO[c], CTEI[b,bu], CTM[c,b,bu,] CTN[c], CTAM[b], cordão umbilical[bu], células amnióticas[c,b,bu], útero[b] e placenta[bu]; Inibe o Interferon-Tau[o,b]; miRNA-145, via MAPK, BMP4, Rock e SIRT3 reduzem a expressão[b,bu]; Via wnt, BMP5, Oxanflatina, 3-hidroflavona, ácido lisofosfatídico, aumentam a expressão[b]; Composição e pH do meio afetam a expressão, marcador de viabilidade embrionária; Nível de expressão associada à competência ovocitária[b]; IIE e TN afetam expressão[b]**
RONIN	**Fator de transcrição**	**Cultivos de trofoblasto[b]; ovócitos[c]; células do cumulus[c,o]**
ZFP281	**Fator de transcrição**	**ovócitos[c]; embriões[o], células do cumulus[c,o]**
ZFX	**Fator de transcrição**	**Embriões[b, bu,o,c]; dois loci[bu]; Escapa a inativação do cromossomo X[b]; uso para sexagem por PCR[b,bu,o,c]**

CMS: célula muscular satélite. CTA: célula-tronco adiposa. CTAM: célula-tronco amniótica. CTE: Célula-tronco embrionária. CTEI: Célula-tronco embrionária induzida. CTFP: Célula-tronco do folículo piloso. CTM: Célula-tronco mesenquimal. CTMO: Célula-tronco da medula óssea. CTN: Célula-tronco neural. IIE: injeção intracitoplasmática de espermatozoides. IGF-I: Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1. MAPK: mitogen-activated protein kinase. BMP: Bone morphogenetic proteins. TN: transferência nuclear. WNT: Wingless-related integration site.

2.5.2.3 Glis family zinc finger 1 (GLIS1)

GLIS1 foi identificado numa prospecção de fatores de transcrição envolvidos na reprogramação celular (MAEKAWA et al., 2011). Sua expressão em camundongos é maior em ovócitos e zigotos, porém é baixa em CTE, fibroblastos e outras células somáticas (MAEKAWA; YAMANAKA, 2011). Acredita-se que GLIS1 não havia sido identificado como GRP anteriormente devido a pequena diferença de expressão entre células somáticas e pluripotentes (MAEKAWA; YAMANAKA, 2011). GLIS1 tem maior expressão em ovócitos, embriões bovinos até o estádio de quatro células e ainda detectado em embriões de oito células (TAKAHASHI et al., 2015). O silenciamento de GLIS1 bloqueia o desenvolvimento embrionário no estádio de quatro para oito células, possivelmente pela inibição parcial ou completa da ativação do genoma embrionário (TAKAHASHI et al., 2015).

2.5.2.4 Kruppel-Like Factor 5 (KLF5)

KLF5 faz parte da família Kruppel-Like de fatores de transcrição, composta por 17 membros, com atividade em diversos processos biológicos como proliferação celular, metabolismo, resposta ao estresse, entre outros (DIAKIW et al., 2013). KLF5 é necessário para manutenção da pluripotência, sendo expresso durante todo desenvolvimento embrionário de camundongos (EMA et al., 2008; PARISI; RUSSO, 2011). A influência de KLF5 sobre a pluripotência depende da regulação de outros GRPs e silenciamento de genes promotores de diferenciação celular (PARISI; RUSSO, 2011).

Os genes KLF2, KLF4 e KLF5 parecem ter funções redundantes em células pluripotentes (JIANG et al., 2008). Estes genes apresentam múltiplos genes alvos em comum em associação ao NANOG, enquanto que o silenciamento dos três genes é necessário para que CTE se diferenciem (JIANG et al., 2008).

2.5.2.5 Octamer-binding transcription factor 4 (OCT4)

OCT4 foi o primeiro fator de transcrição descrito em embriões (SCHÖLER et al., 1989, 1990; ROSNER et al., 1990) e o primeiro GRP caracterizado em mamíferos (NICHOLS et al., 1998; NIWA et al., 2000). OCT4 apresenta expressão restrita às células das linhagens germinativas, ovócitos, embriões e CTE. O silencimento de OCT4 causa a formação de

blastocistos com embrioblasto não pluripotente, ou seja, com potencial apenas para formação de células do trofoblasto (NICHOLS et al., 1998). Curiosamente, as células do trofoblasto necessitam das células pluripotentes do embrioblasto para proliferar e manter viabilidade (NICHOLS et al., 1998; LE BIN et al., 2014). Embora seja dispensável no período de clivagem, não há a formação do epiblasto e endoderma primitivo a partir do embrioblasto sem a atividade de OCT4 (LE BIN et al., 2014).

A investigação de OCT4 em nível genômico tem contribuído para explicar como o gene participa do controle da pluripotência (BOYER et al., 2005; LOH et al., 2006). OCT4 forma complexos proteicos com SOX2 e outros fatores de transcrição (RIZZINO, 2013), para regular centenas de genes alvos em células pluripotentes (BOYER et al., 2005; LOH et al., 2006). O complexo OCT4-SOX2 ativa outros GRPs, controla diversas vias de sinalização e silencia fatores de transcrição indutores de diferenciação celular (BOYER et al., 2005; RIZZINO, 2013).

2.5.2.6 RONIN

RONIN (THAP11) foi identificado como um fator de interação com CASPASE 3 em CTE de camundongos (DEJOSEZ et al., 2008; ZWAKA, 2008). Demonstrou-se anteriormente que a clivagem de NANOG pela CASPASE 3 era um mecanismo de indução das CTE para diferenciação celular (FUJITA et al., 2008). Ao investigar proteínas que interagem com NANOG em células pluripotentes, identificou-se RONIN. Curiosamente, os genes alvo de RONIN foram diferentes dos regulados por OCT4, SOX2 e NANOG (BOYER et al., 2005; DEJOSEZ et al., 2008; ZWAKA, 2008). Este fato sugeriu que RONIN contribui de forma diferente dos demais GRPs para manutenção da pluripotência. Uma avaliação posterior mostrou que RONIN participa do controle de processos como: início da transcrição, splicing alternativo e metabolismo celular (DEJOSEZ et al., 2010). Associado ao fator de transcrição HCF-1 contribui para rápida proliferação das CTE através do aumento da expressão de genes necessários para síntese proteica e produção de energia (DEJOSEZ et al., 2010). Em ruminantes, RONIN foi detectado em cultivos de células do trofoblasto, ovócitos e células do *cumulus* (HUANG et al., 2014; MOURA et al., 2014).

2.5.2.7 Zinc Finger Protein 281 (ZFP281)

ZFP281 foi identificado como um GRP por ter expressão diferencial entre células pluripotentes e células diferenciadas (WANG et al., 2006, 2008). Existem divergências quanto a necessidade de ZFP281 para manutenção da pluripotência, possivelmente devido a diferenças nos métodos de silenciamento do gene ou condições de cultivo das CTE (WANG et al., 2006, 2008; FIDALGO et al., 2011). ZFP281 forma complexos com NANOG (WANG et al., 2006), OCT4 e SOX2 (WANG et al., 2006, 2008) para o controle da pluripotência. Além disso, controla diversos genes alvos em conjunto com estes GRPs, embora sua função principal seja silenciar os alvos, inclusive outros GRPs (WANG et al., 2008; FIDALGO et al., 2011). Por ter essa função sobre GRPs, ZFP281 reduz a eficiência da reprogramação celular ao dificultar a ativação de NANOG (FIDALGO et al., 2012).

Em *Oryzias latipes*, ZFP281 apresentou expressão preferencial nas gônadas, mas também foi detectado no cérebro e coração (WANG et al., 2011). ZFP281 em pequenos ruminantes, foi detectado em fibroblastos, células do *cumulus*, gametas e embriões (MOURA et al., 2014), sugerindo perfil de expressão conservado entre as espécies.

2.5.2.8 Zinc Finger Protein, X-Linked (ZFX)

O gene ZFX foi um dos primeiros genes caracterizados no cromossomo X (YU et al., 1998). A expressão temporal desse gene foi descrita durante o desenvolvimento embrionário de camundongos, ovinos e bovinos (BERNARDI et al., 1996; PEIPPO et al., 2002). ZFX possui uma versão no cromossomo Y, denominado ZFY, com expressão constitutiva durante o período que antecede a implantação . Mais recentemente, foi demonstrado que ZFX é necessário para a manutenção da pluripotência de CTE de camundongos e humanos (GALAN-CARIDAD et al., 2007; HAREL et al., 2012). No entanto, embriões com ZFX inativo são capazes de atingir o estádio de blastocisto e implantar (LUOH et al., 1997; GALAN-CARIDAD et al., 2007).

2.6 Avaliação da expressão gênica em gametas e embriões

A avaliação da atividade de genes em gametas e embriões de mamíferos tem sido alvo de intensa investigação a décadas (PAMPFER et al., 1992; NIEMANN; WRENZYCKI, 2001). A partir desta abordagem, foi possível identificar genes com expressão restritas aos gametas e embriões (SCHÖLER et al., 1989, 1990), identificar efeitos das condições *in vitro* sobre o

metabolismo e viabilidade dos embriões (NATALE et al., 2001; NIEMANN; WRENZYCKI, 2001; BORTVIN et al., 2003), implicações de agentes tóxicos (HUUSKONEN, 2005) e genes necessários para o desenvolvimento embrionário (NICHOLS et al., 1998; ROSSANT, 2016), entre outros mecanismos.

Um importante avanço foi a adoção de técnicas quantitativas para avaliação da expressão gênica em gametas e embriões, principalmente a PCR em tempo real (RT-qPCR) (LECHNIAK, 2002; PFEFFEr et al., 2007). Este avanço permitiu determinar flutuações da atividade gênica durante o desenvolvimento embrionário (PFEFFER et al., 2007; HAMATANI et al., 2008). Diferentes aspectos das técnicas de RT-qPCR podem influenciar os resultados da expressão gênica relativa, como as condições de extração de RNA, escolha dos genes de referência e quantidades inicial de células (JEONG et al., 2005; PFEFFER et al., 2007). Por isso, a adoção de métodos que padronizam a RT-qPCR são importantes para garantir a avaliação gênica relativa sem artefatos técnicos (TAYLOR; MRKUSICH, 2014).

A avaliação da expressão gênica por RT-qPCR apresenta uma vantagem importante sobre abordagens bioquímicas e genéticas para investigar gametas e embriões, pois não necessita de grandes quantidades de material biológico (KRÜSSEL et al., 2000; HOCHEDLINGER; JAENISCH, 2006). Por isso, a avaliação da expressão gênica deve continuar como uma importante ferramenta para investigar os mecanismos de controle da gametogênese e desenvolvimento embrionário. Uma importante inovação foi o desenvolvimento das abordagens para RT-qPCR a partir de uma única célula, que vão permitir comparar a expressão gênica entre blastômeros, entre embrioblasto e trofoblasto, dentre outras possibilidades (BOIANI; CIBELLI, 2016).

3. REFERÊNCIAS

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

BARTON, L. J.; LEBLANC, M. G.; LEHMANN, R. Finding their way: themes in germ cell migration. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 42, p. 128-137, 2016.

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

BERNARDI, M. L.; COTINOT, C.; PAYEN, E.; DELOUIS, C. Transcription of Y- and X-Linked Genes in Preimplantation Ovine Embryos, **Molecular Reproduction and Development,** v. 45, p.132-138, 1996.

BEYHAN, Z.; FORSBERG, E. J.; EILERTSEN, K. J.; KENT-FIRST, M.; FIRST, N. L. Gene expression in bovine nuclear transfer embryos in relation to donor cell efficiency in producing live offspring. **Molecular Reproduction and Development**, v. 74, n. 1, p. 18-27, 2007.

BOIANI, M.; CIBELLI, J. B. What we can learn from single-cell analysis in development. **Molecular Human Reproduction**, v. 22, n. 3, p. 160-171, 2016.

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

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

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

BUFFONE, M. G.; HIROHASHI, N.; GERTON, G. L. Unresolved questions concerning mammalian sperm acrosomal exocytosis. **Biology of Reproduction**, v. 90, n. 5, p. 112, 2014.

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

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

CHEN, X.; YE, S.; YING, Q. L. Stem cell maintenance by manipulating signaling pathways: past, current and future. **BMB Reports** , v. 48, n. 12, p. 668-676, 2015.

CLIPSHAM, R.; NIAKAN, K.; MCCABE, E. R. NR0B1 and its network partners are expressed early in murine embryos prior to steroidogenic axis organogenesis. **Gene Expression Patterns**, v. 4, n. 1, p. 3-14, 2004.

COCKBURN, K.; ROSSANT, J. Making the blastocyst: lessons from the mouse. **Journal of Clinical Investigation**, v. 120, n. 4, p. 995-1003, 2010.

DAHL, J. A.; COLLAS, P. MicroChIP: chromatin immunoprecipitation for small cell numbers. **Methods in Molecular Biology**, v. 567, p. 59-74, 2009.

DIAKIW, S. M.; D'ANDREA, R. J.; BROWN, A. L. The double life of KLF5: Opposing roles in regulation of gene-expression, cellular function, and transformation. **IUBMB Life**, v. 65, n. 12, p. 999-1011, 2013.

DEJOSEZ, M.; KRUMENACKER, J. S.; ZITUR, L. J.; PASSERI, M.; CHU, L. F.; SONGYANG, Z.; THOMSON, J. A.; ZWAKA, T. P. Ronin is essential for embryogenesis and the pluripotency of mouse embryonic stem cells, **Cell**, v. 133, n. 7, p. 1162-1174, 2008.

