UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

Werner Giehl Glanzner

EPIGENÉTICA NA REPROGRAMAÇÃO CELULAR E NO DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO

Santa Maria, RS
2016

Werner Giehl Glanzner

EPIGENÉTICA NA REPROGRAMAÇÃO CELULAR E NO DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração em Sanidade e Reprodução Animal, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Medicina Veterinária**.

Orientador: Prof. Paulo Bayard Dias Gonçalves

Santa Maria, RS
2016

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática
da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Giehl Glanzner, Werner
Epigenética na reprogramação celular e desenvolvimento embrionário / Werner Giehl Glanzner.-2016.
99 p.; 30cm

Orientador: Paulo Bayard Dias Gonçalves
Coorientador: Vilceu Bordignon
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, RS, 2016

1. Biologia celular 2. Reprogramação celular 3. Suínos 4. Embrião I. Dias Gonçalves, Paulo Bayard II. Bordignon, Vilceu III. Título.

Werner Giehl Glanzner

EPIGENÉTICA NA REPROGRAMAÇÃO CELULAR E NO DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração em Sanidade e Reprodução Animal, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Medicina Veterinária**.

Aprovado em 26 de fevereiro de 2016:

_____
Paulo Bayard Dias Gonçalves, PhD (UFSM)
(Presidente/Orientador)

_____
Vilceu Bordignon, PhD (McGill)

_____
Fernando Silveira Mesquita, PhD (UNIPAMPA)

_____
Marcos Henrique Barreta, Dr (UFSC)

_____
Fabio Vasconcellos Comim, PhD (UFSM)

Santa Maria, RS
2016

DEDICATÓRIA

Ao amigo e Professor JF (João Francisco Coelho de Oliveira - in memorian). Um companheiro que nos deixou antes da hora, e que nos faz falta. Um grande profissional e ser humano. Além de ser um dos grandes responsáveis por eu ter chegado até aqui. Muito obrigado!

AGRADECIMENTOS

À minha família, principalmente meu pai (Werner), minha mãe (Cecília), minhas irmãs (Aline e Cecília) e aos meus sobrinhos e sobrinhas, pelo pouco tempo que pude passar ao seu lado, e pelo pouco tempo de convivência em função da busca dos meus objetivos. Agradeço imensamente por sempre estarem ao meu lado, torcendo por mim e acreditando que isso servirá para a busca de um futuro melhor para todos nós.

A minha, na época namorada, hoje noiva Karina Gutierrez, pelo amor e apoio incondicional, pela ajuda, pela dedicação, pela admiração e pela parceria e por ser a pessoa que mais me entende e que me acompanha em todos os momentos. Agradeço também a toda a sua família, país, irmãos, tias, tios, que me acolheram e fizeram da sua, a minha família.

A todos os meus orientadores durante a vida acadêmica, os quais foram muitos e de muitas universidades e instituições.

Uma agradecimento especial ao professor Paulo Bayard Dias Gonçalves que me auxiliou e me abrigou em seu laboratório durante toda a minha trajetória profissional. Um agradecimento especial, também, ao professor Vilceu Bordignon, mais que professor, um amigo, que me aconselha, ajuda e orienta. Uma pessoa que sabe te alegrar nas horas mais difíceis, que sabe te motivar quando tudo parece perdido e que faz tudo parecer mais fácil.

A todos os colegas do Biorep e do Laboratório da McGill, pela amizade, apoio, companheirismo, convívio, e pela parceria ao longo da minha formação. Em especial aos que participaram ativamente e tiveram uma ajuda essencial em todas as etapas da minha formação.

À UFSM pela oportunidade e formação acadêmica, a Universidade do Estado do Colorado por ter me acolhido durante dois meses, e principalmente a Universidade McGill pelo doutorado Sanduiche, o que me possibilitou crescer imensamente no sentido pessoal e profissional.

Ao CNPq, CAPES e FAPERGS pela bolsa e apoio financeiro para realização dos experimentos.

Aos meus amigos, enfim, a todos aqueles que colaboraram direta ou indiretamente para a realização desse trabalho. Muito Obrigado!

RESUMO

EPIGENÉTICA NA REPROGRAMAÇÃO CELULAR E NO DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO

AUTOR: Werner Giehl Glanzner
ORIENTADOR: Paulo Bayard Dias Gonçalves

A epigenética tem se destacado como a principal moduladora das funções celulares e reguladora da expressão gênica, seja pela ativação ou repressão da atividade transcricional. Além disso, a epigenética está relacionada diretamente a processos reprodutivos como a reprogramação celular e o desenvolvimento embrionário. Em um primeiro estudo, foi avaliado o efeito do extrato de oócitos em vesícula germinativa (VG), isoladamente, ou em associação com o inibidor de deacetilase, Scriptaid, sobre o potencial de reprogramação celular em células somáticas suínas. Foi observada a formação de colônias semelhantes à células-tronco pluripotentes aproximadamente duas semanas após o tratamento com o extrato de oócitos ou extrato de oócitos associado ao Scriptaid. O número de colônias, no dia de aparecimento e 48 horas após esse período, foi semelhante entre as células tratadas somente com o extrato de oócitos ou em associação com Scriptaid. Foi observada ainda a ativação parcial de genes de pluripotência celular e de genes reguladores de modificações de cromatina e de metilação de DNA, como o *Ezh*2 e o *Dnmt*1, três dias após o tratamento com extrato de oócitos. No entanto, 15 dias após o tratamento, esses níveis retornaram aos níveis do controle. Esses dados sugerem que o extrato de oócitos em estádio de VG é capaz de induzir uma reprogramação parcial nos fibroblastos suínos, caracterizada pela indução parcial de pluripotência e modulação de modificadores epigenéticos. Em um segundo estudo, foram caracterizados o co-fator ativador e remodelador de cromatina (BRG1), e a lisina demetilase 1 A (KDM1A), durante o desenvolvimento embrionário de suínos. A KDM1A atua na desmetilação da mono e dimetilação da lisina 4 da histona 3 (H3K4m3 e H3K4me2, respectivamente). Primeiramente, foi verificado que as proteínas desses fatores não estão presentes no núcleo de oócitos no estádio de metáfase II, porém estão presentes no núcleo da maioria dos embriões durante os dias 3-4 do desenvolvimento embrionário, o que coincide com o momento da ativação do genoma embrionário (EGA), na espécie suína. Além disso, utilizando um modelo de alta e baixa competência para o desenvolvimento, foi verificado que a expressão de RNAm desses fatores são regulados durante o desenvolvimento embrionário e estão correlacionados com a expressão de RNAm de outras enzimas demetilases de lisinas e com níveis de metilação da H3K4me e H3K4me2 durante a EGA. Observou-se ainda que os níveis proteicos dos fatores BRG1 e KDM1A parecem ter relação com o numero de células por embrião durante a EGA. Esses dados sugerem que esses fatores podem apresentar um envolvimento na regulação da H3K4 durante a ativação do genoma e consequente no desenvolvimento embrionário.

Palavras chave: Biologia celular, reprogramação celular, suíno, embrião.

ABSTRACT

EPIGENETIC REGULATION IN CELL REPROGRAMMING AND EMBRYO DEVELOPMENT

AUTHOR: Werner Giehl Glanzner
ADVISOR: Paulo Bayard Dias Gonçalves

Epigenetic programming is the main mechanism regulating cell function and gene expression, through the activation or repression of transcriptional activity. In addition, epigenetics is closely related to reproductive events such as cell reprogramming and embryo development. In the first study, the effects of the germinal vesicle (GV) oocyte extract alone, or in combination with the deacetylase inhibitor Scriptaid, on porcine somatic cell reprogramming were evaluated. The formation of stem cell-like colonies were observed approximately two weeks after treatment with oocyte extract or oocyte extract plus Scriptaid. The colony number, at the time of appearance and after 48 hours, was similar between treatments. Partial activation of pluripotent, chromatin modifying and DNA methylating genes such as *Ezh*2 and *Dnmt*1, was observed three days after the oocyte extract treatment. However, the mRNA expression levels of the previous genes were similar to the control 15 days after treatment. This data suggest that GV oocyte extract is able to induce limited reprogramming in porcine fibroblasts, seen here by the partial activation of these genes. In the second study, brahma-related gene-1 (BRG1), a cofactor and activator of chromatin modifications, and lysine demethylase 1A (Kdm1A), a repressor of gene expression, were characterized during porcine embryo development. Kdm1A is involved in the demethylation of both mono- and di-methylations, H3K4me and H3K4me2, respectively, on lysine 4 of histone 3. Firstly, we observed that proteins for both factors (BRG1 and Kdm1A) were absent in the nuclei of metaphase II oocytes, however, the proportion of nuclear localization increased on day 3-4 of embryo development. This time point coincides with the embryonic genome activation (EGA) in swine. Furthermore, using a well-established model of embryo developmental competence, based on time of first cleavage, it was verified that these factors were regulated during embryo development and are correlated with mRNA expression of other demethylases and H3K4me and H3K4me2 levels during EGA. It was also observed that BRG1 and Kdm1A levels are correlated with embryo cell numbers during EGA. These data suggest that BRG1 and Kdm1A participate in the regulation of H3K4 methylation during embryonic genome activation, and consequently, embryo development in swine.

Keywords: Cellular biology, cell reprogramming, swine, embryo.

LISTA DE FIGURAS

ARTIGO 1

Figure 1- Formation of stem cell-like colonies after treatment with oocyte extract. A) porcine fibroblast before treatment. B-C) small cell colonies at the first day of appearance. D) cell colonies at 48 hours after appearance. E) cell colony cultured on feeder cells. F) cell colony stained with DAPI showing several nuclei 48

Figure 2- Transcript levels of genes encoding chromatin-modifying enzymes on days 3 and 14 after fibroblast cell treatment. Experiments were performed in triplicate..... 49

Figure 3- Transcript levels of genes encoding chromatin-modifying enzymes in stem cell-like colonies at days 21 at 28 after treatment..... 50

Figure 4- Expression prolife of genes encoding chromatin-modifying enzymes in fibroblast cells and derived stem cell-like colonies. D3 and D14 = fibroblast cells; D28 = stem cell–like colonies cultured without feeder cells..... 51

ARTIGO 2

Figure 1- A) Nuclear localization of BRG1 and KDM1A in mature metaphase II stage oocytes and IVF embryos ad different stages of development. B) Representative images of metaphase II and embryos stained for BRG1 and KDM1A..... 72

Figure 2- Immunofluorescence signal for BRG1 and KDM1A proteins in days 3-4 and 6-7 of embryo development in IVF and PA embryos. Different letters indicate statistical difference between developmental stages within the same group (IVF or PA)..... 73

Figure 3- Rates of cleavage (A), embryo development (B), and average number of cell nuclei (C) in early- and late-cleaving embryos. Superscripts (* or letters) indicate statistical difference between early- and late-cleaving embryos. ... 74

Figure 4- Transcript levels of Brg1, Kdm1A and H3K4 histone demethylases (Kdm1B, Kdm5A, Kdm5B and Kdm5C) genes in early- and late-cleaving embryos at different stages of development. Different letters indicate statistical differences between groups..... 75

Figure 5- A) Immunofluorescence signal for H3K4me and H3K4me2 in early- and late-cleaving embryos at days 3-4 of development. Different letters indicate statistical difference between early- and late-cleaving embryos. B) Representative images of early- and late-cleaving embryos stained for H3K4me and H3K4me2..... 76

Figure 6- Immunofluorescence signal for BRG1, KDM1A, H3K4me and H3K4me2 in embryos at days 3-4 of development according to the number of cells. Different letters indicate statistical differences between groups..... 77

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 1

Table 1- List of primers used for detection and quantification of gene transcripts 44
Table 2- Development of stem cell-like colonies from fibroblast cells treated with oocyte extracts 45
Table 3- Detection of transcripts for pluripotency genes at different times after treatment of fibroblast cells 46
Table 4 - Detection of transcripts for pluripotency genes in stem cell-like colonies at day 21 after treatment 47

ARTIGO 2

Table 1- List of primers used for detection and quantification of gene transcripts 71

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DNA	ácido desoxirribonucléico
RNA	ácido ribonucleico
SCNT	s*omatic cell nuclear transfer* (clonagem por transferência nuclear)
iPSC	*induced pluripotent stem cells* (células-tronco pluripotentes induzidas)
DMNT	*DNA Metiltransferase* (Grupo de genes que codificam enzimas responsáveis por metilar o DNA)
H3K4me	*methylation on lysine 4 of the histone 3* (a metilação pode ser simples H3K4me, dimetilado H3K4me2 ou trimetilado H3K4me3; associado a ativação transcricional)
H3K9me	*methylation on lysine 9 of the histone 3* (a metilação pode ser simples H3K9me, dimetilado H3K9me2 ou trimetilado H3K9me3; associado a repressão da atividade transcricional)
H3K27me	*methylation on lysine 27 of the histone 3* (a metilação pode ser simples H3K27me, dimetilado H3K27me2 ou trimetilado H3K27me3; associado a repressão da atividade transcricional)
ESC	*embryonic stem cells* (células-tronco embrionárias)
hESC	*human embryonic stem cells* (células-tronco embrionárias humanas)
OKSM	*genes de pluripotência (Oct4, Klf4, Sox2, C-Myc)*
PcG	*policomb group of proteins* (Grupo de proteínas associadas ao aumento dos padrões de metilação da H3K27)
HDACi	*histone deacetylace inhibithor* (inibem as enzimas que deacetilam as histonas; geralmente associado ao aumento da atividade transcricional)
CORFs	*candidate oocyte reprogramming factors* (diversos fatores oriundos dos oócitos responsáveis por modulações da cromatina e regulação da reprogramação)
TZP	*transzonal projection (projeções que atravessam a zona pelúcida penetrando no oócito)*
KDM	lysine demethylase (demetilases dos resíduos de lisina das caudas das histonas; composta por varias enzimas diferentes com atuações em lisinas específicas)
BRG1	bhrama-related gene 1 (co-fator de remodelamento de cromatina)