DESOJEZ, M.; LEVINE, S. S.; FRAMPTON, G. M.; WHYTE, W. A.; STRATTON, S. A.; BARTON, M. C.; GUNARATNE, P. H.; YOUNG, R. A.; ZWAKA, T. P. RONIN/HCF-1 bind to a hyperconserved enhancer element and regulates genes involved in the growth of embryonic stem cells. **Genes and Development**, v. 24, n. 14, p. 1479-1484, 2010.

EGGAN, K.; RODE , A.; JENTSCH, I.; SAMUEL, C.; HENNEK, T.; TINTRUP, H.; ZEVNIK, B.; ERWIN, J.; LORING, J.; JACKSON-GRUSBY, L.; SPEICHER, M. R.; KUEHN, R.; JAENISCH, R. Male and female mice derived from the same embryonic stem cell clone by tetraploid embryo complementation. **Nature Biotechnology**, v. 20, n. 5, p. 455-459, 2002.

EMA, M.; MORI, D.; NIWA, H.; HASEGAWA, Y.; YAMANAKA, Y.; HITOSHI, S.; MIMURA, J.; KAWABE, Y.; HOSOYA, T.; MORITA, M.; SHIMOSATO, D.; UCHIDA, K.; SUZUKI, N.; YANAGISAWA, J.; SOGAWA, K.; ROSSANT, J.; YAMAMOTO, M.; TAKAHASHI, S.; FUJII-KURIYAMA, Y. Krüppel-like factor 5 is essential for blastocyst development and the normal self-renewal of mouse ESCs. **Cell Stem Cell**, v. 3, n. 5, p. 555-567, 2008.

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

FAGNOCCHI, L.; ZIPPO, A. Multiple Roles of MYC in Integrating Regulatory Networks of Pluripotent Stem Cells. **Frontiers in Cell and Developmental Biology** , v. 5, p. 7, 2017.

FIDALGO, M.; SHEKAR, P. C.; ANG, Y. S.; FUJIWARA, Y.; ORKIN, S. H.; WANG, J. ZFP281 functions as a transcriptional repressor for pluripotency of mouse embryonic stem cells. **Stem Cells**, v. 29, n. 11, p. 1705-1716, 2011.

FIDALGO, M.; FAIOLA, F.; PEREIRA, C. F.; DING, J.; SAUNDERS, A.; GINGOLD, J.; SCHANIEL, C.; LEMISCHKA, I. R.; SILVA, J. C.; WANG, J. ZFP281 mediates NANOG autorepression through recruitment of the NuRD complex and inhibits somatic cell reprogramming. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, n. 40, p. 16202-16207, 2012.

FRANKENBERG, S. R.; DE BARROS, F. R.; ROSSANT, J.; RENFREE, M. B. The mammalian blastocyst. Wiley Interdisciplinary Reviews. **Developmental Biology** , v. 5, n. 2, p. 210-232, 2016.

FUJITA, J.; CRANE, A. M.; SOUZA, M. K.; DEJOSEZ, M.; KYBA, M.; FLAVELL, R. A.; THOMSON, J. A.; ZWAKA, T. P. Caspase activity mediates the differentiation of embryonic stem cells. **Cell Stem Cell**, v. 2, n. 6, p. 595-560, 2008.

GALAN-CARIDAD, J. M.; HAREL, S.; ARENZANA, T. L.; HOU, Z. E.; DOESTSCH, F. K.; MIRNY, L. A.; REIZIS, B. ZFX controls the self-renewal of embryonic and hematopoietic stem cells, **Cell,** v.129, n. 2, p. 345-357, 2007.

GALLI, C.; DUCHI, R.; CROTTI, G.; TURINI, P.; PONDERATO, N.; COLLEONI, S.; LAGUTINA, I.; LAZZARI, G. Bovine embryo technologies. **Theriogenology**, v. 59, n. 2, p. 599-616, 2003.

GERVASI, M. G.; VISCONTI, P. E. Chang's meaning of capacitation: A molecular perspective. **Molecular Reproduction and Development**, v. 83, n. 10, p. 860-874, 2016.

GIL, M. A.; CUELLO, C.; PARRILLA, I.; VAZQUEZ, J. M.; ROCA, J.; MARTINEZ, E. A. Advances in swine in vitro embryo production technologies. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 45, suplemento 2, p. 40-48, 2010.

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

HALL, V. J.; RUDDOCK, N. T.; FRENCH, A. J. Expression profiling of genes crucial for placental and preimplantation development in bovine in vivo, in vitro, and nuclear transfer blastocysts. **Molecular Reproduction and Development**, v. 72, n. 1, p. 16-24, 2005.

HAMATANI, T.; YAMADA, M.; AKUTSU, H.; KUJI, N.; MOCHIMARU, Y.; TAKANO, M.; TOYODA, M.; MIYADO, K.; UMEZAWA, A.; YOSHIMURA, Y. What can we learn from gene expression profiling of mouse oocytes? **Reproduction**, v. 135, n. 5, p. 581-592, 2008.

HAREL, S.; TU, E. Y.; WEISBERG, S.; ESQUILIN, M.; CHAMBERS, S. M.; LIU, B.; CARSON, C. T.; STUDER, L.; REIZIS, B.; TOMISHIMA, M. J. ZFX controls the self-renewal of human embryonic stem cells. **PLoS One**, v. 7, n .8, artigo e42302, 2012.

HASLER, J. F. Forty years of embryo transfer in cattle: a review focusing on the journal Theriogenology, the growth of the industry in North America, and personal reminisces. **Theriogenology**, v. 81, n. 1, p. 152-169, 2014.

HENG, J. C.; ORLOV, Y. L.; NG, H. H. Transcription actors for the Modulation of Pluripotency and Reprogramming. **Cold Spring Harbor Symposium on Quantative Biology**, v. 75, p. 237-244, 2010.

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

HUANG, X.; HAN, X.; UYUNBILIG, B.; ZHANG, M.; DUO, S.; ZUO, Y.; ZHAO, Y.; YUN, T.; TAI, D.; WANG, C.; LI, J.; LI, X.; LI, R. Establishment of bovine trophoblast stem-like cells from in vitro-produced blastocyst-stage embryos using two inhibitors. Stem Cells and Development, v. 23, n. 13, p. 1501-1514, 2014.

HUANG, G.; YE, S.; ZHOU, X.; LIU, D.; YING, Q. L.Molecular basis of embryonic stem cell self-renewal: from signaling pathways to pluripotency network. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 72, n. 9, p. 1741-1757. 2015.

HUUSKONEN, H. New models and molecular markers in evaluation of developmental toxicity. **Toxicology and Applied Pharmacology** , v. 207, 2 Suppl, p. 495-500, 2005.

JEONG, Y. J.; CHOI, H. W.; SHIN, H. S.; CUI, X. S.; KIM, N. H.; GERTON, G. L.; JUN, J. H. Optimization of real time RT-PCR methods for the analysis of gene expression in mouse eggs and preimplantation embryos. **Molecular Reproduction and Development** , v. 71, n. 3, p. 284-289, 2005.

JIANG, J.; CHAN, Y. S.; LOH, Y. H.; CAI, J.; TONG, G. Q.; LIM, C. A.; ROBSON, P.; ZHONG, S.; NG, H. H. A core KLF circuitry regulates self-renewal of embryonic stem cells. **Nature Cell Biology,** v. 10, n. 3, p. 353-360, 2008.

JIN**,** S. K.; YANG, W. X. Factors and pathways involved in capacitation: how are they regulated? **Oncotarget**, v. 8, n. 2, p. 3600-3627, 2017.

KEEFER, C. L. Artificial cloning of domestic animals. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 112, n. 29, p. 8874-8878, 2015.

KHALFALLAH, O.; ROULEAU, M.; BARBRY, P.; BARDONI, B.; LALLI, E. DAX-1 knockdown in mouse embryonic stem cells induces loss of pluripotency and multilineage differentiation. **Stem Cells**, v. 27, n. 7, p. 1529-1537, 2009.

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

KIM, M. S.; SAKURAI, T.; BAI, H.; BAI, R.; SATO, D.; NAGAOKA, K.; CHANG, K. T.; GODKIN, J. D.; MIN, K. S.; IMAKAWA, K. Presence of Transcription Factor OCT4 limits Interferon-tau Expression during the Pre-attachment Period in Sheep. **Asian Australasian Journal of Animal Science,** v. 26, n. 5, p. 638-645, 2013.

KRÜSSEL, J. S.; HUANG, H. Y.; HIRCHENHAIN, J.; BIELFELD, P.; CUPISTI, S.; JEREMIAS, L.; POLAN, M. L. Is there a place for biochemical embryonic preimplantational screening? **Society of Reproduction and Fertility supplement**, v. 55, p. 147-159, 2000.

LE BIN, G. C.; MUÑOZ-DESCALZO, S.; KUROWSKI, A.; LEITCH, H.; LOU, X.; MANSFIELD, W.; ETIENNE-DUMEAU, C.; GRABOLE, N.; MULAS, C.; NIWA, H.; HADJANTONAKIS, A. K.; NICHOLS, J. OCT4 is required for lineage priming in the developing inner cell mass of the mouse blastocyst. **Development,** v. 141, n. 5, p. 1001-1010, 2014.

LECHNIAK, D. Quantitative aspect of gene expression analysis in mammalian oocytes and embryos. **Reproductive Biology**, v. 2, n. 3, p. 229-241, 2002.

LEEMANS, B.; GADELLA, B. M.; STOUT, T. A.; DE SCHAUWER, C.; NELIS, H.; HOOGEWIJS, M.; VAN SOOM, A. Why doesn't conventional IVF work in the horse? The equine oviduct as a microenvironment for capacitation/fertilization. **Reproduction**, v. 152, n. 6, p. R233-R245, 2016.

LI, M.; BELMONTE, J. C. Ground rules of the pluripotency gene regulatory network. **Nature Reviews Genetics** , v. 18, n. 3, p. 180-191, 2017.

LOH, Y. H.; WU, Q.; CHEW, J. L.; VEGA, V. B.; ZHANG, W.; CHEN, X.; BOURQUE, G.; GEORGE, J.; LEONG, B.; LIU, J.; WONG, K. Y.; SUNG, K. W.; LEE, C. W.; ZHAO, X. D.; CHIU, K. P.; LIPOVICH, L.; KUZNETSOV, V. A.; ROBSON, P.; STANTON, L. W.; WEI, C. L.; RUAN, Y.; LIM, B.; NG, H. H. The OCT4 and NANOG transcription network regulates pluripotency in mouse embryonic stem cells. **Nature Genetics,** v. 38, n. 4, p. 431-440, 2006.

LUJAN, E.; ZUNDER, E. R.; NG, Y. H.; GORONZY, I. N.; NOLAN, G. P.; WERNIG, M. Early reprogramming regulators identified by prospective isolation and mass cytometry. **Nature**, v. 521, n. 7552, p. 352-356, 2015.

LUOH, S.W.; BAIN, P. A.; POLAKIEWICZ, R. D.; GOODHEART, M. L.; GARDNER, H.; JAENISCH, R, Page DC. ZFX mutation results in small animal size and reduced germ cell number in male and female mice. **Development**, v. 124, n. 11, p. 2275-2284, 1997.

MADEJA, Z. E.; SOSNOWSKI, J.; HRYNIEWICZ, K.; WARZYCH, E.; PAWLAK, P.; ROZWADOWSKA, N.; PLUSA, B.; LECHNIAK, D. Changes in sub-cellular localisation of trophoblast and inner cell mass specific transcription factors during bovine preimplantation development. **BMC Developmental Biology**, v. 13, p. 32, 2013.

MAEKAWA, M.; YAMAGUCHI, K.; NAKAMURA, T.; SHIBUKAWA, R.; KODANAKA, I. ICHISAKA, T.; KAWAMURA, Y.; MOCHIZUKI, H.; GOSHIMA, N.; YAMANAKA, S. Direct reprogramming of somatic cells is promoted by maternal transcription factor GLIS1. **Nature**, v. 474, n. 7350, p. 225-229, 2011.

MAEKAWA, M.; YAMANAKA, S. GLIS1, a unique pro-reprogramming factor, may facilitate clinical applications of iPSC technology. **Cell Cycle**, v. 10, n. 21, p. 3613-3614, 2011.

MATSUI, Y. The molecular mechanisms regulating germ cell development and potential. **Journal of Andrology**, v. 31, n.1, p. 61-65, 2010.

MCLAREN, A.Germ and somatic cell lineages in the developing gonad. **Molecular and Cellular Endocrinology** , v. 163, n. 1-2, p. 3-9, 2000.

MEMILI, E.; FIRST, N. L. Zygotic and embryonic gene expression in cow: a review of timing and mechanisms of early gene expression as compared with other species. **Zygote**, v. 8, n. 1, p. 87-96, 2000.

MILES, J. R.; MCDANELD, T. G.; WIEDMANN, R. T.; CUSHMAN, R. A.; ECHTERNKAMP, S. E.; VALLET, J. L.; SMITH, T. P. MicroRNA expression profile in bovine cumulus-oocyte complexes: possible role of let-7 and miR-106a in the development of bovine oocytes. **Animal Reproduction Science**, v. 130, n. 1-2, p. 16-26, 2012.

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

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

MOURA, M. T. Pluripotency and cellular reprogramming. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica**, v. 8, p. 138-168, 2012.

MOURA, M. T.; SILVA, P. G. C.; SILVA, J. C. F.; RAMOS-DEUS, P.; CANTANHÊDE, L. F.; OLIVEIRA, M. A. L. Expression of pluripotency genes during caprine embryonic development. **Relatório do programa pós- doutorado do CNPq**, 2014.

NAGY, A.; GÓCZA, E.; DIAZ, E. M.; PRIDEAUX, V. R.; IVÁNYI, E.; MARKKULA, M.; ROSSANT, J. Embryonic stem cells alone are able to support fetal development in the mouse. **Development**, v. 110, n. 3, p. 815-821, 1990.

NATALE, D. R.; DE SOUSA, P. A.; WESTHUSIN, M. E.; WATSON, A. J. Sensitivity of bovine blastocyst gene expression patterns to culture environments assessed by differential display RT-PCR. **Reproduction**, v. 122, n. 5, p. 687-693, 2001.

NIAKAN, K. K.; McCABE, R. B. DAX1 origin, function, and novel role. **Molecular Genetics and Metabolism**, v. 86, p. 70-83, 2005.

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

NIEMANN, H.; WRENZYCKI, C. Alterations of expression of developmentally important genes in preimplantation bovine embryos by in vitro culture conditions: implications for subsequent development. **Theriogenology**, v. 53, n. 1, p. 21-34, 2000.

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

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

PAMPFER, S.; FAN, W.; SCHUBART, U. K.; POLLARD, J. W. Differential mRNA expression of the phosphoprotein p19/SCG10 gene family in mouse preimplantation embryos, uterus, and placenta. **Reproduction Fertility and Development**, v. 4, n. 2, p. 205-211, 1992.

PARAMIO, M. T.; IZQUIERDO, D. Recent advances in in vitro embryo production in small ruminants. **Theriogenology**, v. 86, n.1, p. 152-159, 2016.

PARISI, S.; RUSSO, T. Regulatory role of KLF5 in early mouse development and in embryonic stem cells. **Vitamins and Hormones**, v. 87, p. 381-397, 2011.

PARRISH, J. J. Bovine in vitro fertilization: in vitro oocyte maturation and sperm capacitation with heparin. **Theriogenology**, v. 81, n. 1, p. 67-73, 2014.

PEIPPO, J.; FARAZMAND, A.; KURKILAHTI, M.; MARKKULA, M.; BASRUR, P. K.; KING, W. A. Sex-chromosome linked gene expression in in-vitro produced bovino embryos. **Molecular Human Reproduction**, v. 8, n. 1o, p. 923-929, 2002.

PFEFFER, P. L.; SISCO, B.; DONNISON, M.; SOMERS, J.; SMITH, C. Isolation of genes associated with developmental competency of bovine oocytes. **Theriogenology**, v. 68, suplemento 1: S84-90, 2007.

PICARD, L.; CHARTRAIN, I.; KING, W. A.; BETTERIDGE, K. J. Production of chimaeric bovine embryos and calves by aggregation of inner cell masses with morulae. **Molecular Reproduction and Development,** v. 27, n. 4, p. 295-304, 1990.

RIZZINO, A. Concise review: The Sox2-Oct4 connection: critical players in a much larger interdependent network integrated at multiple levels. **Stem Cells**, v. 31, n. 6, p. 1033-1039, 2013.

ROMAR, R.; FUNAHASHI, H.; COY, P. In vitro fertilization in pigs: New molecules and protocols to consider in the forthcoming years. **Theriogenology**, v. 85, n. 1, p. 125-134, 2016.

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**, v. 345, n. 6277, p. 686- 692, 1990.

ROSSANT, J. Stem cells and lineage development in the mammalian blastocyst. **Reproduction, fertility, and development**, v. 19, n. 1, p. 111-118, 2007.

ROSSANT, J. Developmental biology: A mouse is not a cow. **Nature**, v.471, 457-458, 2011.

ROSSANT, J. Making the Mouse Blastocyst: Past, Present, and Future. **Current Topics in Developmental Biology**, v. 117, p. 275-288, 2016.

SASAKI, H.; MATSUI, Y. Epigenetic events in mammalian germ-cell development: reprogramming and beyond. **Nature Reviews Genetics** , v. 9, n. 2, p. 129-140, 2008.

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,** v. 8, n. 9, 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**, v. 344, n. 6265, p. 435-439, 1990.

SILVA, P. G. C.; MOURA, M. T.; SILVA, J. C. F.; RAMOS-DEUS, P.; CANTANHÊDE, L. F.; OLIVEIRA, M. A. L. **Relatório de Iniciação cientifica - PIBIC. UFRPE**, 2016.

SINGH, K. P.; KAUSHIK, R.; MOHAPATRA, S. K.; GARG, V.; RAMESHBABU, K.; SINGH, M. K.; PALTA, P.; MANIK, R. S.; SINGLA, S. K.; CHAUHAN, M. S. Quantitative expression of pluripotency-related genes in parthenogenetically produced buffalo (Bubalus bubalis) embryos and in putative embryonic stem cells derived from them. **Gene Expression Patterns, v.** 16, n. 1, p. 23-30, 2014.

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

SMITH, K. N.; SINGH, A. M.; DALTON, S. CMYC represses primitive endoderm differentiation in pluripotent stem cells.**Cell Stem Cell**, v. 7, n. 3, p. 343-354, 2010.

STICKELS, R.; CLARK, K.; HEIDER, T. N.; MATTISKE, D. M.; RENFREE, M. B.; PASK, A. J. DAX1/NR0B1 was expressed during mammalian gonadal development and gametogenesis before it was recruited to the eutherian X chromosome. **Biology of Reproduction,** v. 92, n. 1, p. 22, 2015.

SUBRAMANIAN, V.; KLATTENHOFF, C. A.; BOYER, L. A. Screening for novel regulators of embryonic stem cell identity. **Cell Stem Cell**, v. 4, n.5, p. 377-378, 2009.

SURANI, M. A.; HAYASHI, K.; HAJKOVA, P. Genetic and epigenetic regulators of pluripotency. **Cell**, v. 128, n. 4, p. 747-762, 2007.

SURESH, K. P.; NANDI, S.; MONDAL, S. Factors affecting laboratory production of buffalo embryos: a meta-analysis. **Theriogenology**, v. 72, n. 7, p. 978-985, 2009.

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

TAKAHASHI, K.; YAMANAKA, S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors.**Cell**, v. 126, n. 4, p. 663-676, 2006.

TAKAHASHI, K.; SAKURAI, N.; EMURA, N.; HASHIZUME, T.; SAWAI, K. Effects of downregulating GLIS1 transcript on preimplantation development and gene expression of bovine embryos. **Journal Reproduction and Development,** v. 61, n. 5, p. 369-374, 2015.

TAKAHASHI, K.; YAMANAKA, S. A decade of transcription factor-mediated reprogramming to pluripotency. **Nature Reviews Molecular Cell Biology, v.** 17, n. 3, p. 183-193, 2016.

TAYLOR, S. C.; MRKUSICH, E. M. The state of RT-quantitative PCR: firsthand observations of implementation of minimum information for the publication of quantitative real-time PCR experiments (MIQE). **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**, v. 24, n. 1, p. 46-52, 2014.

URREGO, R.; HERRERA-PUERTA, E.; CHAVARRIA, N. A.; CAMARGO, O.; WRENZYCKI, C.; RODRIGUEZ-OSORIO, N. Follicular progesterone concentrations and messenger RNA expression of MATER and OCT-4 in immature bovine oocytes as predictors of developmental competence. **Theriogenology,** v. 83, n. 7, p. 1179-1187, 2015.

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

WANG, Z. X.; THE, C. H.; CHAN, C. M.; CHU, C.; ROSSBACH, M.; KUNARSO, G.; ALLAPITCHAY, T. B.; WONG, K. Y.; STANTON, L. W. The transcription factor ZFP281 controls embryonic stem cell pluripotency by direct activation and repression of target genes. **Stem Cells**, v. 26, n. 11, p. 2791-2799, 2008.

WANG, D.; MANALI, D.; WANG, T.; BHAT, N.; HONG, N.; LI, Z.; WANG, L.; YAN, Y.; LIU, R.; HONG, Y. Identification of pluripotency genes in the fish medaka. **International Journal of Biology and Biological Sciences**, v. 7, n. 4, p. 440-451, 2011**.**

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

WILLADSEN, S. M. The development capacity of blastomeres from 4- and 8-cell sheep embryos.. **Journal of embryology and experimental morphology**,1981.

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

WILMUT, I.; SCHNIEKE, A. E.; MCWHIR, J.; KIND, A. J.; CAMPBELL, K. H. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. **Nature**, v. 385, n. 6619, p. 810-813, 1997.

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

YANAGIMACHI, R. Male gamete contributions to the embryo. **Ann N Y National Academy of Sciences**, v. 1061, p. 203-207, 2005.

YEO, J. C.; NG, H. H. The transcriptional regulation of pluripotency. **Cell Research**., v. 23, n. 1, p. 20-32, 2013.

YU, R. N.; ITO, M.; SAUNDERS, T. L.; CAMPER, S. A.; JAMESON, J. L. Role of Ahch in gonadal development and gametogenesis. **Nature Genetics**, v. 20, n. 4, p. 353-357, 1998.

ZHANG, J.; LIU, G.; RUAN, Y.; WANG, J.; ZHAO, K.; WAN, Y.; LIU, B.; ZHENG, H.; PENG, T.; WU, W.; HE, P.; HU, F. Q.; JIAN, R. DAX1 and NANOG act in parallel to stabilize mouse embryonic stem cells and induced **pluripotency.Nature Communications**, v. 5, p. 5042, 2014.

ZHENG, X.; HU, G. Use of genome-wide RNAi screens to identify regulators of embryonic stem cell pluripotency and self-renewal. **Methods in Molecular Biology, v.** 1150, p. 163-173, 2014.

ZWAKA, T. P. Ronin and caspases in embryonic stem cells: a new perspective on regulation of the pluripotent state. **Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology**, v.73, p.163-169, 2008.

4. ARTIGO CIENTÍFICO

(Formatado conforme as normas da Revista **Reproduction, Fertility and Development**)

EXPRESSÃO TEMPORAL DE GENES RELACIONADOS À PLURIPOTÊNCIA EM EMBRIÕES DE OVINOS E BOVINOS

P. G. C. Silva[A]; M. T. Moura[A]; R. L. O. Silva[B]; P. S. Nascimento[A]; J. B. Silva[B]; J. C. Ferreira-Silva[A]; L. F. Cantanhêde[A]; M. S. Chaves[A]; A. M. Benko-Iseppon[B]; M. A. L. Oliveira[A,C]

[A]Laboratório de Biotécnicas Aplicadas à Reprodução, Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Brasil;
[B]Laboratório de Genética e Biotecnologia Vegetal, Departamento de Genética, Universidade Federal de Pernambuco, Brasil;
[C]Autor correspondente: M.A.L. Oliveira. Email: maloufrpe@uol.com.br

Resumo. A embriogênese da fecundação ao blastocisto é um período dinâmico durante o desenvolvimento dos mamíferos. Apesar da semelhança morfológica dos embriões destas espécies, algumas diferenças têm sido encontradas em nível molecular. O objetivo foi identificar a expressão temporal de oito genes relacionados à pluripotência (GRP) em embriões bovinos e ovinos produzidos *in vitro*. Ovócitos, embriões clivados, mórulas e blastocistos foram avaliados por PCR em tempo real (RT-qPCR). Cinco genes foram detectados em todos os estádios nas duas espécies (OCT4, RONIN, ZFP281, ZFX e KLF5). CMYC foi detectado em todas as amostras de bovinos, embora em ovinos seja expresso a partir da fase de clivagem. Em contrapartida, DAX1 foi detectado em todas as amostras de ovinos, embora não seja em mórula de bovinos. GLIS1 apresentou a maior variação entre as espécies, sendo detectado em ovócitos de bovinos e em embriões clivados e blastocistos de ovinos. Análises *in silico* de nível de proteína sugerem que a função dos GRPs é conservada em ruminantes. Em conclusão, a expressão temporal dos GRPs difere entre bovinos e ovinos, sugerindo possíveis diferenças na utilização destes genes como marcadores moleculares de embriões nestas espécies.

Palavras-chave adicionais: bioinformática, *Bos taurus indicus*, *Ovis aries*, embriogênese, desenvolvimento pré-implantação, pluripotente, ruminantes.

Abstract. Early embryogenesis from fertilization through blastocyst stage is a dynamic phase during mammalian development. Despite the morphological similarity in embryos from these species, some differences have been found at the molecular level. The work was aimed to describe the temporal expression of eight pluripotency-associated genes (PAG), in sheep and cattle in vitro produced embryos. Oocytes, cleaved embryos, morulas and blastocysts were evaluated by real time PCR (RT-qPCR). Five genes were detected in all developmental stages in both species (OCT4, RONIN, ZFP281, ZFX and KLF5). CMYC was detected in all bovine samples but was expressed in sheep from cleavage stage onwards. In contrast, DAX1 was detected in all sheep samples, but was not expressed in bovine morula stage embryos. GLIS1 displayed the greatest variation among species, detected in bovine oocytes and sheep cleaved embryos and blastocysts. In silico analysis at the protein level suggests that PAG function may be conserved in ruminants. In conclusion, temporal expression of pluripotency- associated genes differs between sheep and cattle, suggesting possible differences in their usage as molecular markers in these species.

Additional Keywords: embryogenesis, pluripotent, preimplantation development, ruminant.