SWI/SNF	mating-type switching and sucrose non-fermenting (grupo de proteínas com funções no remodelamento da cromatina)
PRC2	policomb repressive complex 2 (grupo de proteínas que formam um complexo responsável pelo aumento nos padrões de metilação da H3K27)
RNAi	*interference RNA* (RNA usado experimentalmente como miRNA para atenuação da transcrição ou tradução proteica)
miRNA	micro RNA (pequeno RNA sintetizado pelo organismo que controla transcrição e tradução proteíca)
TSA	Trichostatin A (uma molécula que atua como inibidor de deacetilase)
MIV	maturação *in vitro*
EGA	*embryonic genome activation* (ativação do genoma embrionário)
FSH	Hormonio folículo estimulante
EED	Embryonic ectoderm development (gene perntencente ao PRC2; regula os padrões de metilação da H3K27)
SUZ12	Supressor of zeste 12 homolog (gene perntencente ao PRC2; regula os padrões de metilação da H3K27)
EZH1	Ehancer of zeste 1 (gene perntencente ao PRC2; regula os padrões de metilação da H3K27)
EZH2	Ehancer of zeste 2 (gene perntencente ao PRC2; regula os padrões de metilação da H3K27)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 12
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 15
2.1. EPIGENÉTICA DA REPROGRAMAÇÃO CELULAR NAS IPSC E SCNT 15
2.2. EPIGENÉTICA NO DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO 20
ARTIGO 1 24
ABSTRACT 26
INTRODUCTION 27
MATERIALS AND METHODS 29
RESULTS 33
DISCUSSION 35
ACKNOWLEDGES 38
REFERENCES 38
AUTHOR DISCLOSURES 42
LIST OF FIGURES 43
ARTIGO 2 52
ABSTRACT 54
INTRODUCTION 55
RESULTS 57
DISCUSSION 59
MATERIAL & METHODS 62
ACKNOWLEDGMENTS 66
REFERENCES 66
LIST OF FIGURES 69
3. DISCUSSÃO 78
4. CONCLUSÃO 82
REFERÊNCIAS 83

1. INTRODUÇÃO

A atuação da epigenética na regulação dos eventos celulares e moleculares vem sendo cada vez mais estudada e compreendida. Com a descoberta do DNA nos anos 50, acreditava-se que grande parte do entendimento acerca do funcionamento celular seria facilmente entendido, no entanto, foi a partir desse ponto em que se começou o estudo da regulação da expressão gênica. Hipóteses começaram a ser levantadas de que algo controlava o DNA e o funcionamento dos genes, e a epigenética passou a ser considerada um ponto chave nesse processo. A epigenética é o conjunto de mecanismos de regulação do funcionamento da ativação gênica. As modificações no DNA e nas proteínas que o circundam são responsáveis pela ativação e repressão dos genes, permitindo que suas informações possam ser utilizadas na expressão e consequente tradução das proteínas que serão responsáveis por todas as modificações nas células e no organismo. Fazendo uma simples busca da palavra *epigenetics* no *pubmed* é possível observar que os trabalhos indexados relacionados a esse termo somam-se 16 no ano de 2000 a mais de 3600 no ano de 2015. No entanto, quando o termo buscado nesse indexador é *epigenetic regulation of gene expression*, o número de citações vai de 14 nos anos 90 para mais de 1500 no ano de 2015. Esses índices de citações mostram que esta área tem se destacado na área da biologia celular, na qual a reprodução está inserida. As interações epigenéticas participam das regulações celulares em diversos níveis. Uma das maiores provas do envolvimento da epigenética nos eventos celulares reprodutivos, seja talvez, a reprogramação celular pela SCNT (transferência nuclear de célula somática) (WILMUT et al., 1997) e também a obtenção das iPSC (células-tronco pluripotentes induzidas) (TAKAHASHI & YAMANAKA, 2006; TAKAHASHI et al., 2007). Nesses momentos, células diferenciadas foram capazes de perder suas memórias epigenéticas e reverter seus padrões de expressão gênica para formação de um novo embrião e para linhagem de células semelhantes à células embrionárias, respectivamente. Outro momento crucial das modulações epigenéticas na área reprodutiva são as alterações nos padrões de metilação que antecedem o momento da ativação do genoma do embrião e início da atividade transcricional (OSTRUP et al., 2013).

As interações epigenéticas que controlam a expressão gênica acontecem principalmente na cromatina, além do DNA propriamente dito. A cromatina é uma unidade repetitiva de DNA e proteínas (KORNBERG, 1974). Essas proteínas (histonas), organizadas na maneira de octâmeros, interagem com as moléculas do DNA formando o nucleossomo

(COSGROVE & WOLBERGER, 2005; VENKATESH & WORKMAN, 2015). As principais histonas que compõe a cromatina são: H2A; H2B; H3; e H4, além de histona H1 que desempenha um papel estrutural. Recentemente, uma série de variantes de histonas têm sido descritas como tendo relação com determinadas atividades durante o desenvolvimento embrionário, fetal ou celular (SANTORO & DULAC, 2015; VENKATESH & WORKMAN, 2015). Dessa forma, além da regulação epigenética pela modificação nos padrões de metilação de DNA e metilação, acetilação e fosforilação nas histonas, também as variantes de histonas parecem alterar a plasticidade e coordenar efeitos celulares. Além disso, as histonas são proteínas bem conservadas, e quando formam o nucleossomo possuem sua região (N)-terminal flexível, constituída por uma cauda de aminoácidos exposta (SANTOS-ROSA & CALDAS, 2005). São nesses aminoácidos da cauda das histonas, chamados resíduos das caudas das histonas, que alterações epigenéticas acontecem, alterações como metilação, acetilação, fosforilação, ubiquitinação, sumolisação, ribosilação entre outras (SANTOS-ROSA & CALDAS, 2005; KOUZARIDES, 2007; LAWRENCE et al., 2016). As mais estudadas em geral são a acetilação e a metilação dos resíduos de histonas. Geralmente, a acetilação, que acontece nas lisinas, está relacionada a um aumento da atividade transcricional (FRY & PETERSON, 2001), enquanto a metilação, nas argininas e lisinas, pode estar relacionada a repressão e/ou ativação gênica, dependendo da região aonde acontece a modificação na histona (CLOOS et al., 2008). As alterações de acetilação resultam em mudança de cargas negativas para positivas, o que reflete em diminuição da interação com as cargas do DNA, modificando a interação da cromatina. Enquanto que as modificações de metilação não resultam em modificações de cargas elétricas, por isso podem tanto reprimir quanto ativar essas funções transcricionais. Inicialmente acreditava-se que essas modificações eram responsáveis diretas pela ativação da transcrição, hoje sabe-se que elas auxiliam através a ligação de co-fatores ou da acessibilidade de proteínas a regiões especificas do DNA (LAWRENCE et al., 2016). Além disso, todo o processo é organizado por uma série de enzimas demetilases, metiltransferase, acetilases entre muitas outras envolvidas no processo de modulações das alterações epigenéticas (KOUZARIDES, 2007). Essas modificações são moduladas conforme a necessidade de ativação e repressão da transcrição e da atividade dos promotores dos genes envolvidos nos processos celulares, que acontecem nas células a todos os momentos.

Outro ponto chave da epigenética são os eventos que estão relacionados ao DNA propriamente dito. Esses referem-se basicamente à metilação do DNA. A metilação do DNA ocorre na citosina (C) antecedida de guaninas (G), ou seja, nos dinucleotídeos CG, chamadas

ilhas CpG, (ROBERTSON & WOLFFE, 2000; JONES & TAKAI, 2001), e acredita- se que essa modificação possua um papel importante na regulação da transcrição, estando frequentemente associada com a repressão da atividade transcricional em mamíferos. A regulação da metilação do DNA se dá pelas enzimas DNA metiltransferases, e embora existam diversas variantes descritas (BESTOR, 2000), elas têm um papel importante no desenvolvimento embrionário e nos oócitos (UYSAL et al., 2015). Nesses processos, algumas DNA metiltransferases têm um papel na manutenção dos níveis de metilação, como a DNMT1, enquanto outras enzimas parecem ter um papel na metilação *de novo* como a DNMT3 e suas variantes DNTM3A e DNMT3B (UYSAL et al., 2015). Além disso, sabe-se que logo após a fertilização, o zigoto perde seus padrões de metilação de DNA que são reestabelecidos durante o período de implantação (REIK et al., 2001) mostrando a importância da regulação desse processo durante os eventos reprodutivos.

De um modo geral, a epigenética está envolvida em todos os processos da biologia celular e principalmente nos processos reprodutivos, controlando os mecanismos de expressão gênica, sejam pelas alterações nos resíduos de histonas ou nos padrões de metilação de DNA. O entendimento desses eventos ajudará a entender cada vez mais os processos que envolvem a reprogramação celular e o desenvolvimento embrionário.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Epigenética da reprogramação celular nas iPSC e SCNT

Células-tronco embrionários foram isoladas com sucesso em camundongos, humanos e primatas (EVANS & KAUFMAN, 1981; THOMSON et al., 1995; THOMSON et al., 1998) e suas possibilidades de terapia celular e estudos de terapia gênica são enormes (KAJI & LEIDEN, 2001; WOBUS & BOHELER, 2005). No entanto, alguns cuidados devem ser tomados no que se refere ao potencial tumorigênico que essas células possuem (HENTZE et al., 2009; SU et al., 2011). Estudos têm demonstrado que inclusive células fetais podem desencadear tumores (AMARIGLIO et al., 2009) aumentando ainda mais esse potencial tumorigênico. Porém, o que torna as ESC tão atraentes do ponto de vista da terapia celular são a sua capacidade de auto-renovação e sua plasticidade (MARTELLO & SMITH, 2014), características que as conferem a qualidade de células-tronco. Desde o surgimento, em 2006, das células-tronco pluripotentes induzidas (iPSC), que são células com características semelhantes as ESC, e que são geradas a partir de células somáticas adultas (TAKAHASHI & YAMANAKA, 2006; TAKAHASHI et al., 2007), a área da medicina regenerativa e terapia celular teve um avanço científico considerável também na área da reprogramação. As iPSC foram primeiramente geradas através da adição de alguns fatores de transcrição (OKSM - Oct4, Kfl4, Sox2 e c-Myc) que são ativados e também ativam os demais fatores de pluripotência responsáveis pela auto-replicação e estado de auto-renovação e manutenção celular. A partir de sua descoberta, as iPSC têm sido células de escolha em estudos de medicina regenerativa e de terapia gênica (ROBINTON & DALEY, 2012; FOX et al., 2014; SINGH et al., 2015). Uma série de vias e alternativas de reprogramação têm sido relatadas como possíveis candidatas a serem usadas na reprogramação; como vetores virais, RNAm, miRNAs, plasmídeos episssosomais e proteínas do oócito (MALIK & RAO, 2013). Embora estudos tenham demonstrado que o padrão de expressão gênica/proteica entre ESC e iPSC seja diferente (CHIN et al., 2009; MARCHETTO et al., 2009), um estudo de meta-análise de quatro estudos, incluindo os dois previamente citados, demonstrou que as inconsistências nas diferenças entre ESC e iPSC em diferentes estudos são enormes (GUENTHER et al., 2010), provavelmente devido às condições de cultivo, método de obtenção de iPSC, tempo de cultivo, análise, passagem do cultivo entre outros. Apesar disso, a reprogramação e geração de iPSC ainda não é totalmente entendida, e métodos sem adição de elementos genéticos

principalmente virais para sua obtenção tornam-se cada vez mais necessários para garantir segurança numa futura terapia celular e uso em medicina regenerativa.

A pluripotência, tanto nas células ESC (BOYER et al., 2005), como nas iPSC (TAKAHASHI & YAMANAKA, 2006), parece ser regulada por uma interligação de fatores de transcrição que atuam em sinergia se auto-regulando. A reprogramação celular e pluripotência são influenciadas também pelos fatores epigenéticos, entre eles, a metilação de DNA, as modificações em resíduos específicos de aminoácidos da cauda das histonas (ARMSTRONG et al., 2006; PASQUE et al., 2011; PAPP & PLATH, 2013). Assim como na SCNT, a reprogramação plena das iPSC não depende somente da ativação dos fatores de transcrição específicos, mas depende também de diversos fatores moduladores de cromatina (JULLIEN et al., 2011; MATTOUT et al., 2011; BIRAN & MESHORER, 2012; KRISHNAKUMAR & BLELLOCH, 2013; PAPP & PLATH, 2013) e consequentemente da modulação nos resíduos de histona e variantes de histonas. Além disso, já foi demonstrado existir um sinergismo entre as proteínas derivadas do oócito e os fatores de pluripotência para a geração de iPSC, culminando com o aumento da eficiência da reprogramação das células somáticas (GANIER et al., 2011). Embora a manipulação dos padrões de metilação do DNA pareça ter um efeito principal no sucesso da reprogramação (PENNAROSSA et al., 2013), somente isso não assegura o remodelamento correto da cromatina no processo de reprogramação. Sendo assim, parece ser necessário um balanço entre os processos de demetilação de DNA e alterações em histonas (DU et al., 2015). Portanto, a manipulação da memória epigenética torna-se uma etapa fundamental no processo de obtenção de iPSC, principalmente porque indícios mostram que a memória epigenética das células de origem é mais difícil de ser removida durante o processo de obtenção de iPSC do que na SCNT (KIM et al., 2010). Dentre as várias alterações de histonas responsáveis pelos efeitos da reprogramação ressaltam-se a trimetilação das lisina 9 e 27 da histona 3, H3K9me3 e H3K27me3, respectivamente. Essas marcações epigenéticas são consideradas barreiras à reprogramação (CHEN et al., 2013b; XIE et al., 2016) estando relacionadas à repressão da transcrição, além de exercer um papel fundamental na memória epigenética durante os eventos de reprogramação por SCNT ou iPSC. Em camundongos, a modulação da demetilase (KDM4D) que atua sobre a H3K9me3 diminuindo o padrão de metilação da lisina 9 da histona 3, resultou em um incremento de aproximadamente 60% nas taxas de desenvolvimento embrionário em embriões produzidos por SCNT (MATOBA et al., 2014). Esse mesmo grupo recentemente publicou um estudo mostrando que a modulação de outro gene dessa família (KDM4A) é capaz de melhor modular a reprogramação de células

humanas para obtenção de linhas de células-tronco (CHUNG et al., 2015). A KDM4B também parece ter um efeito na redução da metilação da lisina 9 da histona 3 favorecendo a SCNT em camundongos (ANTONY et al., 2013). Além disso, outros estudos evidenciaram a participação dessa memória epigenética no bloqueio da diferenciação de células pré-iPSC em células totalmente reprogramadas após a adição exógena de fatores de pluripotência (CHEN et al., 2013b). É sabido ainda que em células-tronco embrionárias de camundongos a KDM4B e KDM4C favorecem a auto-renovação através da modulação do complexo PRC2 (*policomb repressive complex 2*) das proteínas do grupo das policomb, que atuam na modulação do bloqueio e ativação da cromatina (SIMON & KINGSTON, 2009). Esses dados sugerem que a diminuição da memória epigenética pela ação das demetilases especificas da H3K9me é fundamental para o sucesso da reprogramação por SCNT ou iPSC.

Em relação à H3K27me3, seus padrões de metilação recentemente foram relacionados como uma barreira transcricional à reprogramação celular em suínos (XIE et al., 2016). Além disso, sabe-se que a regulação dessa marcação entre hESC e iPSC em relação aos fibroblastos é de quase 70% em relação as regiões promotoras, inversamente proporcional aos aproximadamente 10% de marcação para a H3K4me (marcador de ativação transcricional) em regiões promotoras (GUENTHER et al., 2010). Esses dados sugerem que a repressão transcricional, exercida por essa marcação epigenética se sobressai à marcações de atividade transcricional, como a H3K4me. Dessa forma, a remoção dessa memória epigenética facilitaria a atividade transcricional durante a reprogramação celular. Além disso, as enzimas demetilases que regulam a H3K27me3, como a KDM6A, atuam na reprogramação de células somáticas e germinativas tendo papéis fundamentais na modelação da cromatina (MANSOUR et al., 2012) através da interação com os fatores de pluripotência. Esses dados ressaltam a importância da regulação dessas marcações epigenéticas na interação da reprogramação celular. A H3K27 tem ainda uma atividade importante porque é regulada pelas proteínas do grupo PcG (*policomb group of proteins*) e pelo complexo PRC2. O PcG já foi descrito durante o desenvolvimento embrionário em várias espécies e tem relação direta com as células-tronco embrionárias e o desenvolvimento embrionário (SIMON & KINGSTON, 2009; ALOIA et al., 2013).

Inúmeros componentes do grupo da PcG já foram descritos como EED, EZH1, EZH2, SUZ12, entre outros (MARGUERON & REINBERG, 2011). Entre esses, o EZH1 e o EZH2 parecem ter um efeito central na manutenção da repressão embora sua ação tenha efeitos um pouco contraditórios. O fator EZH2 é uma metiltransferase ativa, no entanto os níveis de metilação exercidos pelo EZH1 parecem ser muito menores (MARGUERON et al., 2008). O

EZH2 tem uma papel de destaque durante a reprogramação celular sendo seus níveis relacionados à eficiência da reprogramação e obtenção de iPSC (RAO et al., 2015). Além disso, esse fator está relacionado aos níveis de metilação da H3K27, mas participa também no recrutamento de DNA metiltransferases que resultam no aumento nos padrões de metilação de DNA (CHEN et al., 2012), que reprimem ainda mais a cromatina. Dentre os mecanismos de regulação que a H3K27 participa, está o mecanismo da cromatina bivalente, que modula as ligações nos resíduos das lisinas 27 e nas lisinas 4 da histona 3. Essa regulação se dá em ambas as lisinas e ocorre simultaneamente, resultando na balanceada e controlada expressão gênica. Esse tipo de controle é observado em células-tronco e no inicio do desenvolvimento embrionário (VASTENHOUW & SCHIER, 2012; HARIKUMAR & MESHORER, 2015). Um estudo publicado recentemente mostrou evidências de que o EZH1, um dos membros relacionados ao PcG que seria uma metiltransferase, supostamente responsável por, em menor grau, adicionar grupos metil na H3K27, poderia interagir com outros fatores pelo mecanismo de cromatina bivalente. Nesse caso, ele interagiria com o SUZ12 e, possivelmente EED, estaria hipermetilando regiões da H3K4 nos promotores das polimerases II (MOUSAVI et al., 2012). Dessa forma, esse fator estaria associado ao favorecimento da atividade transcricional, diferentemente do EZH2 e demais membros do PRC2 e do PcG. No entanto o verdadeiro mecanismo desse fator ainda não está totalmente entendido.

Embora diversos métodos de reprogramação como a SCNT, iPSC e fusão celular com células-tronco estejam disponíveis, o oócito tem tido um papel chave nesse processo justamente devido a seu envolvimento na SCNT. A SCNT já foi realizada em diversas espécies como roedores e animais de laboratório (WAKAYAMA et al., 1998), suínos (ONISHI et al., 2000; POLEJAEVA et al., 2000) e bovinos (CIBELLI et al., 1998). Além disso, sabe-se que obtenção de linhagens de ESC de embriões oriundos de SCNT já foram descritas em camundongos, primatas e humanos (BYRNE et al., 2007; TACHIBANA et al., 2013; QIN et al., 2015). No entanto, os fatores oocitários exatos responsáveis pela reprogramação ainda permanecem desconhecidos. Nesse contexto, o uso de oócitos como fonte de fatores de reprogramação celular vem sendo estudado há alguns anos e por vários grupos (ALBERIO et al., 2005; BUI et al., 2008; MIYAMOTO et al., 2011; BUI et al., 2012; JULLIEN et al., 2014; LIU et al., 2014), no entanto com um foco voltado para a melhora da eficiência da própria SCNT e não da eficiência de obtenção de linhagens de células iPSC reprogramadas. Algumas publicações têm sugerido que os fatores presentes no oócito e que são responsáveis por todo esse remodelamento da cromatina no processo da reprogramação, são capazes de coordenar o momento exato de desligamento e ligamento dos determinados

genes durante o processo de ativação da cromatina (JULLIEN et al., 2011). Estudos de transcriptoma em oócitos humanos e hESC têm demonstrado possíveis candidatos à reprogramação entre esses dois sistemas (KOCABAS et al., 2006), através de fatores que são altamente expressos em ambas as células. Além disso, outros fatores denominados fatores oocitários candidatos à reprogramação (CORFs), como ARID2, ASF1A, ASF1B, DPPA3, ING3, MSL3, H1FOO e KDM6B, têm sido estudados, os quais parecem atuar na remodelação da cromatina, ativação e repressão da metilação e acetilação e ativação da expressão gênica (AWE & BYRNE, 2013). Entre esses fatores destaca-se o H1FOO que tem atuação na descondensação da cromatina e manutenção da cromatina em células tronco-embrionárias de camundongos (HAYAKAWA et al., 2012) e no desenvolvimento embrionário (MCGRAW et al., 2006). Além disso, o gene ASF1A quando atenuado através de RNAi em células-tronco embrionárias de camundongos é capaz de diminuir a acetilacão da H3K56Ac, o que reduz a interação com os promotores dos genes de pluripotência reduzindo sua expressão e induzindo a expressão de genes de diferenciação, inibindo a manutenção da indiferenciação (TAN et al., 2013). Essas evidências mostram como um fator oocitário é capaz de modular uma modificação epigenética promovendo ou inibindo a reprogramação e o grau de diferenciação celular. Sendo assim, a interação e função desses fatores parecem estar intimamente relacionadas. A memória epigenética é a passagem da informação, via padrões de metilação de DNA, modificações de histonas e em menor grau micro-RNAs (MIGICOVSKY & KOVALCHUK, 2011) da célula de origem para o embrião ou a célula reprogramada. Nesse contexto, o oócito parece ter um enorme potencial na remoção da memória epigenética (KIM et al., 2010) durante a reprogramação. Apesar desse potencial do oócito, ainda não se sabe se esses fatores dependem da integridade da conformação do oócito, ou se estão em menores quantidades dentro desse, inviabilizando a reprogramação em grande escala quando utilizado citoplasma de um oócito para mais de uma célula.

A reprogramação celular através da clonagem por transferência nuclear tem demostrado que a associação com inibidores de deacetilases (HDACi), como o TSA e o Scriptaid, melhora a eficiência da reprogramação em varias espécies animais como suínos (ZHAO et al., 2009; XU et al., 2013), bovinos (WANG et al., 2011), ovinos (WEN et al., 2014), roedores (VAN THUAN et al., 2009) e coelhos (CHEN et al., 2013a), além de aumentar consideravelmente o número de reclonagens na SCNT (WAKAYAMA et al., 2013). Os inibidores de deacetilases atuam aumentando a acetilação, aumentando a carga negativa das histonas, diminuindo sua interação com o DNA, carregado negativamente, que acaba consequentemente, implicando em afrouxamento da cromatina com aumento da atividade

transcricional (BANNISTER & KOUZARIDES, 2011). Embora estudos comprovem que o inibidores de deacetilase tenham um efeito benéfico sobre a eficiência, com maiores taxas de desenvolvimento embrionário ou embriões de melhor qualidade, na SCNT ainda não se sabe o quanto eles contribuem para a perda da memória epigenética. Estudos são necessários para se comprovar como de fato essas moléculas atuam no processo de perda da memória epigenética. Não se sabe ao certo se os padrões de acetilação que essas moléculas induzem são capazes de induzir diretamente as enzimas capazes de remover as marcações epigenéticas responsáveis pela memória epigenética como a H3K27me3 ou H3K9me3 ou as removem diretamente, desta forma, favorecendo a reprogramação.

2.2. Epigenética no desenvolvimento embrionário

A competência do oócito refere-se ao seu potencial para o subsequente desenvolvimento embrionário. Uma série de variáveis têm sido descritas como possíveis candidatos a interferir na competência do oócito como o ambiente folicular, a idade do oócito, a comunicação celular entre as células foliculares (oócito-cumulus; cumulus-granulosa), estresse oxidativo, nutrição, fatores de crescimento, entre outros (FAIR, 2010; DUMESIC et al., 2015; KEEFE et al., 2015; MOUSSA et al., 2015). O tamanho folicular tem uma relação com a maturação oocitária em várias espécies (LONERGAN et al., 1994; ALGRIANY et al., 2004; BAGG et al., 2007). Em leitoas pré-púberes as concentrações de progesterona aumentam conforme o folículo aumenta, fato não observado para o estradiol. No entanto, para porcas adultas, esse aumento da progesterona não é observado. Da mesma forma, em leitoas é observado um aumento da competência oocitária conforme o aumento do folículo, o que não é observado em animais adultos (BAGG et al., 2007). Além disso, sabe-se que o líquido folicular é rico em uma série de fatores como proteínas, RNAms, miRNAs, além de vesículas contendo esses fatores que podem estar envolvidos nos mecanismos de competência (DA SILVEIRA et al., 2012). Esses fatores parecem ter um efeito importante inclusive durante a maturação, uma vez que, em suínos uma prática comum é usar liquido folicular durante a MIV (maturação *in vitro*) de oócitos. Uma vez que os fatores responsáveis pela competência oocitária e subsequente desenvolvimento embrionário ainda não são entendidos, talvez a análise de transcriptomas em vários casos e modelos de desenvolvimento possam elucidar os mecanismos relacionados à competência e desenvolvimento (LABRECQUE & SIRARD, 2014).

Recentemente, uma série de estudos, em roedores, tem proposto novas explicações para como a comunicação entre as células foliculares funcionam durante a aquisição da competência oocitária. Neste contexto, foi demonstrado que o FSH é capaz de promover a expressão das principais conexinas e caderinas responsáveis pelas conexões celulares nas ligações entre as células do cumulus e granulosa e oócito através das TZP, que são as ligações transzonais que atravessam as células da granulosa e o oócito (EL-HAYEK & CLARKE, 2015). Além disso, estudos ainda mais recentes têm evidenciado que moléculas de RNA têm sido enviadas para o oócito através destas projeções (MACAULAY et al., 2014). Uma publicação do final de 2015 mostrou ainda que durante o período de reinício da meiose há um tráfico intenso e troca de RNAm entre o oócito e as células adjacentes do cumulus, e que isso pode ser determinante nos níveis de proteínas no momento da fertilização, afetando os índices de fertilidade devido ao potencial desses transcritos serem traduzidos (MACAULAY et al., 2015).