Introdução

O desenvolvimento embrionário de ruminantes se inicia após processo de fecundação e singamia dos genomas dos gametas. O período inicial de desenvolvimento apresenta divisões celulares simétricas, com redução progressiva do volume celular (Rossant 2007). Os blastômeros neste período são totipotentes, ou seja, possuem a capacidade de dar origem aos diversos tecidos que formam o feto e a placenta (Willadsen 1981; Rossant, 2007; Cockburn e

Rossant 2010). Após a fase de compactação, o embrião passa pelo primeiro processo de diferenciação celular, que resulta na formação do embrioblasto e trofoblasto (Rossant 2007, 2016). O embrioblasto é pluripotente, portanto possui a capacidade de dar origem a todos os tecidos que formam o feto, enquanto que o trofoblasto forma os tipos celulares da placenta (Cockburn e Rossant 2010; Moura 2012).

O controle em nível molecular da totipotência e da pluripotência tem sido intensamente investigados (Moura 2012; Yeo e Ng 2013**;** Dang-Nguyen e Torres-Padilla 2015; Wu *et al.* 2016). Estes estádios celulares são controlados em diferentes níveis moleculares (epigenéticos, transcricional e pós-transcricional), embora o controle transcricional apresente uma importante função pois a maioria dos GRPs seja formada por fatores de transcrição (Moura 2012; Rossant 2016; Wu *et al*. 2016). Diversos genes foram identificados como necessários para a pluripotência e viabilidade do embrioblasto. (Nichols *et al*. 1998; Yeo e Ng 2013; Goissis e Cibelli 2014).

Apesar da intensa investigação dos GRPs em humanos e camundongos (Dang-Nguyen e Torres-Padilla 2015), pode-se afirmar que pouco se conhece sobre essa classe de genes em outras espécies (Berg *et al*. 2011; Goissis e Cibelli, 2014; Takahashi *et al*. 2015). Alguns trabalhos determinaram à expressão espaço-temporal de GRPs em caprinos, bovinos e búfalos (He *et al*. 2006; Sanna *et al*. 2010; Rodríguez-Alvarez *et al*. 2010; Anand *et al*. 2011). Poucos relatos investigaram a expressão de GRPs em gametas e embriões ovinos, enquanto outros relatos identificaram a expressão apenas no estádio de blastocisto (Sanna *et al*. 2010; Kim *et al*. 2013; Wang *et al*. 2013). Entretanto, pouco se conhece sobre as funções dos GRPs em ruminantes (Berg *et al*. 2011; Takahashi *et al*. 2015). O objetivo foi avaliar a expressão temporal de oito GRPs em ovócitos e embriões produzidos *in vitro* de ovinos e bovinos.

Material e Métodos

Produção in vitro de embriões de ovinos

O projeto foi desenvolvido (Fig.5) com a aprovação do Comitê de Ética da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), sob a licença de número 035/2016 (Processo 23082.002437/2016). Os ovários foram coletados no matadouro público no município de Paulista (PE). Imediatamente após o abate dos animais, os ovários foram transportados para o laboratório em solução fisiológica aquecida a 35 ºC. Os complexos *cumulus*-ovócitos (CCOs) foram aspirados de folículos ovarianos medindo de 2 a 6 mm em meio de lavagem (H-MIV), composto por TCM-199, contendo sais de Hank's suplementado com 2 mM de L-Glutamina, 10 % de soro fetal bovino (SFB), 25 UI mL^{-1} de Hemofol e 1μg mL^{-1} sulfato de gentamicina. Os CCOs, que apresentavam três ou mais camadas de células do *cumulus* e citoplasma homogêneo, foram utilizados para maturação *in vitro* (MIV), conforme descrito por Bezerra *et al*. (2014).

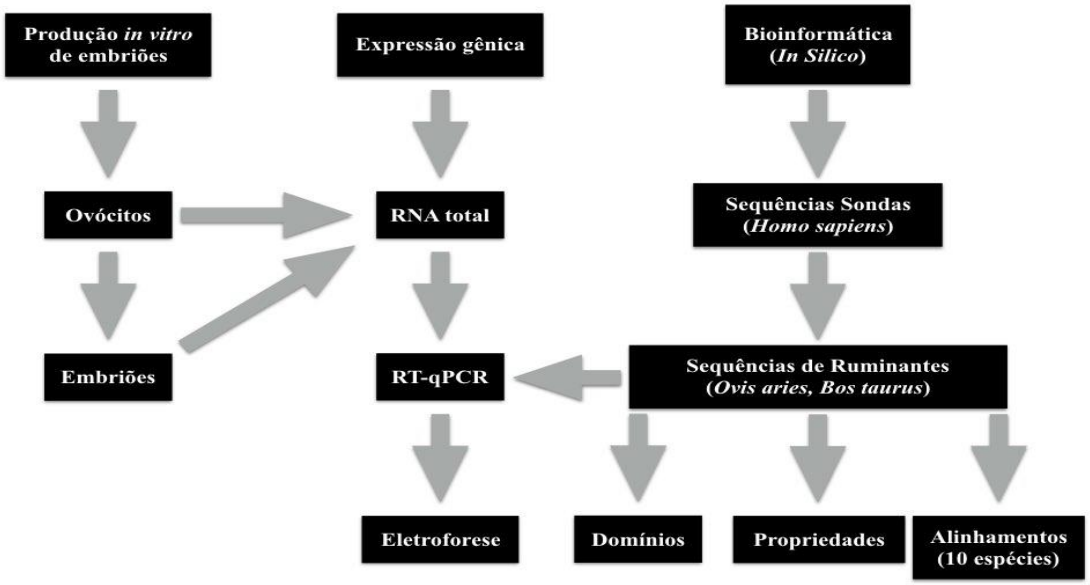


Fig.5: Fluxograma das atividades para avaliação da expressão temporal de genes relacionados à pluripotência em embriões de ovinos e bovinos.

O meio de maturação foi composto pelo TCM-199 com sais de Earle's suplementado com 50 μg mL^{-1} de piruvato de sódio, 2,6 mg mL^{-1} de bicarbonato de sódio, 5,0 μg mL^{-1} de hormônio folículo estimulante (FSH), 5,0 μg mL^{-1} de hormônio luteinizante (LH), 2mM de L-Glutamina, 10% de SFB e 0,5 μL mL^{-1} sulfato de gentamicina. Os ovócitos foram incubados em grupos de 15-30 em gotas de 100-150 μL cobertas com óleo mineral a 38,5 ºC em atmosfera úmida contendo 5 % de CO_2 durante 24 horas.

Efetuou-se a fecundação *in vitro* (FIV) com sêmen congelado (Chiamenti *et al*. 2013). Cuidadosamente, uma palheta de sêmen (0,25 mL) foi depositada em microtubos cônicos, contendo 0,5 mL do gradiente de Percoll (45 % / 90 %). Em seguida, centrifugou-se a 1000 g, por sete minutos (Morris *et al*. 2003). O pellet foi resuspendido em meio FIV, composto pelo meio fluido sintético do oviduto (SOF), contendo 10 % de soro de ovelha em estro (SOE) e centrifugado a 700 g por sete minutos. O sobrenadante foi removido e a concentração de espermatozoides determinada para a FIV. Os ovócitos após a MIV foram lavados em meio FIV e transferidos (25 ovócitos) para as gotas de 100 μL de meio FIV sob óleo de parafina esterilizada, local onde foi depositada a suspensão espermática na concentração final de 1,0 - 2,0 X 10^6 espermatozóides mL^{-1}. Os gametas foram co-incubados em condições atmosféricas idênticas àquelas da MIV durante o período de 18-20 horas.

Procedeu-se a ativação partenogenética conforme descrito por Moura *et al*. (2008). Os ovócitos foram desnudados com tratamento inicial a 0,2 % de hialuronidase por cinco minutos. Em seguida, os ovócitos foram transferidos para nova gota de hialuronidase e submetidos à pipetagem por cinco minutos. Os ovócitos desnudos foram lavados em meio, composto por SOF com aminoácidos (SOFaa) e suplementado com 5 % de SFB. A ativação partenogenética foi iniciada com 5 μM de ionomicina por cinco minutos, seguida de lavagens em meio SOFaa e cultivo em solução a 2 mM de 6-DMAP por três horas (Bebbere *et al*. 2010). Finalmente, os ovócitos foram lavados cinco vezes em meio SOFaa.

Os presumíveis zigotos foram cultivados em meio SOFaa suplementado com 5 % de SFB (Moura *et al*. 2008), além da monocamada de células do *cumulus*. A avaliação do desenvolvimento embrionário foi realizado no 3º dia (D3) para clivagem, no 5º dia (D5) para mórulas e sétimo dia (D7) para blastocistos. Os percentuais de desenvolvimento embrionário foram calculados à partir do número de ovócitos maturados.

Produção in vitro de embriões de bovinos

Os ovários foram coletados no matadouro público do município de São Lourenço da Mata (PE). Imediatamente após o abate dos animais, os ovários foram transportados em solução fisiológica a 0,9 % de NaCl e 1 μL mL^{-1} de solução 100 x de penicilina e estreptomicina (Invitrogen) a temperatura de 35 ˚C para o Laboratório em período inferior a três horas.

Os complexos *cumulus*-ovócitos (CCOs) foram aspirados de folículos ovarianos medindo de 2 a 8 mm em meio H-MIV, composto por TCM-199 contendo sais de Hank's suplementado com 10 % de soro fetal bovino (SFB), 2 mM de L-Glutamina e 1 μL mg^{-1} sulfato de gentamicina.

Os CCOs de qualidade grau I (citoplasma homogêneo e mais de três camadas de células do *cumulus*) e grau II (citoplasma levemente heterogêneo e/ou menos de três camadas de células do *cumulus*) foram lavados e destinados à maturação *in vitro*, conforme Moura *et al.* (2008).

Os CCOs foram maturados em meio TCM-199 com sais de Earle's, 5 μg mL^{-1} de FSH, 2 mM de L-glutamina, 10 % de SFB e 1 μg mL^{-1} de sulfato de gentamicina. Grupos de 25 a 30 CCOs foram colocados em gotas de 150 μL de meio MIV sob óleo mineral, em placa de Petri de 35 mm e incubados em estufa, com atmosfera saturada de umidade, 5 % de CO_2 à 38,5 ºC, durante 24 horas.

Os CCOs maturados passaram por um desnudamento parcial mecânico antes da FIV por meio de sucessivas pipetagens. Os CCOs foram lavados em meio TALP e posteriormente em meio FERT-TALP. Em seguida, estas estruturas foram colocados em placa de Petri com gotas

contendo 100 - 150 µL (15 - 25 ovócitos por gota) em meio FERT-TALP, contendo 10 µg mL^{-1} de heparina e cobertas com óleo mineral.

A FIV foi realizada com sêmen congelado. Cuidadosamente, uma palheta de sêmen foi depositada em tubos cônicos de centrífuga, contendo 0,5 mL do gradiente de Percoll (45 % / 90 %), e centrifugado a 700 g por sete minutos (Nascimento *et al*. 2016). O pellet foi resuspendido em meio FIV, composto pelo meio FERT-TALP, contendo 10 µg mL^{-1} de heparina e centrifugado a 700 g, por sete minutos. O sobrenadante foi removido e a concentração de espermatozoides foi determinada para a FIV. A dose inseminante foi de 1,0 x 10^6 espermatozoides por mL^{-1}. Finalmente, os gametas foram incubados por 18 - 20 horas nas mesmas condições já descritas para a maturação.

Os presumíveis zigotos foram lavados em meio SOFaa e transferidos para placas de Petri de 60 mm, com gotas de 150 µL, do mesmo meio, cobertas com óleo mineral, e mantidas em estufa, com atmosfera saturada de umidade; 5 % de CO_2 à 38,5 ºC, durante sete dias. A avaliação do desenvolvimento embrionário foi realizado no 3º dia (D3) para clivagem, no 5º dia (D5) para mórulas e 7º dia (D7) para blastocistos. Os percentuais de desenvolvimento embrionário foram calculados a partir do número de ovócitos maturados.

Extração de RNA total

A extração do RNA total foi obtida com RNAeasy Micro Plus (Qiagen), de acordo com as recomendações do fabricante. Os pools para extração foram por 50 - 100 ovócitos, 10 - 20 embriões clivados, 10 - 15 mórulas e 10 - 15 blastocistos e foram armazenados em PBS sem cálcio e magnésio a -80 ºC. As amostras foram descongeladas e centrifugadas a 14.000 g por um minuto. Adicionou-se 75 µL do tampão RLT e a amostra foi submetido ao vórtex, por 30 segundos. Em seguida, foi adicionado à 75 µL de etanol 70 % e misturado por pipetagem. O material foi transferido para a mini coluna do Kit e centrifugado a 14.000 g por um minuto. Foi

adicionado 350 µL da solução RW1 e centrifugado à rotação de 14.000 g, por um minuto. Em seguida, as amostras foram tratadas com solução de DNAse I, por 15 minutos, em temperatura ambiente. Foram adicionados 350 µL da solução RW1 e centrifugado à 14.000 g, por um minuto. Foi realizada mais uma lavagem com 500 µL da solução RPE e novamente centrifugado à 14.000 g, por um minuto. A última lavagem utilizou 500 µL de etanol à 80 % com centrifugação a 14.000 g, por dois minutos. Em seguida, foi realizada uma centrifugação com os tubos da coluna aberto a 17.000 g por cinco minutos para eliminação completa de etanol. A eluição do RNA total foi realizada com 14 µL de H_2O RNAse - free e centrifugação a 17.000 g por um minuto. O RNA total foi usado imediatamente para síntese de cDNA.