O potencial de desenvolvimento tem sido relacionado com o tempo da primeira clivagem embrionária em diversas espécies, como camundongos (KOBAYASHI et al., 2004), suínos (COUTINHO et al., 2011; BOHRER et al., 2015), bovinos (HENRIQUE BARRETA et al., 2012) e humanos (BOS-MIKICH et al., 2001). Além disso, embriões com maior potencial de desenvolvimento, ou seja, que clivam mais cedo, apresentam maior número de células e menor lesão de DNA (BOHRER et al., 2015). Desta forma, embriões com maior potencial são embriões que desenvolvem mais cedo, desenvolvendo portanto, embriões com mais qualidade. No entanto, existem evidências que sugerem que embriões que clivam mais tarde poderiam apresentar uma atividade transcricional prematura (BASTOS et al., 2008). Um ponto chave no processo do desenvolvimento embrionário é a transição materno-zigótica (LEE et al., 2014), muitas vezes relacionada à parada de crescimento embrionário. Durante esse período, uma série de modificações epigenéticas devem acontecer, as quais precedem o início da atividade transcricional. Dentre elas, ocorrem principalmente a redução nos níveis de H3K27me3 e H3K9me3, aumento nos padrões de metilação da H3K4 e aumento da atividade das polimerases (OSTRUP et al., 2013). Em suínos a ativação do genoma coincide com o estágio de 4 a 8 células do desenvolvimento embrionário (HYTTEL et al., 2000; CAO et al., 2014), o que antecede um pouco em relação à outras espécies como o bovino, no qual a ativação do genoma ocorre no período de transição de 8 a 16 células (TELFORD et al., 1990). A ativação do genoma parece ocorrer em formato de ondas de ativação gênica (HAMATANI et al., 2004). A primeira onda de ativação seria correspondente a ativação do genoma

propriamente dita. Logo seguem sucessivas ondas de ativação e inativação de genes específicos para cada fase do desenvolvimento embrionário.

O desenvolvimento embrionário inicial depende de uma sequência de modificações na configuração da cromatina, as quais são primariamente relacionadas a um papel chave da modulação epigenética, como mudança nos padrões de acetilação e metilação de histonas e a metilação do DNA genômico (BAO et al., 2000; REIK et al., 2001; BULTMAN et al., 2006; NIEMANN et al., 2008). Como citado anteriormente, uma das principais modificações relacionadas à atividade transcricional e que parece ter um papel importante nesse início do desenvolvimento embrionário são os padrões de metilação da lisina 4 da histona 3. O perfil da mono, di- e a trimetilação já foram descritos no ovário suíno ao longo do desenvolvimento desde o folículo pré-antral até o folículo pré-ovulatório (SENEDA et al., 2008). Algumas proteínas estão estritamente relacionadas com os padrões de metilação da H3K4 . Entre esses, destaca-se a KDM1A e o BRG1.

A KDM1A é uma demetilase especifica da mono e da dimetilação da lisina 4 da histona 3, atuando também na H3K9 (WANG et al., 2009). A KDM1A é um repressor da atividade transcricional (demetilase) componente de um complexo, chamado CtBP (C-terminal binding protein complex), complexo esse envolvido na regulação da atividade gênica pela ativação ou repressão da expressão (SHI et al., 2004; WANG et al., 2007). Deleções no gene da KDM1A resultam também em níveis reduzidos de metilação de DNA e atividade reduzida de DNMT1 (WANG et al., 2009). Experimentos que estimularam esse fator em células espermatogoniais de camundongos observaram padrões alterados de herança epigenética caracterizado por padrões de expressão errônea nos fetos e mal formação nos esqueletos durante o desenvolvimento fetal, bem como morte fetal (SIKLENKA et al., 2015), mostrando sérias correlações desses fatores com o desenvolvimento embrionário e consequentemente fetal. Além disso, experimentos de perda de função gênica demonstraram que esse gene tem um efeito vital também no período pós-implantacional, ao redor do dia 6.5 de desenvolvimento embrionário (E6.5) em camundongos (FOSTER et al., 2010). Adicionalmente, o *knockout* homozigótico desse gene em camundongos revelou que os embriões não são capazes de se desenvolver além do E7.5 (WANG et al., 2007). Esses dados corroboram os dados sobre a importância desse gene na formação e desenvolvimento fetal. Dados ainda evidenciam um papel da KDM1A durante o início do desenvolvimento embrionário, mais precisamente durante a ativação do genoma embrionário, onde, em camundongos a utilização de um inibidor da KDM1A em embriões antes da clivagem, afetou a cinética de desenvolvimento dos embriões até 4 células e afetou os níveis de RNAm de Oct4

nesses mesmos embriões (SHAO et al., 2008). Esses dados demonstram que esse fator tem um papel chave nas modulações dos padrões de metilação, principalmente da H3K4 no início e durante o desenvolvimento embrionário. Embora a KMD1A tenha esse papel importante já comprovado no desenvolvimento embrionário e fetal, várias outras demetilases participam no processo de demetilacão dos padrões da H3K4 como a KDM1B, KDM5A, KDM5B, KDM5C e KDM5D (CHRISTENSEN et al., 2007; IWASE et al., 2007; LEE et al., 2007; CICCONE et al., 2009). Embora ainda não se saiba o papel de cada uma individualmente durante o desenvolvimento embrionário, na reprogramação celular ou nas células-tronco, baseado em suas funções é possível sugerir que devam exercer um papel de regulação importantíssimo. Além disso algumas dessas demetilases, como é o caso da KDM1B, parece ter um efeito mais importante no *imprinting* materno, a nível de DNA, do que de histonas propriamente ditas (CICCONE et al., 2009).

Existem outros fatores cruciais que modulam o início da atividade transcricional do embrião, entre eles, o BRG1 (BULTMAN et al., 2006). Durante o desenvolvimento embrionário, esse fator parece ser ligado à cromatina materna, uma vez que experimentos demonstraram que BRG1 materno nocaute em embriões fertilizados foram capazes de parar os embriões nos estágios de 2 ou 4 células (BULTMAN et al., 2006). Durante o desenvolvimento embrionário e posteriormente fetal, esse fator parece estar envolvido na determinação das linhagens germinativas, como a mesodermal (ALEXANDER et al., 2015). Esse gene também parece ter uma papel regulador sobre a expressão de genes de pluripotência, como o Nanog, durante o desenvolvimento embrionário e também em células-tronco embrionárias (CAREY et al., 2015). Um trabalho publicado recentemente demonstrou que em células-tronco embrionárias humanas, a atenuação do BRG1, através de RNAi, é capaz de diminuir os níveis de auto-renovação e diferenciação dessas células nas mais diversas linhagens germinativas, e que isso estaria relacionado aos níveis de acetilação da H3K27 que estariam sendo regulados por esse fator (ZHANG et al., 2014). O BRG1 é um fator remodelador da cromatina, e uma unidade catalítica do complexo SWI/SNF que se liga a regiões de promotoras de genes específicos promovendo alterações e modificações epigenéticas. O BRG1 pode ser encontrado também ligado a fatores de transcrição e ouras enzimas modificadores de histona para ativar ou reprimir promotores (GLAROS et al., 2008; TROTTER & ARCHER, 2008).

ARTIGO 1

TRABALHO ACEITO PARA PUBLICAÇÃO:

Exposure of somatic cells to cytoplasm extracts of porcine oocyte induces stem cell-like colony formation and alters expression of pluripotency and chromatin-modifying genes

Werner Giehl Glanzner, Eliza Rossi Komninou, Ashwini Mahendran, Vitor Braga Rissi, Karina Gutierrez, Rodrigo Camponogara Bohrer, Tiago Vieira Colares, Paulo Bayard Dias Gonçalves, Vilceu Bordignon.

CELLULAR REPROGRAMMING, 2016

Exposure of somatic cells to cytoplasm extracts of porcine oocytes induces stem cell-like colony formation and alters expression of pluripotency and chromatin-modifying genes

Glanzner, W.G.[1a]; Komninou, E.R.[1b]; Mahendran, A.[c]; Rissi, V.B.[a]; Gutierrez K.[c], Bohrer, R.C.[c]; Collares, T.[b]; Gonçalves, P.B.D.[a]; Bordignon, V.[c]*

[a]*Laboratory of Biotechnology and Animal Reproduction - BioRep, Federal University of Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, Brazil.*

[b]*Laboratory of Molecular Embryology and Transgenesis, Technology Development Center, Postgraduate Program in Biotechnology, Federal University of Pelotas (UFPEL), Pelotas, RS, Brazil.*

[c]*Department of Animal Science, McGill University, Ste-Anne-De-Bellevue, QC, Canada.*

**Corresponding author.* Vilceu Bordignon: Department of Animal Science, McGill University, 21111, Lakeshore road, Room MS1-089, Sainte-Anne-de-Bellevue, QC, Canada, H9X3V9. Email: vilceu.bordignon@mcgill.ca

[1]These authors contributed equally to this work.

Running Title: Cell reprogramming with oocyte extracts

Key words: cell reprogramming, pluripotency, oocyte extract, scriptaid, swine.

ABSTRACT

Cell permeabilization followed by exposure to cytoplasmic extracts of oocytes has been proposed as an alternative to transduction of transcription factors for inducing pluripotency in cultured somatic cells. The main goal in this study was to investigate the effect of treating porcine fibroblast cells with cytoplasmic extracts of GV-stage oocyte (OEx) followed by inhibition of histone deacetylases with Scriptaid (Scrip) on the formation of stem cell-like colonies and expression of genes encoding pluripotency and chromatin-modifying enzymes. Stem cell-like colonies start developing approximately 2 weeks after treatment in cells exposed to OEx or OEx + Scrip. The number of cell colonies at the first day of appearance and 48 h later was also similar between OEx and OEx + Scrip treatments. Transcripts for *Nanog*, *Rex*1 and c-*Myc* genes were detected in most cell samples analyzed at different days after OEx treatment. However, Sox2 transcripts were not detected and only a small proportion of samples had detectable levels of *Oct*4 mRNA after OEx treatment. Similar pattern of transcripts for pluripotency genes was observed in cells treated with OEx alone or OEx + Scrip. Transcript levels for *Dnmt*1 and *Ezh*2 were reduced at day 3 after treatment in cells exposed to OEx. These findings revealed that: a) exposure to OEx can induce a partial reprogramming of fibroblast cells towards pluripotency, characterized by colony formation and activation of pluripotency genes; and b) inhibition of histone deacetylases did not improve the reprogramming effect of OEx treatment.

INTRODUCTION

Since first isolated and cultured in mice (Evans and Kaufman, 1981), non-human primates (Thomson et al., 1995) and humans (Thomson et al., 1998), embryonic stem cells (ESC) have been the subject of numerous studies given their promise for developing novel cell-based therapies (Kaji and Leiden, 2001; Wobus and Boheler, 2005). Important characteristics of ESC for development of cell therapies include their plasticity for differentiation and self-renewal capacity (Martello and Smith, 2014).

More recently, induced pluripotent stem cells (iPSCs) having similar characteristics of ESC have been created from somatic cells (Takahashi et al., 2007; Takahashi and Yamanaka, 2006). Since they can be established from many different cell types of any patient through the expression of a few transcription factors, iPSCs have emerged as the preferred cells for development and applications in cell/tissue regenerative therapies (Fox et al., 2014; Robinton and Daley, 2012; Singh et al., 2015). Pluripotency seems to be similarly regulated by a small core group of transcription factors in ESC (Boyer et al., 2005), and iPSCs (Takahashi and Yamanaka, 2006). Cell reprogramming and pluripotency are also affected by epigenetic factors including DNA methylation and modifications in specific amino acid residues in the histone tails (Armstrong et al., 2006; Papp and Plath, 2013; Pasque et al., 2011). Among the histone modifications, the methylation pattern of the lysine 27 in the histone H3 (H3K27me) is known to play an important role. Indeed, H3K27me is an important constraint for cell reprogramming (Xie et al., 2016), and its pattern varies significantly between iPSCs and ESC compared to fibroblast cells (Guenther et al., 2010; Mansour et al., 2012). This epigenetic mark is mainly regulated by the polycomb group of proteins (PCG) (Aloia et al., 2013; Simon and Kingston, 2009), which are also involved in the reprogramming process.

Different approaches, including nuclear transfer to enucleated oocytes, cell fusion and transduction of transcription factors, have been used to induce somatic cell reprograming.

Nuclear transfer to enucleate oocytes can reprogram differentiated somatic cells to a totipotent state, since cloned animals of many species have been created using this approach (Meissner and Jaenisch, 2006). However, ESCs from nuclear transfer embryos have only been established in few species including mice, non-human primates and humans (Byrne et al., 2007; Qin et al., 2015; Tachibana et al., 2013). In order to facilitate reprogramming and the establishment of pluripotent cell cultures, exposure of cultured somatic cells to cytoplasm extracts of oocytes after cell membrane permeabilization has been proposed. In this regard, studies have been conducted using cytoplasm extracts of oocytes from different species, including Xenopus leavis (Alberio et al., 2005; Miyamoto et al., 2007; Miyamoto et al., 2008), pigs (Bui et al., 2012; Miyamoto et al., 2009) and mice (Bui et al., 2008). However, the reprogramming efficacy of cytoplasm extracts to induce cell pluripotency *in vitro* requires additional investigation.