Síntese de cDNA

A síntese do cDNA foi realizada com o *QuantiTect® Reverse Transcription Kit* (Qiagen), de acordo com as recomendações do fabricante. Possíveis resquícios de DNA foram removidos das amostras pela reação de eliminação de DNA genômico, contendo 2 µL de *reaction buffer*, 12 µL de RNA total e 14 µL de volume final a 42 ºC por dois minutos. A síntese de cDNA foi composta por 14 µL da reação de eliminação de DNA genômico, 4 µL de 5x Quantiscript RT buffer, 1 µL de RT primer Mix e 1 µL de Quantiscript reverse transcriptase e volume final de 20 µL a 42 ºC por 30 minutos. A transcriptase reversa foi inativada pela incubação da reação a 95 ºC, por 3 minutos. O cDNA foi armazenado a - 20 ºC.

PCR em Tempo Real (RT-qPCR)

Os primers foram desenhados utilizando-se os programas Primer-BLAST (Ye *et al*. 2012) e selecionados pelo Primer3 (Rozen e Skaletsky, 2000). Os primers foram desenhados para amplificar produtos com 70 - 200 pares de base (pb), 40% a 60 % de conteudo GC, tamanho de 19 a 23 bases, evitando a formação de dímeros de primers e anelando junções éxon- éxon

(Tabela 2). As reações de PCR em Tempo Real (RT-qPCR) foram realizadas no equipamento LineGene 9660 modelo FQD-96A (Bioer®), usando detecção por SYBR Green. A reação foi composta por 1 µL da amostra de cDNA, 5 µL qPCR Master Mix 2x (Promega®), 3,4 µL H_2O ultrapura e 0,6 µL de primers (0,25 µM) em volume final de 10 µL. O cDNA de ovócitos e embriões foram utilizados como amostras concentradas. As reações foram realizadas com as condições a seguir: desnaturação inicial de 95 ºC por 2 minutos, seguida por 40 ciclos de 95 ºC por 15 segundos, 60 - 62 ºC por 30 segundos. A temperatura de anelamento e extensão de 60 ºC foi utilizada para as reações em ovinos, enquanto que a temperatura de 62 ºC foi usada para as reações de bovinos. As curvas de melting foram analisadas em 65 – 95 ºC, por 20 minutos, após os 40 ciclos. Os níveis de expressão dos genes candidatos foram determinados pelo ciclo de quantificação (Cq) durante a fase exponencial da PCR.

Bioinformática

Sequências sonda de humanos (*Homo sapiens*) foram utilizadas para encontrar sequências candidatas em bovinos (*Bos taurus*) e ovinos (*Ovis aries*) para os genes CMYC, DAX1, GLIS1, KLF5, OCT4, RONIN, ZFP281 e ZFX no UniProt (http://www.uniprot.org/). Com auxílio da sequência “sonda” de RNA mensageiro (RNAm), o tBLASn foi utilizado para identificadar mais sequências candidatas para os GRPs selecionados, e alinhamentos com *cut-off* de e-value $\geq e^{-10}$ foram considerados hits (https://www.ncbi.nlm.nih.gov).

A tradução das proteínas foi realizada utilizando o programa ORF-Finder, para identificar o quadro de leitura que codificará a proteína de cada sequência de RNAm candidata. Os alinhamentos múltiplos de proteína foram realizados utilizando- se MEGA7. A predição do peso molecular e o ponto isoelétrico foram realizadas a partir do JVirGel 2.0 e a localização subcelular, por meio do Cell-PLoc 2.0.

Resultados

Tabela 2: Primers utilizado para detecção dos genes relacionados à pluripotência em gametas e embriões de ovinos e bovinos por RT- qPCR

Gene	Sequência 5'-3' (Forward e Reverse)	Amplicon (pb)	Junção éxon-éxon	Número de Acesso (Espécie)
CMYC	F- ACTCCACCGCCTTTTCTCC R- CTTGTTCTTCCTCAGAGTCGC	135	Sim	NM_001046074.2 (Ovis aries)
DAX1	F- ACAGTGCCCTCTTCCTTCTG R- GTGCCTTCACAACTTTGCAC	131	Não	NM_001205857.1 (*Bos taurus*)
GAPDH	F- TGGAGGGACTTATGACCACTG R- AGAAGCAGGGATGATGTTCTG	119	Não	gi27525390 (*Capra hircus*)
GLIS1	F- TTCAGCAACTCCAGTGACCG R- GTGTGCAGCTTCTTACGCAC	170	Sim	XM_010827013.1 (Bos taurus)
KLF5	F- CATACTGGTGAGAAGCCGTACA R- GGCAGCTCAGTTCTGGTGT	192	Sim	XM_004012185.2 (Ovis aries)
OCT4	F- GTGAGAGGCAACCTGGAGAG R- GTCACTGCTTGATCGTTTGC	153	Não	GI333973469 (*Capra hircus*)
RONIN	F- CACGGGAGAAGACGTTAAGC R- GGAGCCAGTATCAGGGAAGC	187	Não	NM_001104994 (*Bos taurus*)
SDHA	F- GGAGCTGGAGAATTACGGCA R- CGCAGGGACCTTCCATACAA	177	Sim	XM_012125144.1 (Ovis aries)
TBP	F- AGAATAAGAGAGCCCCGCAC R- TTCTTCACTCTTGGCTCCCG	78	Sim	XM_012166509.1 (Ovis aries)
ZFP281	F- TCCAAATACCTCCAACAGGC R- GGCAATGAAGATGGCAACAC	194	Não	XM_610917.6 (*Bos taurus*)
ZFX	F- TCCTTGGATGATGCTGGCAA R- CAGTCCCACCTAAGTCATCCTC	163	Não	NM_177490.1 (Bos taurus)

Produção in vitro de embriões

Embriões de ovinos e bovinos foram produzidos *in vitro* para a análise da expressão dos GRPs durante o desenvolvimento embrionário (Tabela 3). Embriões bovinos foram obtidos a partir da FIV, enquanto que os embriões ovinos foram produzidos por FIV e ativação partenogenética. No entanto, a ativação partenogenética produziu embriões ovinos com maior eficiência e melhor morfologia. Por esses motivos, os embriões ovinos partenogenéticos foram utilizados para a expressão gênica (Tabela 3).

Tabela 3. Produção *in vitro* de embriões ovinos e bovinos.

Espécie	Ovócitos (n)	Método	Clivagem n (%)	Mórula n (%)	Blastocisto n (%)
Ovis aries	**156**	**AP**	**108/126 (85,7)^{A}**	**67/110 (60,9)^{A}**	**21/63 (33,0)^{B}**
Ovis aries	**73**	**FIV**	**18/71 (25,3)^{C}**	**4/71 (05,6)^{B}**	**1/46 (02,1)^{C}**
Bos taurus	**122**	**FIV**	**122/191 (63,8)^{B}**	**78/138 (56,2)^{A}**	**28/52 (53,8)^{A}**

AP: ativação partenogenética. FIV: Fecundação *in vitro*. Letras sobrescritas diferentes (A, B, C) denotam diferença estatística pelo teste de qui-quadrado (0,05).

Detecção de expressão de genes associados à pluripotência por PCR em tempo real (RT-qPCR)

Os genes de referência GAPDH, TBP e SDHA foram detectados em todas as amostras (Fig. 6). Baseado nos Cq, GAPDH e SDHA foram semelhantes e eficientes para ambas as espécies, indicando que são potenciais candidatos como genes de referência para o desenvolvimento embrionário (Tabela 4). A variação que foi observada nos Cq entre as espécies foi devido as quantidades diferentes de material biológico inicial, onde a amostra de bovinos tinha aproximadamente o dobro de ovócitos (Fig. 6). TBP apresentou menor potencial para as amostras de bovino e ovócitos de ovinos, embora mais eficiente para embriões ovinos.

Todos os GRPs candidatos foram detectados em ovinos e bovinos (Fig. 6), bovinos, com curvas de melting compatíveis com os produtos amplificados (Anexo A). Os GRPs apresentaram três perfis de expressão, considerando as duas espécies. Os genes OCT4, RONIN, ZFP281, ZFX e KLF5 foram detectados em ovócitos e todos estádios embrionários das duas espécies (Tabela 4). Quanto aos Cq, os genes apresentaram diferenças entre as espécies. Em ovinos, os genes OCT4, ZFX e KLF5 apresentaram Cq menores com o progresso do desenvolvimento embrionário e aumento do número de células (Tabela 5).

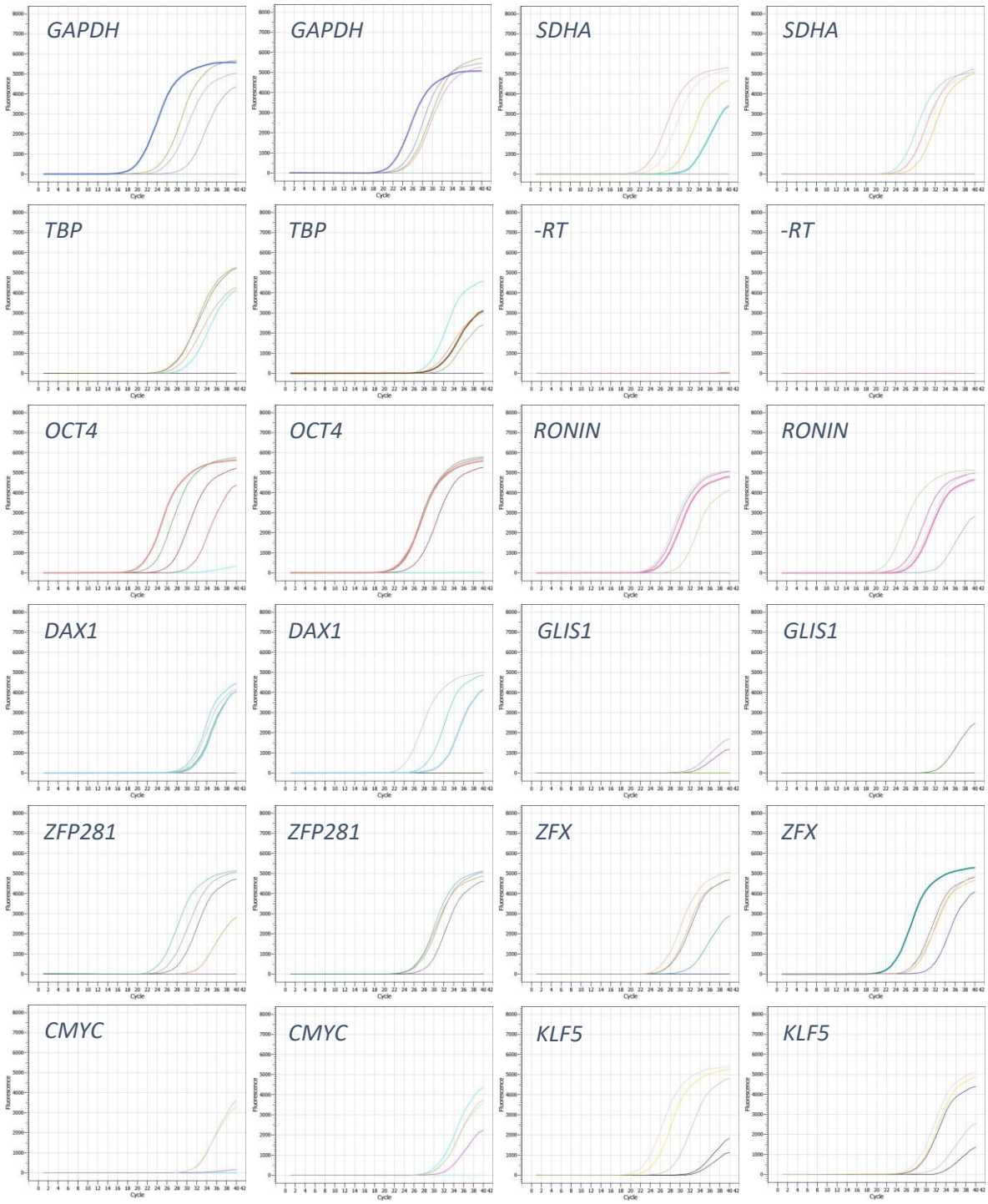


Fig. 6. Curvas de amplificação para oito genes relacionados à pluripotência em ovócitos e embriões de ovinos e bovinos.

ZFP281 e RONIN de ovinos apresentaram maiores Cq para ovócitos e menores em embriões nos diferentes estádios. Em bovinos, RONIN e ZFX apresentaram Cq mais baixos em embriões, sugerindo maior expressão (Tabela 5). OCT4, ZFP281 e RONIN apresentaram valores de Cq semelhantes nas quatro fases avaliadas.

CMYC foi detectado em todas as amostras de bovinos (Tabela 4). Em ovinos, CMYC não foi detectado em ovócito, mas foi encontrado nos demais estádios de desenvolvimento embrionário. DAX1 foi detectado em ovócitos e embriões de ovinos, embora em bovinos não tenha sido detectado na fase de mórula (Tabela 4). Quanto aos Cq, CMYC parece ter expressão semelhante durante o desenvolvimento embrionário nas duas espécies, enquanto que DAX1 apresentou maior expressão em ovócitos bovinos (Tabela 5).

GLIS1 apresentou um perfil de expressão diferente dos demais GRPs. Este gene, foi detectado apenas em ovócitos de bovinos, embora em ovinos tenha sido detectado em embriões clivados e blastocistos. Os Cq de GLIS1 foram altos, sugerindo baixa expressão.

Tabela 4. Expressão temporal de genes relacionados à pluripotência em gametas e embriões ovinos (O) e bovinos (B).