Studies using somatic cell nuclear transfer (SCNT) have also demonstrated that inhibition of histone deacetylase enzymes after nuclear transfer enhances cell reprogramming and ameliorate animal cloning efficiency in different species including mice (Kishigami et al., 2006; Van Thuan et al., 2009), pigs (Martinez-Diaz et al., 2010; Xu et al., 2013; Zhao et al., 2009), bovine (Akagi et al., 2011; Wang et al., 2011), ovine (Wen et al., 2014) and rabbits (Chen et al., 2013a).

In light of those previous findings we hypothesized that inhibition of deacetylase enzymes after exposure to cytoplasm extracts of GV-stage oocytes would improve cell reprogramming efficiency in cultured somatic cells to a pluripotent state without the need of performing nuclear transfer or transduction of transcription factors. Therefore, the objectives of this study were to evaluate if treatment of fibroblasts cells with cytoplasmic extracts of porcine oocytes followed by inhibition of histone deacetylase enzymes would improve the

formation of stem cell-like colonies and expression of genes involved in cell reprogramming and pluripotency.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals

All chemicals and reagents were purchased from Sigma Aldrich Chemical Company (Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada), unless otherwise indicated.

Ovaries and oocyte collection

Ovaries of prepubertal gilts were collected at a local slaughterhouse (Olymel S.E.C./L.P., Saint-Esprit, QC, Canada) and transported to the laboratory at 30 to 35˚C in saline solution (0.9% NaCl) containing penicillin (100 UI/ml) and streptomycin (10 mg/ml). Cumulus-oocyte complexes (COCs) were aspirated from 3 to 6 mm follicles using a 10 mL syringe and 18-gauge needle. COCs surrounded by a minimum of three cumulus cells layers and having a homogeneous granulated cytoplasm were selected for the preparation of cytoplasm extracts.

Cell culture

Fibroblast cell cultures were established from skin biopsies collected from newborn Yucatan minipigs. Tissues were cut in small pieces (1x1 mm) using a scalpel blade and digested in 1 mg/ml collagenase for 20 minutes at 37˚C. Cells were washed twice in Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Nutrient Mixture F-12 Ham (DMEM-F12) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS; Life Technologies) and 1% antibiotics (Penicillin 10.000 U/ml and Streptomycin 10 mg/ml). Cells were then transferred to 75 mm^2

124 flasks and cultured in the same medium at 38.5° C and 5% CO_2. All the experiments were
125 conducted using a pool of fibroblast cells from 5 different animals.
126
127 *Preparation of oocyte extracts*
128 Cytoplasm extracts of GV-stage oocytes were prepared within 2 h after follicular
129 aspiration. Approximately 800 oocytes were stripped from their cumulus cells and had their
130 zona pelucida dissolved using acidic Tyrode's solution. The zone-free oocytes were washed
131 three times and transferred to approximately 10 µl of undifferentiated cell culture media
132 (UCM) supplemented with an energetic cocktail composed of 1 mM ATP, 10 mM creatine
133 phosphate, 25 µg/ml creatine kinase, 100 µM GTP and the protease inhibitor mixture (104
134 mM AEBSF, 80 µM Aprotinin, 4 mM Bestatin, 1.4 mM E-64, 2 mM Leupeptin and 1.5 mM
135 Pepstatin A). The UCM consisted of DMEM F12 supplemented with 10% knockout serum
136 replacement (KSR), 5% FBS, 0.3 µM nucleosides, 1% non-essential amino acids, 150 µM 2-
137 mercaptoethanol, 10 ng/mL leukemia inhibitory factor and 1% antibiotics (Penicillin 10.000
138 U/ml and Streptomycin 10 mg/ml). To prepare the extract, oocytes were aspirated several
139 times through a micropipette with internal diameter of approximately 70 µm to ensure that the
140 ooplasmic membrane of all the oocytes was fragmented.
141
142 *Cell permeabilization, treatment and culture*
143 To open small pores in the cell membrane for passage of oocyte proteins, 8,000 cells
144 were exposed to 3 electrical pulses of 1000 V for 30 µs each using the Neon® transfection
145 system (Invitrogen). After electroporation, cells were divided in 4 treatments (approximately
146 2,000 per treatment) and cultured as follows: a) in UCM supplemented with the energetic
147 cocktail (Control group); b) same as control group plus 500 nM Scriptaid (Scrip group); c) in
148 10-15 µl of the oocyte extract (in a ratio of approximately 10 cells per oocyte) for 45 minutes,

149 and then in UCM supplemented with the energetic cocktail (OEx group); and d) same as OEx
150 group plus 500 nM Scriptaid (OEx + Scrip group). In all treatments, the cell culture media
151 was replaced after 20 h of culture and then every 72 h with UCM. Cells from each treatment
152 were trypsinezed and collected at days 7, 14, 21 and 28 of culture to assess mRNA expression
153 of pluripotency genes. Cells collected at days 3 and 14 were used to quantify mRNA levels of
154 chromatin-modifying genes.
155
156 *Preparation of feeder cell layers and cell colony passage*
157 Mouse embryonic fibroblasts (MEFs) were used as feeder layer cells. MEFs were
158 cultured in DMEM F12 supplemented with 10% FBS and 1% antibiotics until reaching
159 confluence. MEFs were then treated with 10 μg/ml mitomicin C for 2 h, washed twice with
160 PBS, trypsinezed, and then plated onto 0.1% gelatin-coated 6-weel plates with >90%
161 confluency. Cell colonies that developed from OEx and OEx + Scrip treated fibroblasts were
162 mechanically passed and cultured in the presence or absence of feeder cells for 7 and 14 days,
163 which represents in average day 21 and 28 after cell treatment, respectively. Cells colonies
164 from each treatment were collected at days 21 and 28, and used to quantify transcript levels of
165 pluripotency and chromatin-modifying genes.
166
167 *Cell colony evaluation*
168 Fibroblasts cells were inspected every day, from day 1 after treatment to 48 h after
169 appearance of the stem cell-like colonies, by visual observation in a microscope. The number
170 of the days for the colony formation, the number of colonies at day of appearance and the
171 number of colonies 48h after that, were evaluated in 6 replicates.
172
173 *RNA extraction and qRT-PCR*

Total RNA was extracted from fibroblasts and derived cell colonies using Trizol (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. RNA quantity and purity were estimated using a NanoDrop spectrophotometer (Thermo Scientific, Waltham, USA). Absorbance 260/280 nm ratios above 1.8 were considered pure. Total RNA was treated with 0.1 U DNase (Invitrogen) at 37°C for 5 minutes to digest contaminating DNA. Reverse transcriptase reactions were performed with 500 ng RNA using the iScript cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad, Mississauga, ON, CA) in a final volume of 20 µl according to the manufacturer's protocol.

Real-time quantitative PCR (qPCR) reactions were performed in a CFX 384 real-time PCR detection system (BioRad) using iQ^{TM} SYBR Green Supermix (BioRad). Primers were designed based on swine sequences available in GenBank (Table 1) and synthesized by IDT (Windsor, ON, CA). Samples were run in duplicates and the standard curve method was used to determine the abundance of mRNA for each gene, and mRNA abundance was normalized to the mean abundance of the internal control genes *Beta actin* and *Gapdh*. All reactions had efficiencies between 90 and 110%, $r^2 \geq 0.98$ and slope values from -3.6 to -3.1. Dissociation curve analyses were performed to validate the specificity of the amplification products. For the experiments where only the presence or absence of transcripts were evaluated, PCR products were submitted to electrophoresis using 2% agarose gel and visualized after stained with ethidium bromide.

Statistical analyses

Data regarding number of colonies at the time of appearance and 48 h later were analyzed by ANOVA followed by *t test*. Differences in transcript levels were analyzed by multi-comparison test using LSMeans Student *t test*. Data were tested for normal distribution using Shapiro-Wilk test and normalized when necessary. Results are presented as means ±

199 SEM, and P<0.05 was considered statistically significant. All analyses were performed using
200 the JMP software (SAS institute Inc., Cary, NC). At least three individual replicates were
201 conducted for each experiment.
202
203 **RESULTS**
204 *Stem cell-like colonies appearance after fibroblast cell treatment*
205 Treatment of porcine fibroblasts with OEx from GV-stage oocytes induced the
206 formation of cell colonies that morphologically resemble embryonic or induced stem cell
207 colonies (Fig. 1B-F). The stem cell-like colonies started to form between 13 and 22 days after
208 treatment (Table 2). The exposure of cells to Scrip for 20 h after treatment with OEx did not
209 reduce the time to colony formation. Similar number of stem cell-like colonies was counted at
210 the day of appearance or 48 h later in cells that were treated with OEx alone or OEx + Scrip.
211 There was a significant increase in the number of stem cell-like colonies during the first 48 h
212 after appearance, but it was not affected by Scrip treatment (Table 2). Control (non-treated)
213 cells and those treated with Scrip alone, without previous exposure to OEx, did not form stem
214 cell-like colonies.
215
216 *Expression of pluripotency genes after cell treatment*
217 In order to evaluate if the exposure to OEx induce expression of pluripotency genes,
218 cDNA was generated from cells collected at days 7, 14, 21 and 28 after treatment. Presence or
219 absence of transcripts for pluripotency genes was assessed by PCR from cell samples of three
220 different replicates (Table 3). Transcripts for pluripotency genes were detected in higher
221 proportion of cell samples treated with OEx alone or with OEx + Scrip compared to control
222 and Scrip alone treatments. Indeed, c-*Myc*, *Rex*1 and *Nanog* mRNA was detected in most of
223 the samples treated with OEx. On the other hand, transcripts for *Oct*4 and *Sox*2 were only

224 detected in a small proportion of cell colonies, indicating that either OEx or OEx + Scrip
225 treatments were unable to induce transcription of these genes. The association of OEx and
226 Scrip did not increase the number of samples expressing pluripotency genes compared to
227 treatment with OEx alone.

228 Analyses of individual stem cell-like colonies collected at day 21 after treatment
229 further confirmed the c-*Myc*, *Rex*1 and *Nanog* were expressed in cell colonies but *Oct*4 and
230 *Sox*2 gene were not expressed (Table 4). Similar proportion of colonies expressing
231 pluripotency genes were detected in cells treated with OEx alone or OEx + Scrip.

232

233 *Expression of genes encoding chromatin-modifying enzymes after cell treatment*

234 To further evaluate the effects of OEx treatment the transcript levels of genes
235 encoding chromatin-modifying enzymes were evaluated in fibroblasts cells at day 3 and 14
236 after treatment and in stem cell-like colonies at day 21 and 28 after treatment. The relative
237 mRNA levels of DNA methyltransferase1 (*Dnmt*1), policomb group (PCG) proteins (*Ezh*1,
238 *Ezh*2 and *Suz*12) and lysine demethylases (*Kdm*6A and *Kdm*6B), which act in the
239 demethylation of the H3K27me, were quantified by qPCR.

240 At day 3 after treatment, mRNA abundance of *Dnmt*1, *Ezh*1, and *Ezh*2 was
241 significantly lower in cells treated with OEx compared to control cells (Fig. 2). In cells treated
242 with OEx + Scrip, only *Ezh*1 mRNA levels were lower than control cells at day 3 after
243 treatment. *Ezh*1 mRNA abundance was also lower in cells treated with Scrip alone compared
244 to control cells at day 3 after treatment. Transcript levels of *Kdm*6A, *Kdm*6B and *Suz12* were
245 not affected by the treatments. Transcript levels for all the evaluated genes were similar in
246 control and treated cells at day 14 after treatment (Fig 2).

247 Since the exposure to Scriptaid did not enhance expression of genes encoding
248 pluripotency factor and chromatin-modifying enzymes, stem cell-like colonies derived from

cells treated with OEx were used to evaluate the effect of culture in the presence or absence of feeder cells. Transcript levels of the six genes analyzed were not different between stem cell-like colonies cultured for 7 days in the presence or absence of MEFs, which represents approximately 21 days from treatment with OEx (Fig 3). After 2 weeks of culture, or approximately 28 days from OEx treatment, mRNA levels of the six genes remained similar between stem cell-like colonies, except for *Ezh*2, which was decreased in the colonies cultured on MEFs (Fig 3).

The temporal analysis of transcript levels of the six genes in cells treated with OEx revealed a significant increase in mRNA levels of *Dnmt*1 and *Ezh*2 (Fig 4A). Variation in transcript levels of all the other genes was not statistically different at the different times of culture (Fig 4B).

DISCUSSION

This study was conceived to investigate if pluripotency could be induced by treating *in vitro* cultured fibroblasts cells with cytoplasm extracts from porcine oocytes, followed by inhibition of histone deacetylase enzymes. Our findings revealed that exposure to oocyte cytoplasm extracts induce cell colony formation resembling stem cell colonies within approximately 2 weeks after treatment. We have also observed that exposure to Scriptaid, an inhibitor of histone deacetylase enzymes known to enhance nuclear reprogramming and development of embryos derived by SCNT, did not improve stem cell-like colonies formation compared to treatment with oocyte extract alone.

Findings in this study are in line with previous reports, which have shown that pre-treatment of somatic cells with OEx increased development of SCNT embryos (Bui et al., 2012; Bui et al., 2008; Liu et al., 2012) and generation of iPSCs cells (Ganier et al., 2011). However, the effect of treating cells with OEx followed by inhibition of histone deacetylases

274 was not previously investigated. Surprisingly, despite of its known effects in enhancing cell
275 reprograming and development of SCNT embryos (Chen et al., 2013a; Van Thuan et al.,
276 2009; Wakayama et al., 2013; Wang et al., 2011; Wen et al., 2014; Xu et al., 2013), treatment
277 with Scriptaid did not improve stem cell-like colony formation in cultured fibroblast cells
278 after treatment with OEx. This suggests that the positive effect of Scriptaid in promoting cell
279 reprogramming depends on factors present in an intact oocyte cytoplasm that are either lost,
280 overdiluted or do not gain access to the cell chromatin during *in vitro* treatment with OEx.
281 Indeed, the ratio of oocyte to cells in this study was 1:10, which reduces the amount of extract
282 available to each cell compared to the 1:1 ration in SCNT embryos. Nevertheless, it has been
283 shown that not only amphibian but also porcine oocytes are able to induce reprogramming in
284 hundreds of somatic cell nuclei (Byrne et al., 2003; Halley-Stott et al., 2010; Jullien et al.,
285 2010; Jullien et al., 2014; Miyamoto et al., 2011). The meiotic stage (GV-stage) of oocytes
286 used in the study may be another reason accounting for the lack of Scriptaid effect compared
287 to SCNT studies. In support to this are recent findings indicating that Scriptaid effects on
288 SCNT embryos depend on interactions between the cell cycle stage of the nuclear donor cell
289 and the host cytoplast (Rissi et al., 2016).

290 To further evaluate the effects of OEx on cell reprograming, mRNA levels of genes
291 encoding transcription factors involved in cell pluripotency were assessed at different days
292 after cell treatment. We observed that treatment with OEx activated expression of three
293 transcriptions factors, *Nanog*, *Rex*1 and c-*Myc*, in most cells samples, while two others, *Oct*4
294 and *Sox*2, were only detected in few cell samples. Similarly to what we observed for colony
295 formation, treatment with Scriptaid did not benefit expression of transcript factors compared
296 to treatment with OEx alone. *Nanog*, together with *Oct*4 and *Sox*2 are known to regulate
297 stemness-related genes (Boyer et al., 2005; Pan and Thomson, 2007), and are important for
298 ESC self-renewal (Gagliardi et al., 2013). *Nanog* expression is regulated by several factors

299 including the PcG protein *Ezh*2 (Villasante et al., 2011), which also interacts with c-*Myc*
300 during cell reprogramming and affect expression of developmental genes in ESC (Krepelova
301 et al., 2014; Neri et al., 2012; Rao et al., 2015). Similarly, *Rex*-1 is important for acquisition
302 and maintenance of pluripotency (Son et al., 2013), and may also interact with PcG proteins
303 to regulate cell pluripotency (Garcia-Tunon et al., 2011).

304 Given the potential interactions of PcG proteins with the pluripotency factors that
305 were regulated by exposure to OEx, we evaluated the effect of cell treatment on the
306 expression of *Ezh*1, *Ezh*2 and *Suz*12, which are important components of the PcG and
307 involved in cell reprogramming (Margueron et al., 2008; Rao et al., 2015). Transcript levels
308 of the DNA methyltransferase 1 (DNMT1) and lysine demethylase enzymes (KDM6A and
309 KDM6B), which are known to be involved in cell reprogramming and pluripotency (Mansour
310 et al., 2012; Mohan and Chaillet, 2013; Pennarossa et al., 2013; Wang et al., 2012; Xu et al.,
311 2013), were also quantified. We observed that exposure to OEx induced a transient reduction
312 in the transcript levels of *Ezh*1, *Ezh*2 and *Dnmt*1 at 3 days after treatment, which returned to
313 similar levels as control cells by day 14 after treatment. However, in cells exposed to OEx
314 followed by Scrip only transcripts for *Ezh*1 were lower than control cells at day 3 after
315 treatment. This suggests that Scriptaid had counteractive effects on the modulation of gene
316 expression induced by the OEx.

317 We have finally observed that the transcript levels for *Ezh*2 were lower in stem cell-
318 like colonies derived from fibroblast cells treated with OEx that were cultured for
319 approximately 2 weeks in the presence of feeder cells. Although the transcript levels for the
320 other five genes were not affected by the presence of MEFs, the variation in *Ezh*2 mRNA
321 levels, suggests that culture environment may play an important role in the induction of cell
322 reprograming. However, we have not evaluated the effects of feeder cells before colony
323 formation. Although stem cells can be maintained in culture in the absence of feeder cells, it

presence helps preserving the pluripotency state of both ESC and iPSCs (Kim and Kino-oka, 2015; Villa-Diaz et al., 2013).

In summary, the findings in this study indicate that exposure of cultured fibroblast cells to oocyte extracts induce changes in gene expression and result in the formation of cell colonies resembling those of stem cells. However, lack of activation of key transcription factors such as *Oct*4 and *Sox*2 indicate insufficient reprogramming towards pluripotency. Formation of pre-IPSC where cells failed to fully activate endogenous pluripotency factors have been described in other studies (Chen et al., 2013b; Kang et al., 2014; Wei et al., 2015). This study also revealed that inhibition of histone deacetylases do not enhance cell reprogramming induced by oocyte extracts.

ACKNOWLEDGES

The authors are thankful to Olymel S.E.C. / L.P. for donation of porcine ovaries. W.G., E.K., V.R., K.G. and R.C.B. were supported by scholarships from CNPq and CAPES. This study was supported by the Brazilian council of Scientific and Technological Development (CNPq) and the Natural Sciences and Engineering Research Council (NSERC) of Canada.

REFERENCES

Akagi, S., Matsukawa, K., Mizutani, E., Fukunari, K., Kaneda, M., Watanabe, S., and Takahashi, S. (2011). Treatment with a histone deacetylase inhibitor after nuclear transfer improves the preimplantation development of cloned bovine embryos. J Reprod Dev 57, 120-6.

Alberio, R., Johnson, A.D., Stick, R., and Campbell, K.H. (2005). Differential nuclear remodeling of mammalian somatic cells by Xenopus laevis oocyte and egg cytoplasm. Exp Cell Res 307, 131-41.

Aloia, L., Di Stefano, B., and Di Croce, L. (2013). Polycomb complexes in stem cells and embryonic development. Development 140, 2525-34.

Armstrong, L., Lako, M., Dean, W., and Stojkovic, M. (2006). Epigenetic modification is central to genome reprogramming in somatic cell nuclear transfer. Stem Cells 24, 805-14.

355 Boyer, L.A., Lee, T.I., Cole, M.F., Johnstone, S.E., Levine, S.S., Zucker, J.P., Guenther,
356 M.G., Kumar, R.M., Murray, H.L., Jenner, R.G., Gifford, D.K., Melton, D.A.,
357 Jaenisch, R., and Young, R.A. (2005). Core transcriptional regulatory circuitry in
358 human embryonic stem cells. Cell 122, 947-56.
359 Bui, H.T., Kwon, D.N., Kang, M.H., Oh, M.H., Park, M.R., Park, W.J., Paik, S.S., Van
360 Thuan, N., and Kim, J.H. (2012). Epigenetic reprogramming in somatic cells induced
361 by extract from germinal vesicle stage pig oocytes. Development 139, 4330-40.
362 Bui, H.T., Wakayama, S., Kishigami, S., Kim, J.H., Van Thuan, N., and Wakayama, T.
363 (2008). The cytoplasm of mouse germinal vesicle stage oocytes can enhance somatic
364 cell nuclear reprogramming. Development 135, 3935-45.
365 Byrne, J.A., Pedersen, D.A., Clepper, L.L., Nelson, M., Sanger, W.G., Gokhale, S., Wolf,
366 D.P., and Mitalipov, S.M. (2007). Producing primate embryonic stem cells by somatic
367 cell nuclear transfer. Nature 450, 497-502.
368 Byrne, J.A., Simonsson, S., Western, P.S., and Gurdon, J.B. (2003). Nuclei of adult
369 mammalian somatic cells are directly reprogrammed to oct-4 stem cell gene
370 expression by amphibian oocytes. Curr Biol 13, 1206-13.
371 Chen, C.H., Du, F., Xu, J., Chang, W.F., Liu, C.C., Su, H.Y., Lin, T.A., Ju, J.C., Cheng,
372 W.T., Wu, S.C., Chen, Y.E., and Sung, L.Y. (2013a). Synergistic effect of trichostatin
373 A and scriptaid on the development of cloned rabbit embryos. Theriogenology 79,
374 1284-93.
375 Chen, J., Liu, H., Liu, J., Qi, J., Wei, B., Yang, J., Liang, H., Chen, Y., Chen, J., Wu, Y., Guo,
376 L., Zhu, J., Zhao, X., Peng, T., Zhang, Y., Chen, S., Li, X., Li, D., Wang, T., and Pei,
377 D. (2013b). H3K9 methylation is a barrier during somatic cell reprogramming into
378 iPSCs. Nat Genet 45, 34-42.
379 Evans, M.J., and Kaufman, M.H. (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from
380 mouse embryos. Nature 292, 154-6.
381 Fox, I.J., Daley, G.Q., Goldman, S.A., Huard, J., Kamp, T.J., and Trucco, M. (2014). Stem
382 cell therapy. Use of differentiated pluripotent stem cells as replacement therapy for
383 treating disease. Science 345, 1247391.
384 Gagliardi, A., Mullin, N.P., Ying Tan, Z., Colby, D., Kousa, A.I., Halbritter, F., Weiss, J.T.,
385 Felker, A., Bezstarosti, K., Favaro, R., Demmers, J., Nicolis, S.K., Tomlinson, S.R.,
386 Poot, R.A., and Chambers, I. (2013). A direct physical interaction between Nanog and
387 Sox2 regulates embryonic stem cell self-renewal. EMBO J 32, 2231-47.
388 Ganier, O., Bocquet, S., Peiffer, I., Brochard, V., Arnaud, P., Puy, A., Jouneau, A., Feil, R.,
389 Renard, J.P., and Mechali, M. (2011). Synergic reprogramming of mammalian cells by
390 combined exposure to mitotic Xenopus egg extracts and transcription factors. Proc
391 Natl Acad Sci U S A 108, 17331-6.
392 Garcia-Tunon, I., Guallar, D., Alonso-Martin, S., Benito, A.A., Benitez-Lazaro, A., Perez-
393 Palacios, R., Muniesa, P., Climent, M., Sanchez, M., Vidal, M., and Schoorlemmer, J.
394 (2011). Association of Rex-1 to target genes supports its interaction with Polycomb
395 function. Stem Cell Res 7, 1-16.
396 Guenther, M.G., Frampton, G.M., Soldner, F., Hockemeyer, D., Mitalipova, M., Jaenisch, R.,
397 and Young, R.A. (2010). Chromatin structure and gene expression programs of human
398 embryonic and induced pluripotent stem cells. Cell Stem Cell 7, 249-57.
399 Halley-Stott, R.P., Pasque, V., Astrand, C., Miyamoto, K., Simeoni, I., Jullien, J., and
400 Gurdon, J.B. (2010). Mammalian nuclear transplantation to Germinal Vesicle stage
401 Xenopus oocytes - a method for quantitative transcriptional reprogramming. Methods
402 51, 56-65.
403 Jullien, J., Astrand, C., Halley-Stott, R.P., Garrett, N., and Gurdon, J.B. (2010).
404 Characterization of somatic cell nuclear reprogramming by oocytes in which a linker