Gene	Ovócitos	Clivados	Mórula	Blastocisto
CMYC	**B**	**OB**	**OB**	**OB**
DAX1	**OB**	**OB**	**O**	**OB**
GLIS1	**B**	**O**	**-**	**O**
KLF5	**OB**	**OB**	**OB**	**OB**
OCT4	**OB**	**OB**	**OB**	**OB**
RONIN	**OB**	**OB**	**OB**	**OB**
ZFP281	**OB**	**OB**	**OB**	**OB**
ZFX	**OB**	**OB**	**OB**	**OB**

Tabela 5. Valores de Cq e melting obtidos por PCR tempo real (RT-qPCR) para oito GRP em ovócitos e embriões de ovinos e bovinos. B: bovino. Cq: ciclo de quantificação. O: ovino.

Gene	Branco (O/B)		Ovócitos (O/B)		Clivados (O/B)		Mórula (O/B)		Blastocisto (O/B)	
	Cq	Melting	Cq	Melting	Cq	Melting	Cq	Melting	Cq	Melting
GAPDH	0/0	00/00	28/20	85/86	22/23	85/86	24/23	85/86	18/22	85/85
TBP	0/0	00/00	28/27	81/80	25/31	81/80	26/28	81/80	25/29	81/80
SDHA	0/0	00/00	31/23	88/88	27/26	88/88	23/24	88/88	22/24	88/88
-RT	0/0	00/00	0/0	00/00	0/0	00/00	0/0	00/00	0/0	00/00
OCT4 (POU5F1)	0/0	00/00	29/21	86/85	24/24	86/86	21/21	86/86	19/21	86/86
RONIN	0/0	00/00	28/20	90/90	23/23	90/90	24/26	90/90	23/25	90/90
DAX1 (NR0B1)	0/0	00/00	29/22	81/82	28/26	81/82	29/0	82/00	30/29	82/82
GLIS1	0/0	00/00	0/32	00/87	33/0	00/00	0/0	00/00	32/0	00/00
ZFP281	0/0	00/00	31/24	81/81	26/27	81/81	24/24	81/81	22/24	81/81
ZFX	0/30	00/00	30/21	81/80	26/26	81/81	26/26	81/81	24/26	81/81
CMYC	0/0	00/00	0/28	00/86	30/29	86/86	38/31	86/87	30/29	86/86
KLF5	31/0	00/74	33/26	88/90	26/30	88/74	22/26	88/90	20/25	88/90

B: bovino. Cq: ciclo de quantificação. O: ovino.

Bioinformática

Com o intuito de estimar possíveis diferenças nas funções dos GRPs entre ovinos e bovinos, realizou-se análises *in silico* para avaliar as sequências protéicas dos GRPs e suas propriedades. A partir das sequências protéicas obtidas, observou-se que ovinos apresentam em média 3,37 sequências por GRP, sendo a maioria sequências preditas a partir do sequenciamento do genoma (não caracterizadas). As sequências de GRPs bovinos apresentaram uma sequência por

gene, com exceção do CMYC, o qual possui duas isoformas (Anexo B). As proteínas de OCT, RONIN e CMYC, se mostraram semelhantes entre ovinos e bovinos, se não idênticas a partir do tamanho, ponto isoelétrico e peso molecular (Anexo B). Os outros 5 GRPs apresentaram similaridades entre a sequências de bovinos e uma isoformas de ovinos, apesar da outra isoforma de ovinos apresentar variação considerável em todos os parâmetros avaliados em nível de protéina (Anexo B).

Ovinos possuem 13 isoformas de ZFX, embora o alinhamento das sequências preditas de proteína tenha sugerido apenas duas proteínas distintas (Anexo C). A análise fenética das sequências dos GRPs permitiu identificar que CMYC e ZFX são mais conservados entre ovinos e bovinos (Anexo D). Em relação aos demais GRPs, pequenos ruminantes são mais conservados entre si, enquanto que os GRPs de bovinos são mais conservados em relação as sequências de búfalos (Anexo D).

Discussão

A expressão temporal de oito GRPs foi determinada durante o desenvolvimento embrionário de ovinos e bovinos. Os embriões bovinos foram produzidos por FIV e os embriões ovinos foram produzidos por ativação partenogenética. O método de produção de embriões tem influência sobre a expressão gênica relativa dos GRPs, mas não na expressão temporal (Bebbere *et al*. 2010). A expressão de OCT4 foi inferior em blastocistos partenogenéticos em relação aos obtidos por FIV, embora seja semelhante em embriões clivados e mórulas (Bebbere *et al*. 2010). Nesse mesmo estudo, a expressão de NANOG foi semelhante em mórulas e blastocistos. Sob as condições descritas acima, a ativação partenogenética foi mais eficiente que a FIV para obtenção de maior quantidade e qualidade de embriões de ovinos. Esse achado parece ser dependente das condições experimentais, pois outros relatos encontraram eficiências

semelhantes entre FIV e ativação partenogenética em ovinos (Bebbere *et al*. 2010; Ledda *et al*. 2016) e bovinos (Van De Velde *et al*. 1999; Nascimento *et al*. 2016).

O gene RONIN foi detectado em todas as fases do desenvolvimento embrionário e nas duas espécies. Esse gene foi inicialmente caracterizado como um fator essencial para embriogênese e viabilidade de CTE (Dejosez *et al*. 2008) e sua expressão com CMYC e KLF4 convertem células do saco amniótico em pluripotentes (Nagata *et al*. 2009). Quanto a sua função, RONIN foi identificado como promotor de síntese protéica, metabolismo energético em células CTE, enquanto que em células da retina aumenta a expressão de genes mitocondriais (Dejosez *et al*. 2010; Poche *et al*. 2016).

Este trabalho foi o primeiro estudo sobre a expressão do ZFP281 em embriões de mamíferos. As informações disponíveis sobre ZFP281 haviam sido obtidas em estudos com CTE (Wang *et al*. 2008; Fidalgo *et al*. 2011). Esse foi identificado como um GRP por apresentar expressão diferencial entre células pluripotentes e células somáticas (Wang *et al*. 2006), e forma complexos proteicos com NANOG (Wang et al., 2006), OCT4 e SOX2 (Wang *et al*. 2008). Além disso, ZFP281 controla diversos genes alvo em conjunto com estes GRPs, inclusive regulando a expressão de NANOG (Wang *et al*. 2008). Por ter sido detectado em todas as fases de desenvolvimento, ZFP281 pode contribuir para formação de complexos de regulação dos genes alvos (Wang *et al*. 2006, 2008) e para controle da expressão de outros GRPs (Wang *et al*. 2008; Fidalgo *et al*. 2011).

GLIS1 apresentou perfil de expressão espécie-específico dentre os genes analisados. GLIS1 é um dos GRPs menos caracterizados, sendo descoberto numa prospecção de genes envolvidos na reprogramação celular (Maekawa *et al*. 2011). Sua expressão em camundongos é alta em ovócitos e zigotos, porém baixa em CTE, fibroblastos e outras células somáticas (Maekawa e Yamanaka, 2011). Esse gene é expresso em ovócitos e embriões bovinos até o estádio de quatro células (Takahashi *et al*. 2015). O silenciamento do GLIS1 causa o bloqueio do

desenvolvimento embrionário de bovinos, possivelmente pela incompleta ativação do genoma embrionário (Takahashi *et al*. 2015).

ZFX foi detectado em todas as fases avaliadas nas duas espécies. Estudos anteriores avaliaram a expressão de ZFX durante o desenvolvimento embrionário, como exemplo de gene expresso no cromossomo X (Bernardi *et al* 1996; Peippo *et al*. 2002). Mais recentemente, demonstrou-se que ZFX é necessário para a pluripotência de CTE de camundongos e humanos (Galan-Caridad *et al*. 2007; Harel *et al*. 2012), embora embriões sem ZFX sejam capazes de atingir o estádio de blastocisto e implantar (Luoh *et al*. 1997; Galan-Caridad *et al*. 2007).

DAX1 (NR0B1) foi expresso durante o desenvolvimento embrionário das duas espécies, com exceção de mórulas de bovinos. DAX1 contribui para o processo de reprogramação celular (Zhang *et al*. 2014; Lujan *et al*. 2015), embora a necessidade de DAX1 para manutenção da pluripotência em CTE seja controversa (Khalfallah *et al*. 2009; Zhang *et al*. 2014). DAX1 havia sido detectado em ovócitos e embriões de camundongos (Clipsham *et al*. 2004; Stickels *et al*. 2015), embora seja dispensável para formação dos blastocistos (Yu *et al*. 1998).

KLF5 foi detectado pela primeira vez em ovócitos e durante todo o desenvolvimento embrionário de ovinos e bovinos. Este gene é necessário para manutenção da pluripotência, sendo expresso durante todo desenvolvimento embrionário de camundongos (Ema *et al*. 2008; Parisi e Russo, 2010). A influência de KLF5 sobre a pluripotência depende da regulação de outros GRPs e silenciamento de genes promotores de diferenciação celular (Parisi e Russo, 2010).

A expressão de CMYC diferiu em ovócitos, pois o gene foi detectado apenas em bovinos, conforme descrito anteriormente por Miles *et al*. (2012). Apesar de CMYC ter sido detectado em todos os estádios de desenvolvimento embrionário de ovinos e bovinos, um outro relato não detectou o gene em mórulas, apenas em blastocistos (Madeja *et al*. 2013).

A análise *in silico* em nível de proteína demonstrou que pouco se conhece sobre os GRPs em bovinos e ovinos. A estratégia de predição de função pela homologia (Lee *et al*. 2007), mostrou alto grau de conservação das proteínas e provável semelhança em relação a função entre ruminantes.Curiosamente, ovinos apresentaram múltiplas isoformas para cada GRP, com variação significativa para proteínas homologas. O fato de que algumas isoformas de GRPs em ovinos apresentam variação estrutural sugere que esta espécie pode apresentar particularidades no controle da pluripotência. A validação experimental dos GRPs quanto à sequência e função pode excluir sequências redundantes em ovinos e identificar sequência parálogas e com novas propriedades. A análise fenética também sugere que os GRPs pode apresentar funções conservadas entre essas espécies. Novas ferramentas computacionais têm sido descritas para avaliar células pluripotentes (Bian e Cahan 2016; Kurum et al 2016). A aplicação combinada destas abordagens com dados experimentais sobre GRPs poderá aumentar a capacidade de investigar o controle da totipotência e pluripotência durante o desenvolvimento embrionário de ruminantes.

Em conclusão, a expressão temporal de GRPs difere entre ovinos e bovinos, sugerindo possíveis diferenças quanto à utilização destes genes como marcadores moleculares durante o desenvolvimento embrionário desta espécies.

Referências

Anand, T., Kumar, D., Singh, M. K., Shah, R. A., Chauhan, M. S., Manik, R. S., Singla, S. K., e Palta, P. (2011). Buffalo (Bubalus bubalis) embryonic stem cell-like cells and preimplantation embryos exhibit comparable expression of pluripotency-related antigens**.** *Reproduction in Domestic Animals* **46**, 50-58.

Bebbere, D., Bogliolo, L., Ariu, F., Fois, S.; Leoni, G. G.; Succu, S., Berlinguer, F., e Ledda, S. (2010). Different temporal gene expression patterns for ovine pre-implantation

embryos produced by parthenogenesis or in vitro fertilization. *Theriogenology* **74**, 712-723.

Berg, D. K., Smith, C. S., Pearton, D. J., Wells, D. N., Broadhurst, R., Donnison M., e Pfeffer, P. L. (2011) Trophectoderm lineage determination in cattle. *Developmental Cell* **20**, 244-255.

Bernardi, M. L., Cotinot, C., Payen, E., e Delouis, C. (1996). Transcription of Y- and X-Linked Genes in Preimplantation Ovine Embryos, *Molecular Reproduction and Development* **45**, 132-138.

Bezerra, F. Q. G., Silva, J. C. F., Silva, P. G. C., Castanhede, L. F., Basto, S. L. R., Freitas Neto, L. M., Moura, M. T., Lima, P. F., e Oliveira, M. A. L. (2014) Produção in vitro de embriões ovinos a partir de oócitos coletados durante os períodos seco e chuvoso. *Medicina Veterinária (UFRPE)* **8**, 17-23.

Bian, Q., e Cahan, P. (2016). Computational Tools for Stem Cell Biology. *Trends in Biotechnology* **34**, 993-1009.

Chiamenti, A., Filho, C. R., Moura, M. T., Paula-Lopes, F. F., Neves, J. P., Neto, C. C., Gonçalves, P. B., Lima, P. F., e Oliveira, M. A. (2013). Use of retinyl acetate, retinoic acid and insulin-like growth factor-I (IGF-I) to enhance goat embryo production. *Acta Veterinaria Hungarica* **61**, 116-124.

Clipsham, R., Niakan, K., e Mccabe, E. R. (2004). NR0B1 and its network partners are expressed early in murine embryos prior to steroidogenic axis organogenesis.*Gene Expression Patterns* **4**, 3-14.

Cockburn, K., e Rossant, J. (2010). Making the blastocyst: lessons from the mouse. *Journal of Clinical Investigation* **120**, 995-1003.

Dang-Nguyen, T. Q., e Torres-Padilla, M. E. (2015). How cells build totipotency and pluripotency: nuclear, chromatin and transcriptional architecture. *Current Opinion in Cell Biology* **34**, 9-15.

Dejosez, M., Krumenacker, J. S., Zitur, L. J., Passeri, M., Chu, L. F., Songyang, Z., Thomson, J. A., e Zwaka, T. P. (2008). Ronin is essential for embryogenesis and the pluripotency of mouse embryonic stem cells, *Cell* **133**, 1162-1174.

Dejosez, M., Levine, S. S., Frampton, G. M., Whyte, W. A., Stratton, S. A., Barton, M. C., Gunaratne, P. H., Young, R. A., e Zwaka, T. P. (2010) Ronin/Hcf-1 binds to a hyperconserved enhancer element and regulates genes involved in the growth of embryonic stem cells.*Genes and Developmen*t **24**, 1479-1484.

Ema, M., Mori, D., Niwa, H., Hasegawa, Y., Yamanaka, Y., Hitoshi, S., Mimura, J., Kawabe, Y., Hosoya, T., Morita, M., Shimosato, D., Uchida, K., Suzuki, N., Yanagisawa, J., Sogawa, K., Rossant, J., Yamamoto, M., Takahashi, S., e Fujii-Kuriyama, Y. (2008). Krüppel-like factor 5 is essential for blastocyst development and the normal self-renewal of mouse ESCs. *Cell Stem Cell* **3**, 555-567.

Fidalgo, M., Shekar, P. C., Ang, Y. S., Fujiwara, Y., Orkin, S. H., e Wang, J. (2011). Zfp281 functions as a transcriptional repressor for pluripotency of mouse embryonic stem cells. *Stem Cells* **29**, 1705-1716.

Galan-Caridad, J. M., Harel, S., Arenzana, T. L., Hou, Z. E., Doestsch, F. K., Mirny, L. A., e Reizis, B. (2007). Zfx controls the self-renewal of embryonic and hematopoietic stem cells, *Cell* **129**, 345-357.

Goissis, M. D., e Cibelli, J. B. (2014). Functional characterization of SOX2 in bovine preimplantation embryos. *Biology Reproduction* **90**, 30.

Harel**,** S., Tu, E. Y., Weisberg, S., Esquilin, M., Chambers, S. M., Liu, B., Carson, C. T., Studer, L., Reizis, B., e Tomishima, M. J. (2012).ZFX controls the self-renewal of human embryonic stem cells. *PLoS One* **7**, e42302.

He. S., Pant, D., Schiffmacher, A., Bischoff, S., Melican, D., Gavin, W., e Keefer, C. (2006). Developmental expression of pluripotency determining factors in caprine embryos: novel pattern of NANOG protein localization in the nucleolus. *Molecular Recpoduction and Development*, **73**, 1512-1522.

Khalfallah**,** O., Rouleau, M., Barbry, P., Bardoni, B., e Lalli, E. (2009). Dax-1 knockdown in mouse embryonic stem cells induces loss of pluripotency and multilineage differentiation. *Stem Cells* **27**, 1529-1537.

Kim, M. S., Sakurai, T., Bai, H., Bai, R., Sato, D., Nagaoka, K., Chang, K. T., Godkin, J. D., Min, K. S., e Imakawa, K. (2013). Presence of Transcription Factor OCT4 limits Interferon-tau Expression during the Pre-attachment Period in Sheep, *Asian Australasian Journal of Animal Science* **26**, 638-645.

Kurum, E., Benayoun, B. A., Malhotra, A., George, J., e Ucar, D. (2016). Computational inference of a genomic pluripotency signature in human and mouse stem cells. *Biology Direct* **11**, 47.

Lee, D., Redfern, O., e Orengo, C. (2007). Predicting protein function from sequence and structure. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **8**, 995-1005.

Ledda, S., Idda, A., Kelly, J., Ariu, F., Bogliolo, L., e Bebbere, D. (2016). A novel technique for in vitro maturation of sheep oocytes in a liquid marble microbioreactor. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* **33**, 513-518.

Lujan, E., Zunder, E. R., Ng, Y. H., Goronzy, I. N., Nolan, G. P., e Wernig, M. (2015). Early reprogramming regulators identified by prospective isolation and mass cytometry. *Nature* **521**, 352-356.

Luoh**,** S. W., Bain, P. A., Polakiewicz, R. D., Goodheart, M. L., Gardner, H., Jaenisch, R., e Page, D. C. (1997). ZFX mutation results in small animal size and reduced germ cell number in male and female mice. *Development* **124**, 2275-2284.

Madeja**,** Z. E., Sosnowski, J., Hryniewicz, K., Warzych, E., Pawlak, P., Rozwadowska, N., Plusa, B., e Lechniak, D. (2013). Changes in sub-cellular localisation of trophoblast and inner cell mass specific transcription factors during bovine preimplantation development. *BMC Developmental Biology* **13**, 32.

Maekawa, M., e Yamanaka, S. (2011). GLIS1, a unique pro-reprogramming factor, may facilitate clinical applications of iPSC technology. *Cell Cycle* **10**, 3613-3614.

Miles, J. R., Mcdaneld, T. G., Wiedmann, R. T., Cushman, R. A., Echternkamp, S. E., Vallet, J. L., e Smith, T. P. (2012). MicroRNA expression profile in bovine cumulus-oocyte complexes: possible role of let-7 and miR-106a in the development of bovine oocytes. *Animal Reproduction Science* **130**, 16-26.

Morris, L. H., Randall, A. E., King, W. A., Johnson, W. H., e Buckrell, B. C. (2003). The contribution of the male to ovine embryogenesis in an in vitro embryo production system. *Animal Reproduction Science* **75**, 9-26.

Moura, M. T., De Sousa, R. V., Leme, L. O., e Rumpf, R. (2008). Analysis of actinomycin D treated cattle oocytes and their use for somatic cell nuclear transfer. *Animal Reproduction Science* **109**, 40-49.

Moura, M. T. (2012). Pluripotency and cellular reprogramming. *An. Acad. Pernambuc. Ciênc. Agron.* **8**, 138-168.

Nagata, S., Toyoda, M., Yamaguchi, S., Hirano, K., Makino, H., Nishino, K., Miyagawa, Y., Okita, H., Kiyokawa, N., Nakagawa, M., Yamanaka, S., Akutsu, H., Umezawa, A., e Tada, T. (2009). Efficient reprogramming of human and mouse primary extra-embryonic cells to pluripotent stem cells.*Genes to Cells* **14**, 1395-1404.

Nascimento, P. S., Moura, M. T., Silva, P. G. C., Cantanhêde, L., Ferreira-Silva, J. C., Chaves, M. S., Braga, V. A., Muniz, M. C. S., Farias, M. C., Bartolomeu, C. C., e Oliveira, M. A. L. (2016). Efeitos Genéticos Sobre A Produção In Vitro De Embriões Bovinos, XXI Encontro de genética do nordeste. **Resumo**.

Nichols, J., Zevnik, B., Anastassiadis, K., Niwa, H., Klewe- Nebenius, D., Chambers, J., Schöler, H., e Smith, A. (1998). Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4, *Cell* **95**, 379-391.

Parisi, S., Cozzuto, L., Tarantino, C., Passaro, F., Ciriello, S., Aloia, L., Antonini, D., De Simone, V., Pastore, L., e Russo T. (2010). Direct targets of KLF5 transcription factor contribute to the maintenance of mouse embryonic stem cell undifferentiated state. *BMC Biology* **8**, 128.

Peippo, J., Farazmand, A., Kurkilahti, M., Markkula, M., Basrur, P. K., e King, W. A. (2002) Sex-chromosome linked gene expression in in-vitro produced bovine embryos, *Molecular Human Reproduction* **8**, 923-929.

Poche, R. A., Zhang, M., Rueda, E. M., Tong, X., Mcelwee, M. L., Wong, L., Hsu, C. W., Dejosez, M., Burns, A. R., Fox, D. A., Martin, J. F., Zwaka, T. P., e Dickinson, M. E. (2016). RONIN Is an Essential Transcriptional Regulator of Genes Required for Mitochondrial Function in the Developing Retina. *Cell Reports* **14**, 1684-1697.

Rodríguez-Alvarez, L., Cox, J., Tovar, H., Einspanier, R., e Castro, F. O. (2010). Changes in the expression of pluripotency-associated genes during preimplantation and peri-implantation stages in bovine cloned and in vitro produced embryos. *Zygote* **18**, 269-279.

Rozen, S., e Skaletsky, H. (2000). Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers Methods in Molecular Biology **132**, 365-386.

Rossant, J. (2007). Stem cells and lineage development in the mammalian blastocyst. *Reproduction, fertility, and development* **19**, 111-118.

Rossant, J. (2016). Making the Mouse Blastocyst: Past, Present, and Future. *Current Topics in Developmental Biology* **117**, 275-288.

Sanna, D., Sanna, A., Mara, L., Pilichi, S., Mastinu, A., Chessa, F., Pani, L., e Dattena, M. (2010). Oct4 expression in in-vitro-produced sheep blastocysts and embryonic-stem-like cells, *Cell Biology International* **34**, 53-60.

Stickels, R., Clark, K., Heider, T. N., Mattiske, D. M., Renfree, M. B., e Pask, A. J. (2015). DAX1/NR0B1 was expressed during mammalian gonadal development and gametogenesis before it was recruited to the eutherian X chromosome. *Biology of Reproduction* **92**, 22.

Takahashi, K., Sakurai, N., Emura, N., Hashizume, T., e Sawai, K. (2015). Effects of downregulating GLIS1 transcript on preimplantation development and gene expression of bovine embryos. *Journal Reproduction and Development* **61**, 369-374.

Van De Velde, A., Liu, L., Bols, P. E., Ysebaert, M. T., e Yang, X. (1999). Cell allocation and chromosomal complement of parthenogenetic and IVF bovine embryos. *Molecular Reproduction and Development* **54**, 57-62.

Wang, J., Rao, S., Chu, J., Shen, X., Levasseur, D. N., Theunissen, T. W., e Orkin, S. H. (2006). A protein interaction network for pluripotency of embryonic stem cells. *Nature* **444**, 364-368.

Wang, Z. X., The, C. H., Chan, C. M., Chu, C., Rossbach, M., Kunarso, G., Allapitchay, T. B., Wong, K. Y., e Stanton, L. W. (2008). The transcription factor ZFP281 controls embryonic stem cell pluripotency by direct activation and repression of target genes. *Stem Cells*, **26**, 2791-2799.

Wang, Z., Lin, P., e Yu, S. (2013). Effects of ghrelin on developmental competence and gene expression of in vitro fertilized ovine embryos, *Theriogenology* **79**, 695-701.

Willadsen, S. M. (1981). The development capacity of blastomeres from 4- and 8-cell sheep embryos. *Journal of embryology and experimental morphology* **65**, 165-172.

Wu, J., Yamauchi, T., e Izpisua Belmonte, J. C. (2016). An overview of mammalian pluripotency. *Development* **143**, 1644-1648.

Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S., e Madden, T. L. (2012). Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics* **13**, 134.

Yeo, J. C., e Ng, H. H. (2013). The transcriptional regulation of pluripotency. *Cell Research* **23**, 20-32.

Yu, R. N., Ito, M., Saunders, T. L., Camper, S. A., e Jameson, J. L. (1998). Role of Ahch in gonadal development and gametogenesis. *Nature Genetics* , **20**, 353-357.

Zhang, J., Liu, G., Ruan, Y., Wang, J., Zhao, K., Wan, Y., Liu, B., Zheng, H., Peng, T., Wu, W., He, P., Hu, F. Q., e Jian, R. (2014). DAX1 and NANOG act in parallel to stabilize mouse embryonic stem cells and induced pluripotency. *Nature Communications* **5**, 5042.

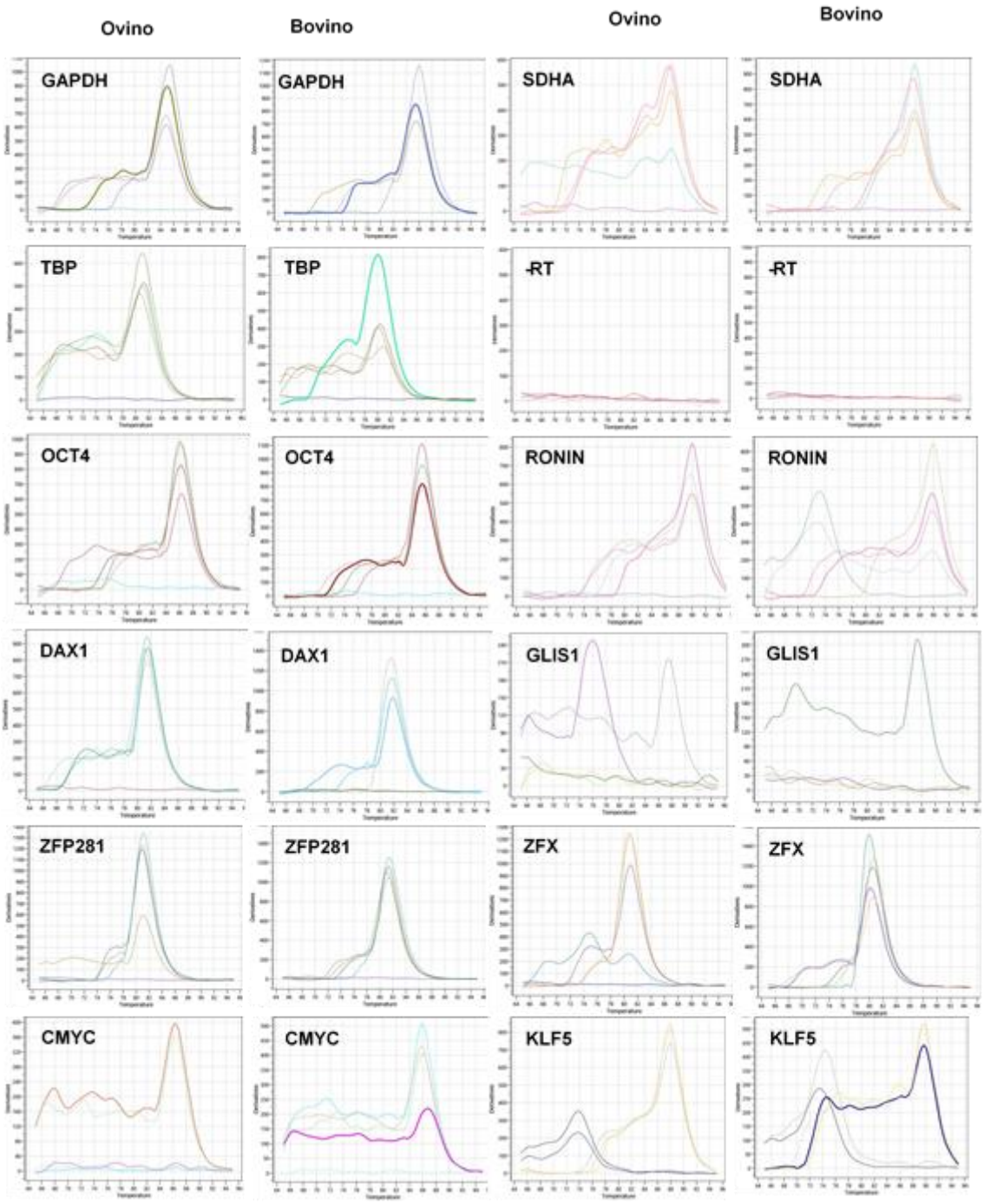
5. Considerações Finais

A expressão temporal dos GRP foi semelhantes para vários GRP, embora existam diferenças entre ovinos e bovinos. Alguns GRPs avaliados apresentaram variação de expressão em algumas fases do desenvolvimento entre as espécies. Entretanto, um GRP apresentou expressão contrastante em todas as fases nas duas espécies. Avaliações de expressão relativa poderão identificar variações nos níveis de expressão em genes detectados em fases semelhantes entre ovinos e bovinos. O perfil de expressão dos GRP avaliados deverá contribuir para a avaliação de embriões obtido por diferentes biotécnicas.