405 histone is required for pluripotency gene reactivation. Proc Natl Acad Sci U S A 107,
406 5483-8.
407 Jullien, J., Miyamoto, K., Pasque, V., Allen, G.E., Bradshaw, C.R., Garrett, N.J., Halley-Stott,
408 R.P., Kimura, H., Ohsumi, K., and Gurdon, J.B. (2014). Hierarchical molecular events
409 driven by oocyte-specific factors lead to rapid and extensive reprogramming.
410 Molecular cell 55, 524-36.
411 Kaji, E.H., and Leiden, J.M. (2001). Gene and stem cell therapies. JAMA 285, 545-50.
412 Kang, S.J., Park, Y.I., So, B., and Kang, H.G. (2014). Sodium butyrate efficiently converts
413 fully reprogrammed induced pluripotent stem cells from mouse partially
414 reprogrammed cells. Cell Reprogram 16, 345-54.
415 Kim, M.H., and Kino-oka, M. (2015). Maintenance of an undifferentiated state of human
416 induced pluripotent stem cells through migration-dependent regulation of the balance
417 between cell-cell and cell-substrate interactions. J Biosci Bioeng 119, 617-22.
418 Kishigami, S., Mizutani, E., Ohta, H., Hikichi, T., Thuan, N.V., Wakayama, S., Bui, H.T., and
419 Wakayama, T. (2006). Significant improvement of mouse cloning technique by
420 treatment with trichostatin A after somatic nuclear transfer. Biochem Biophys Res
421 Commun 340, 183-9.
422 Krepelova, A., Neri, F., Maldotti, M., Rapelli, S., and Oliviero, S. (2014). Myc and max
423 genome-wide binding sites analysis links the Myc regulatory network with the
424 polycomb and the core pluripotency networks in mouse embryonic stem cells. PLoS
425 One 9, e88933.
426 Liu, Y., Ostrup, O., Li, J., Vajta, G., Lin, L., Kragh, P.M., Purup, S., Hyttel, P., and Callesen,
427 H. (2012). Increased blastocyst formation of cloned porcine embryos produced with
428 donor cells pre-treated with Xenopus egg extract and/or digitonin. Zygote 20, 61-6.
429 Mansour, A.A., Gafni, O., Weinberger, L., Zviran, A., Ayyash, M., Rais, Y., Krupalnik, V.,
430 Zerbib, M., Amann-Zalcenstein, D., Maza, I., Geula, S., Viukov, S., Holtzman, L.,
431 Pribluda, A., Canaani, E., Horn-Saban, S., Amit, I., Novershtern, N., and Hanna, J.H.
432 (2012). The H3K27 demethylase Utx regulates somatic and germ cell epigenetic
433 reprogramming. Nature 488, 409-13.
434 Margueron, R., Li, G., Sarma, K., Blais, A., Zavadil, J., Woodcock, C.L., Dynlacht, B.D., and
435 Reinberg, D. (2008). Ezh1 and Ezh2 maintain repressive chromatin through different
436 mechanisms. Molecular cell 32, 503-18.
437 Martello, G., and Smith, A. (2014). The nature of embryonic stem cells. Annu Rev Cell Dev
438 Biol 30, 647-75.
439 Martinez-Diaz, M.A., Che, L., Albornoz, M., Seneda, M.M., Collis, D., Coutinho, A.R., El-
440 Beirouthi, N., Laurin, D., Zhao, X., and Bordignon, V. (2010). Pre- and
441 postimplantation development of swine-cloned embryos derived from fibroblasts and
442 bone marrow cells after inhibition of histone deacetylases. Cell Reprogram 12, 85-94.
443 Meissner, A., and Jaenisch, R. (2006). Mammalian nuclear transfer. Dev Dyn 235, 2460-9.
444 Miyamoto, K., Furusawa, T., Ohnuki, M., Goel, S., Tokunaga, T., Minami, N., Yamada, M.,
445 Ohsumi, K., and Imai, H. (2007). Reprogramming events of mammalian somatic cells
446 induced by Xenopus laevis egg extracts. Mol Reprod Dev 74, 1268-77.
447 Miyamoto, K., Nagai, K., Kitamura, N., Nishikawa, T., Ikegami, H., Binh, N.T., Tsukamoto,
448 S., Matsumoto, M., Tsukiyama, T., Minami, N., Yamada, M., Ariga, H., Miyake, M.,
449 Kawarasaki, T., Matsumoto, K., and Imai, H. (2011). Identification and
450 characterization of an oocyte factor required for development of porcine nuclear
451 transfer embryos. Proc Natl Acad Sci U S A 108, 7040-5.
452 Miyamoto, K., Tsukiyama, T., Yang, Y., Li, N., Minami, N., Yamada, M., and Imai, H.
453 (2009). Cell-free extracts from mammalian oocytes partially induce nuclear
454 reprogramming in somatic cells. Biol Reprod 80, 935-43.

455 Miyamoto, K., Yamashita, T., Tsukiyama, T., Kitamura, N., Minami, N., Yamada, M., and
456 Imai, H. (2008). Reversible membrane permeabilization of mammalian cells treated
457 with digitonin and its use for inducing nuclear reprogramming by Xenopus egg
458 extracts. Cloning Stem Cells 10, 535-42.
459 Mohan, K.N., and Chaillet, J.R. (2013). Cell and molecular biology of DNA
460 methyltransferase 1. Int Rev Cell Mol Biol 306, 1-42.
461 Neri, F., Zippo, A., Krepelova, A., Cherubini, A., Rocchigiani, M., and Oliviero, S. (2012).
462 Myc regulates the transcription of the PRC2 gene to control the expression of
463 developmental genes in embryonic stem cells. Mol Cell Biol 32, 840-51.
464 Pan, G., and Thomson, J.A. (2007). Nanog and transcriptional networks in embryonic stem
465 cell pluripotency. Cell Res 17, 42-9.
466 Papp, B., and Plath, K. (2013). Epigenetics of reprogramming to induced pluripotency. Cell
467 152, 1324-43.
468 Pasque, V., Jullien, J., Miyamoto, K., Halley-Stott, R.P., and Gurdon, J.B. (2011). Epigenetic
469 factors influencing resistance to nuclear reprogramming. Trends Genet 27, 516-25.
470 Pennarossa, G., Maffei, S., Campagnol, M., Tarantini, L., Gandolfi, F., and Brevini, T.A.
471 (2013). Brief demethylation step allows the conversion of adult human skin fibroblasts
472 into insulin-secreting cells. Proc Natl Acad Sci U S A 110, 8948-53.
473 Qin, Y., Qin, J., Zhou, C., Li, J., and Gao, W.Q. (2015). Generation of embryonic stem cells
474 from mouse adipose-tissue derived cells via somatic cell nuclear transfer. Cell Cycle
475 14, 1282-90.
476 Rao, R.A., Dhele, N., Cheemadan, S., Ketkar, A., Jayandharan, G.R., Palakodeti, D., and
477 Rampalli, S. (2015). Ezh2 mediated H3K27me3 activity facilitates somatic transition
478 during human pluripotent reprogramming. Sci Rep 5, 8229.
479 Rissi, V.B., Glanzner, W.G., Mujica, L.K.S., Antoniazzi, A.Q., Gonçalves, P.B.D., and
480 Bordignon, V. (2016). Effect of cell cycle interactions and inhibition of histone
481 deacetylases on development of porcine embryos produced by nuclear transfer. Cell
482 Reprogram 18, 8-16.
483 Robinton, D.A., and Daley, G.Q. (2012). The promise of induced pluripotent stem cells in
484 research and therapy. Nature 481, 295-305.
485 Simon, J.A., and Kingston, R.E. (2009). Mechanisms of polycomb gene silencing: knowns
486 and unknowns. Nat Rev Mol Cell Biol 10, 697-708.
487 Singh, V.K., Kalsan, M., Kumar, N., Saini, A., and Chandra, R. (2015). Induced pluripotent
488 stem cells: applications in regenerative medicine, disease modeling, and drug
489 discovery. Front Cell Dev Biol 3, 2.
490 Son, M.Y., Choi, H., Han, Y.M., and Cho, Y.S. (2013). Unveiling the critical role of REX1 in
491 the regulation of human stem cell pluripotency. Stem Cells 31, 2374-87.
492 Tachibana, M., Amato, P., Sparman, M., Gutierrez, N.M., Tippner-Hedges, R., Ma, H., Kang,
493 E., Fulati, A., Lee, H.S., Sritanaudomchai, H., Masterson, K., Larson, J., Eaton, D.,
494 Sadler-Fredd, K., Battaglia, D., Lee, D., Wu, D., Jensen, J., Patton, P., Gokhale, S.,
495 Stouffer, R.L., Wolf, D., and Mitalipov, S. (2013). Human embryonic stem cells
496 derived by somatic cell nuclear transfer. Cell 153, 1228-38.
497 Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., and Yamanaka,
498 S. (2007). Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined
499 factors. Cell 131, 861-72.
500 Takahashi, K., and Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse
501 embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. Cell 126, 663-76.
502 Thomson, J.A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S.S., Waknitz, M.A., Swiergiel, J.J., Marshall,
503 V.S., and Jones, J.M. (1998). Embryonic stem cell lines derived from human
504 blastocysts. Science 282, 1145-7.

505 Thomson, J.A., Kalishman, J., Golos, T.G., Durning, M., Harris, C.P., Becker, R.A., and
506 Hearn, J.P. (1995). Isolation of a primate embryonic stem cell line. Proc Natl Acad Sci
507 U S A 92, 7844-8.
508 Van Thuan, N., Bui, H.T., Kim, J.H., Hikichi, T., Wakayama, S., Kishigami, S., Mizutani, E.,
509 and Wakayama, T. (2009). The histone deacetylase inhibitor scriptaid enhances
510 nascent mRNA production and rescues full-term development in cloned inbred mice.
511 Reproduction 138, 309-17.
512 Villa-Diaz, L.G., Ross, A.M., Lahann, J., and Krebsbach, P.H. (2013). Concise review: The
513 evolution of human pluripotent stem cell culture: from feeder cells to synthetic
514 coatings. Stem Cells 31, 1-7.
515 Villasante, A., Piazzolla, D., Li, H., Gomez-Lopez, G., Djabali, M., and Serrano, M. (2011).
516 Epigenetic regulation of Nanog expression by Ezh2 in pluripotent stem cells. Cell
517 Cycle 10, 1488-98.
518 Wakayama, S., Kohda, T., Obokata, H., Tokoro, M., Li, C., Terashita, Y., Mizutani, E.,
519 Nguyen, V.T., Kishigami, S., Ishino, F., and Wakayama, T. (2013). Successful serial
520 recloning in the mouse over multiple generations. Cell Stem Cell 12, 293-7.
521 Wang, L.J., Zhang, H., Wang, Y.S., Xu, W.B., Xiong, X.R., Li, Y.Y., Su, J.M., Hua, S., and
522 Zhang, Y. (2011). Scriptaid improves in vitro development and nuclear
523 reprogramming of somatic cell nuclear transfer bovine embryos. Cell Reprogram 13,
524 431-9.
525 Wang, W.P., Tzeng, T.Y., Wang, J.Y., Lee, D.C., Lin, Y.H., Wu, P.C., Chen, Y.P., Chiu,
526 I.M., and Chi, Y.H. (2012). The EP300, KDM5A, KDM6A and KDM6B chromatin
527 regulators cooperate with KLF4 in the transcriptional activation of POU5F1. PLoS
528 One 7, e52556.
529 Wei, C., Li, X., Zhang, P., Zhang, Y., Liu, T., Jiang, S., Han, F., and Zhang, Y. (2015).
530 Characterization of porcine partially reprogrammed iPSCs from adipose-derived stem
531 cells. Reproduction 149, 485-96.
532 Wen, B.Q., Li, J., Li, J.J., Tian, S.J., Sun, S.C., Qi, X., Cai, W.T., and Chang, Q.L. (2014).
533 The histone deacetylase inhibitor Scriptaid improves in vitro developmental
534 competence of ovine somatic cell nuclear transferred embryos. Theriogenology 81,
535 332-9.
536 Wobus, A.M., and Boheler, K.R. (2005). Embryonic stem cells: prospects for developmental
537 biology and cell therapy. Physiol Rev 85, 635-78.
538 Xie, B., Zhang, H., Wei, R., Li, Q., Weng, X., Kong, Q., and Liu, Z. (2016). Histone H3
539 lysine 27 trimethylation acts as an epigenetic barrier in porcine nuclear
540 reprogramming. Reproduction 151, 9-16.
541 Xu, W., Li, Z., Yu, B., He, X., Shi, J., Zhou, R., Liu, D., and Wu, Z. (2013). Effects of
542 DNMT1 and HDAC inhibitors on gene-specific methylation reprogramming during
543 porcine somatic cell nuclear transfer. PLoS One 8, e64705.
544 Zhao, J., Ross, J.W., Hao, Y., Spate, L.D., Walters, E.M., Samuel, M.S., Rieke, A., Murphy,
545 C.N., and Prather, R.S. (2009). Significant improvement in cloning efficiency of an
546 inbred miniature pig by histone deacetylase inhibitor treatment after somatic cell
547 nuclear transfer. Biol Reprod 81, 525-30.
548

549

550 **AUTHOR DISCLOSURES**

551 The authors declare that there are no conflicts of interest.

552

553 **List of Figures**

554 **Figure 1**. Formation of stem cell-like colonies after treatment with oocyte extract. A) porcine
555 fibroblast before treatment. B-C) small cell colonies at the first day of appearance. D) cell
556 colonies at 48 hours after appearance. E) cell colony cultured on feeder cells. F) cell colony
557 stained with DAPI showing several nuclei.

558 **Figure 2**. Transcript levels of genes encoding chromatin-modifying enzymes on days 3 and
559 14 after fibroblast cell treatment. Experiments were performed in triplicate.

560 **Figure 3**. Transcript levels of genes encoding chromatin-modifying enzymes in stem cell-like
561 colonies at days 21 at 28 after treatment.

562 **Figure 4**. Expression profile of genes encoding chromatin-modifying enzymes in fibroblast
563 cells and derived stem cell-like colonies. D3 and D14 = fibroblast cells; D28 = stem cell–like
564 colonies cultured without feeder cells.

Table 1. List of primers used for detection and quantification of gene transcripts.

Gene	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')	Acession Number
*Oct*4	GCCAAGCTCCTAAAGCAGAAG	GCCAAGCTCCTAAAGCAGAAG	NM_001113060
Nanog	CAACGACAGATTTCAGAGGCAGA	GGTTCAGGATGTTGGAAAGTTCTTG	NM_001129971.1
Sox2	AACCAGAAGAACAGCCCAGAC	CTCCGACAAAAGTTTCCACTCG	NM_001123197.1
c-Myc	GAACCCTTGGCTCTCCACG	CCTCTTTTCCACAGAAACAACATCA	NM_001005154.1
*Rex*1	ATCTCACTCCGGGATGTCCA	TGAGGTAGTCGGCCATGAGA	XM_003123002.2
*Dnmt*1	ATTCTCTCCTTCGACACGCC	GCCTTTCAGCTCGCCTTTTC	NM_001032355.1
*Ezh*1	CTGGGCCTCCAGTTCTTCAG	GGTGCCATGGAAGACTCGAA	NM_001243206.1
*Ezh*2	TGCAACACCCAATACTTACAAGC	CGGCAAACTCTTTTGCTCCC	NM_001244309.1
*Suz*12	CCTGGAAGTCCTGCTTGTGA	AAACTGCAAGGGACGGGAAA	(*)
Kdm6A	AGCTTTTGTCGAGCCAAGGA	GCATTGGACAAAGTGCAGGG	(#)
Kdm6B	GGGAGACTATCAGCGCCTTC	AGCGGTACACAGGGATGTTG	XM_005657029.1
Gapdh	ATTGCCCTCAACGACCACTT	GGCTCTTACTCCTTGGAGGC	NM_001206359.1
Actb	TGTGGATCAGCAAGCAGGAGTA	TGCGCAAGTTAGGTTTTGTCA	XM_003124280.3

*Homologous region between 6 transcripts: XM_005669066.1; XM_005669068.1; XM_005669065.1; XM_003131745.3; XM_005669069.1; XM_005669067.1

#Homologous region between 4 transcripts: XM_003360275.2; XM_003360274.2; XM_003360277.2; XM_003360276.2

Table 2. Development of stem cell-like colonies from fibroblast cells treated with oocyte extracts.