Análises *in silico* sugerem a partir da sequência proteica, que os GRPs apresentam funções semelhantes entre ruminantes. Ovinos possuem mais sequências para os GRPs, sugerindo possíveis sequências redundantes, com funções novas ou isoforma-específicas. Entretanto, a caracterização experimental das proteínas continua sendo necessária para confirmar esta hipótese.

6. Anexos

Anexo A. Valores de melting para oito genes relacionados à pluripotência em ovócitos e embriões de ovinos e bovinos.



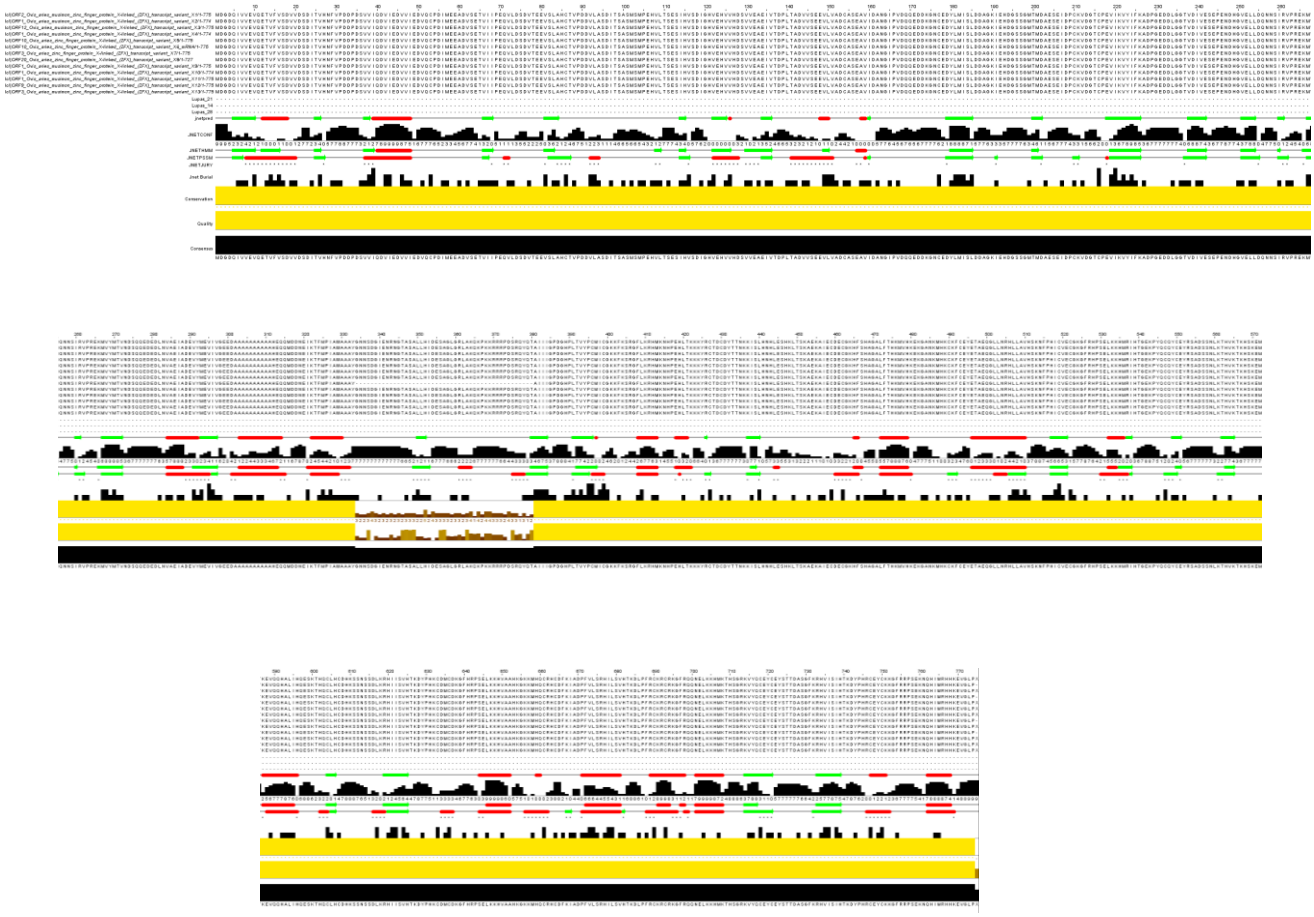
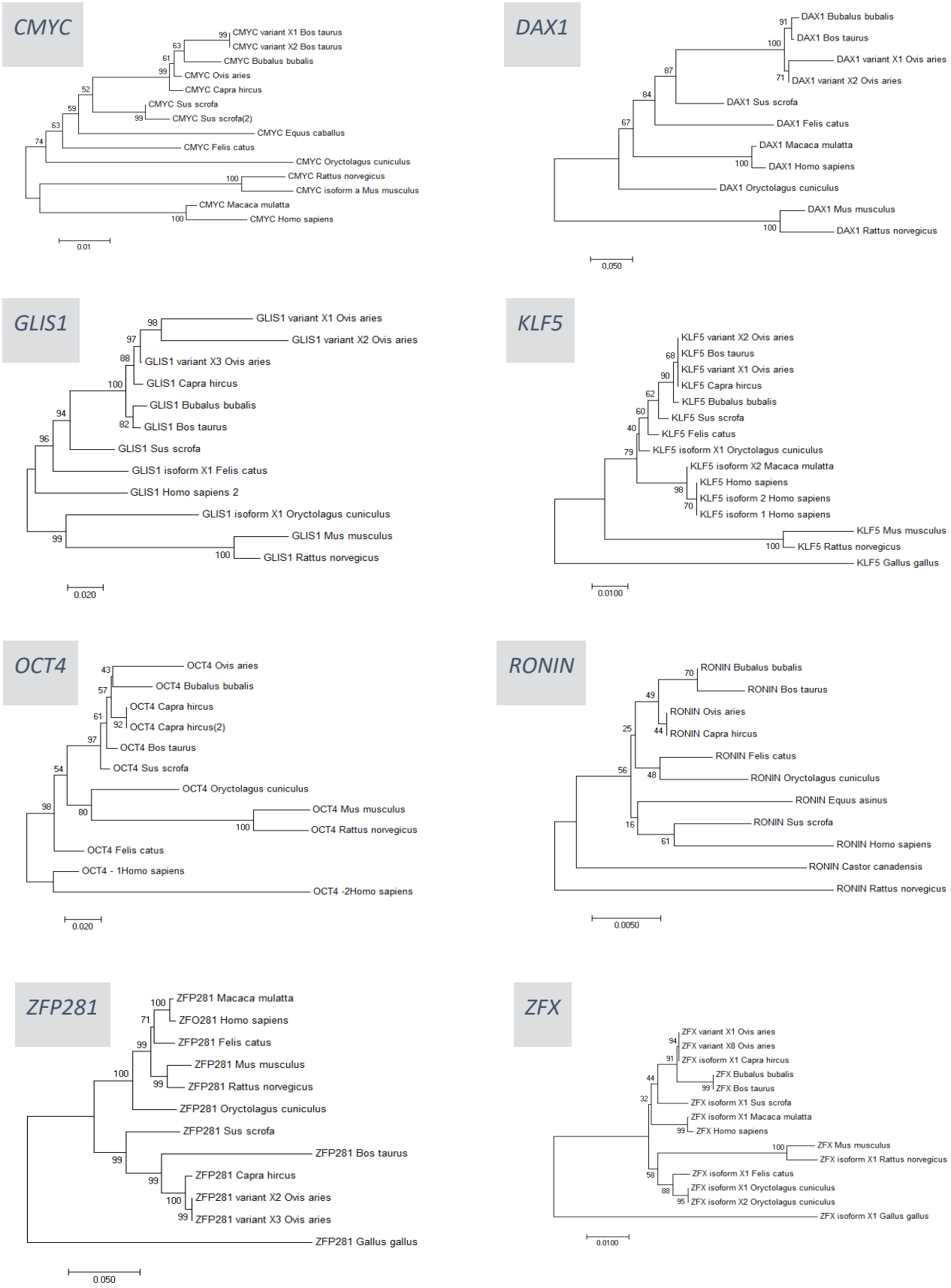
Anexo B. Tamanho da proteína, ponto isoelétrico, peso molecular e localização subcelular para oito genes relacionados à pluripotência em ovinos e bovinos.

Gene	Espécie	Isoforma	Start*	Stop**	Tamanho (Aa)	Pi	PM	Localização Subcelular
CMYC	O. aries	-	209	1528	439	5,31	48,47	Núcleo
	B. taurus	X1	707	2026	439	5,21	48,38	Núcleo
	B. taurus	X2	119	1438	439	5,21	48,38	Núcleo
DAX1	O. aries	X1	<1	1149	382	6,27	41,48	Citoplasma & Núcleo
	O. aries	X2	238	1653	471	6,75	51,56	Citoplasma & Núcleo
	B. taurus	-	22	1437	471	6,52	51,60	Citoplasma & Núcleo
GLIS1	O. aries	X1	3063	4940	625	8,48	66,05	Núcleo
	O. aries	X2	5879	8182	767	8,58	81,94	Núcleo
	O. aries	X3	5879	7729	616	7,89	65,54	Núcleo
	B. taurus	-	97	2487	796	8,11	84,36	Núcleo
KLF5	O. aries	X1	286	1650	454	8,54	50,47	Núcleo
	O. aries	X2	170	1270	366	8,77	41,19	Núcleo
	B. taurus	-	304	1668	454	8,54	50,47	Núcleo
OCT4	O. aries	-	4	1083	359	5,99	38,25	Núcleo
	B. taurus	-	<1	1083	360	5,56	38,33	Núcleo
RONIN	O. aries	X1	271	1182	303	8,96	33,01	Núcleo
	O. aries	X2	<1	921	306	9,42	32,97	Núcleo
	B. taurus	-	49	960	303	8,96	33,05	Núcleo
ZFP281	O. aries	X1	1309	3117	602	8,42	65,62	Núcleo
	O. aries	X2	163	2784	873	8,67	93,23	Núcleo
	O. aries	X3	152	2773	873	8,67	93,23	Núcleo
	B. taurus	-	30	2570	846	9,78	90,65	Núcleo

Gene	Espécie	Isoforma	Start*	Stop**	Tamanho (Aa)	Pi	PM	Localização Subcelular
ZFX	O. aries	X1	1124	<3526	800	5,63	90,16	Núcleo
	O. aries	X2	<1	2403	800	5,63	90,16	Núcleo
	O. aries	X3	1107	<3431	774	5,81	87,32	Núcleo
	O. aries	X4	1306	3630	774	5,81	87,32	Núcleo
	O. aries	X5	129	>2531	800	5,63	90,16	Núcleo
	O. aries	X6	378	>2780	800	5,63	90,16	Núcleo
	O. aries	X7	215	>2539	774	5,81	87,32	Núcleo
	O. aries	X8	129	2390	753	5,45	84,98	Núcleo
	O. aries	X9	434	>2836	800	5,63	90,16	Núcleo
	O. aries	X10	172	2574	800	5,63	90,16	Núcleo
	O. aries	X11	167	>2569	800	5,63	90,16	Núcleo
	O. aries	X12	48	>2450	800	5,63	90,16	Núcleo
	O. aries	X13	566	>2890	774	5,81	87,32	Núcleo
	B. taurus	-	26	2428	800	5,66	90,60	Núcleo

Aa: Aminoácidos Pi: Ponto isoelétrico. PM: Peso molecular *Nucleotídeo inicial da proteína. **Último nucleotídeo da proteína.

Anexo C. Alinhamento múltiplo protéico das treze isomorfas de ZFX em ovinos (Ovis aries).



Anexo D. Análise fenética de oito genes relacionados à pluripotência. As sequências de ovinos (*Ovis aries*) e bovinos (*Bos taurus*) estão identificadas.