Treatment	Replicates	Number of days to colony formation Average (Range)	Number of colonies at day of appearance Average (range)	Number of colonies 48h after appearance	Fold increase after 48h
Oocyte extract	6	16 (13-22)	7.33 (2-20)[a]	21 (4-35)[b]	2.86
Oocyte extract + Scriptaid	6	16 (13-22)	7 (3-12)[a]	17 (7-24)[b]	2.42

Table 3. Detection of transcripts for pluripotency genes at different times after treatment of fibroblast cells.

Gene	Day	Control	Oocyte extract	Sciptaid	Oocyte Extract + Scriptaid
*Oct*4	7	- - -	+ - +	- - -	- - -
	14	- - -	- - -	- - -	- - -
	21	- - -	- + -	- + -	+ - -
	28	+ - -	- - -	+ + -	- - -
	Total	(1/12)	(3/12)	(3/12)	(1/12)
Nanog	7	- - -	+ - -	- - -	+ + -
	14	- - -	+ + -	- - -	- - -
	21	- - -	+ + +	+ - +	+ + +
	28	+ + -	+ + +	+ + -	- - -
	Total	(2/12)	(9/12)	(4/12)	(5/12)
*Sox*2	7	- - -	- - -	- - -	- - -
	14	- - -	- - -	- - -	- - -
	21	- - -	- - -	- - -	- - +
	28	- - -	- - -	- - -	- - -
	Total	(0/12)	(0/12)	(0/12)	(1/12)
c-Myc	7	- - -	- + +	- - +	- + +
	14	- - -	+ + -	- - -	+ + -
	21	- - -	+ + +	- - -	+ + +
	28	+ + -	+ + +	- + -	+ + +
	Total	(2/12)	(10/12)	(2/12)	(10/12)
*Rex*1	7	- - -	- + +	- - -	- + -
	14	- - -	+ + +	- - -	+ + -
	21	- - -	- + +	- - -	+ + +
	28	+ + -	+ + -	+ + -	+ + +
	Total	(2/12)	(9/12)	(2/12)	(9/12)
Gapdh	7	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +
	14	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +
	21	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +
	28	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +
	Total	(12/12)	(12/12)	(12/12)	(12/12)
Actb	7	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +
	14	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +
	21	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +
	28	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +
	Total	(12/12)	(12/12)	(12/12)	(12/12)

(+) represents presence and (-) absence of transcripts.

"Total" represents the number of positives samples for the gene over total number of samples.

Table 4. Detection of transcripts for pluripotency genes in stem cell-like colonies at day 21 after treatment.

Gene	Oocyte extract	Oocyte extract + Scriptaid
*Oct*4	- - -	- - -
Nanog	+ - -	+ + -
*Sox*2	- - -	- - -
c-Myc	+ + +	+ + +
*Rex*1	+ + -	+ + -
Gapdh	+ + +	+ + +
Actb	+ + +	+ + +

(+) represents presence and (-) absence of transcripts.

Figure 1.

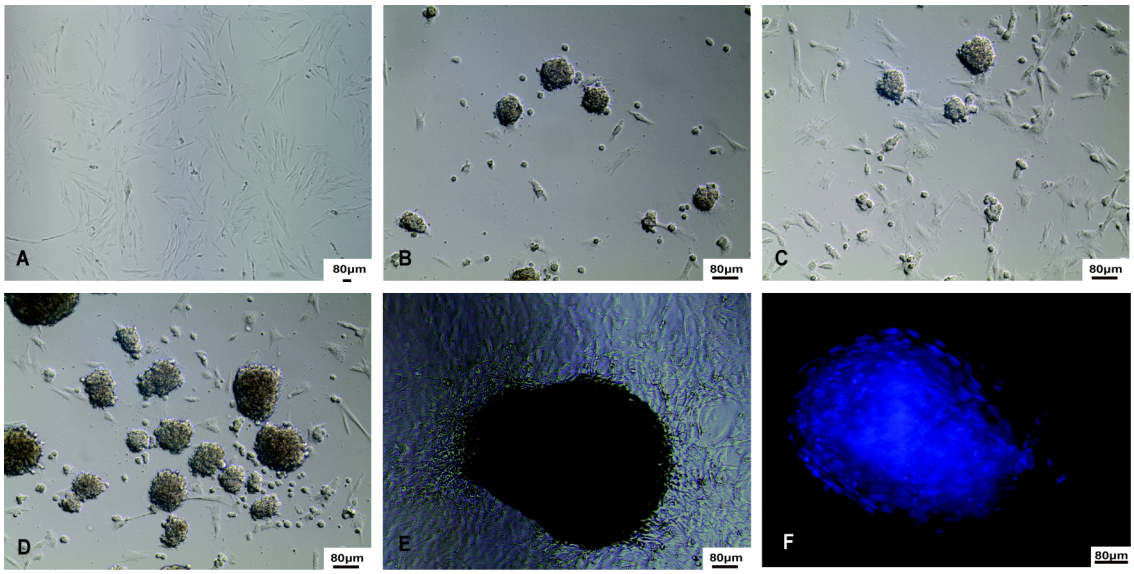


Figure 2.

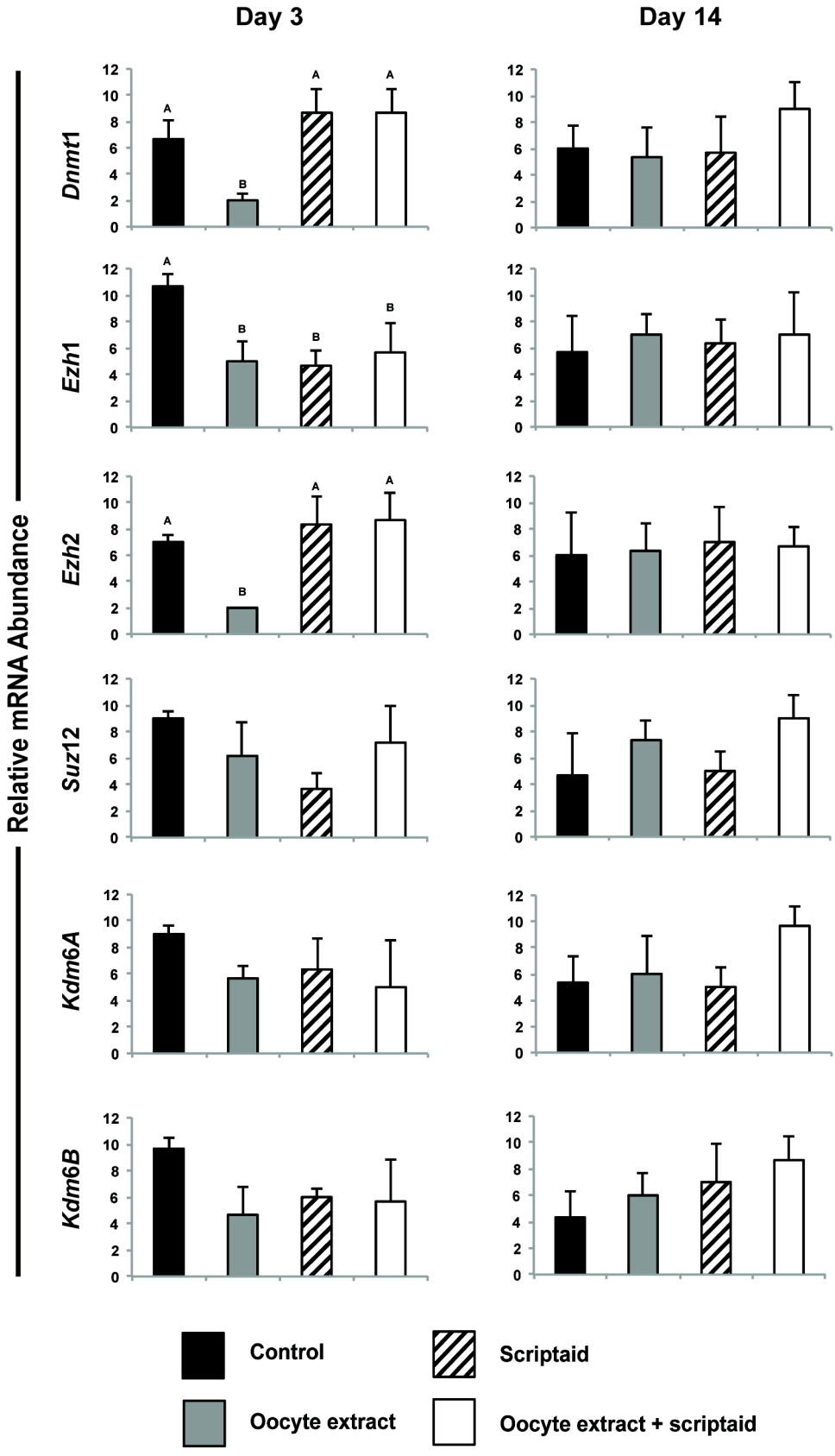

Day 3
Day 14
Relative mRNA Abundance
Dnmt1
Ezh1
Ezh2
Suz12
Kdm6A
Kdm6B
Control
Scriptaid
Oocyte extract
Oocyte extract + scriptaid

Figure 3.

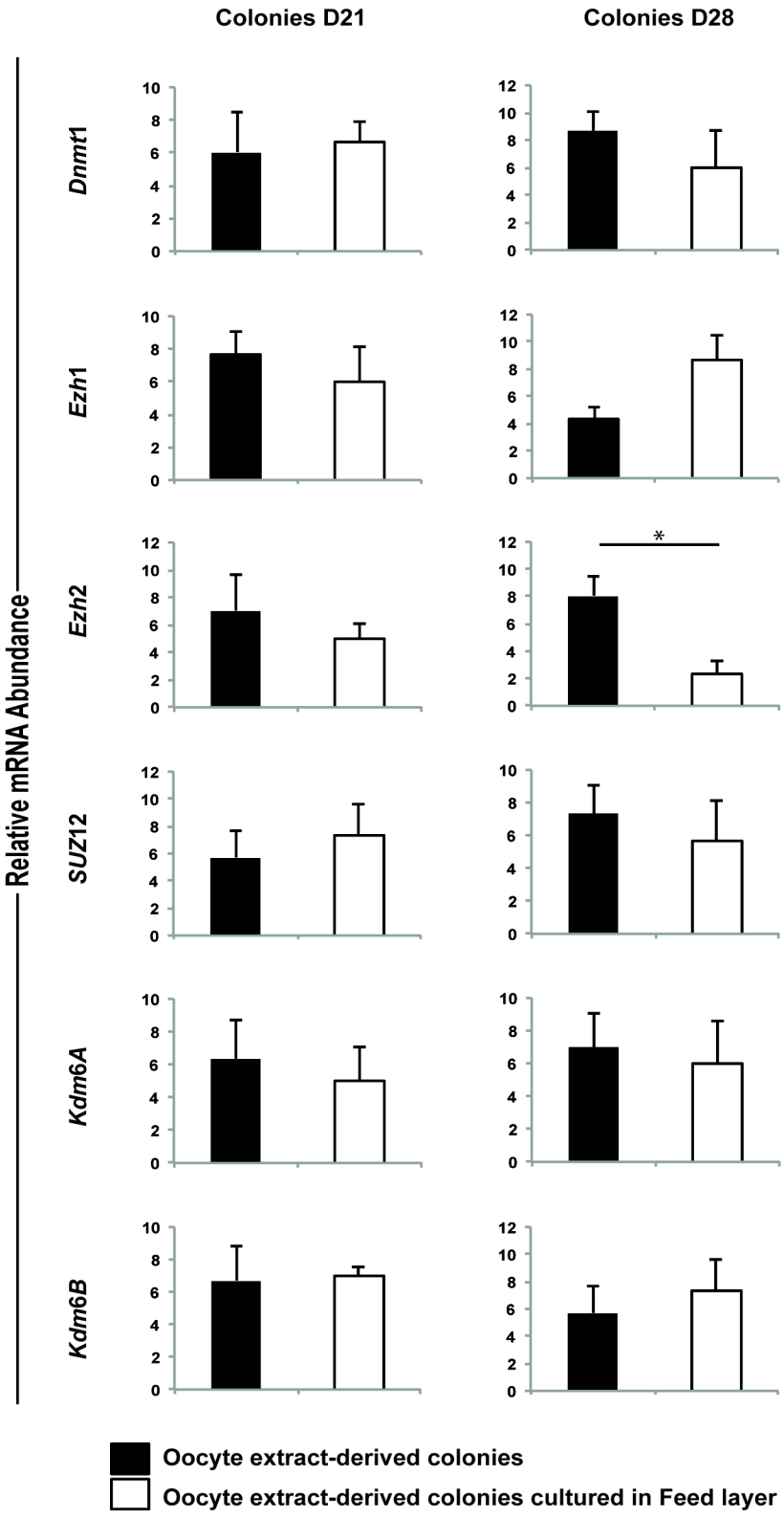
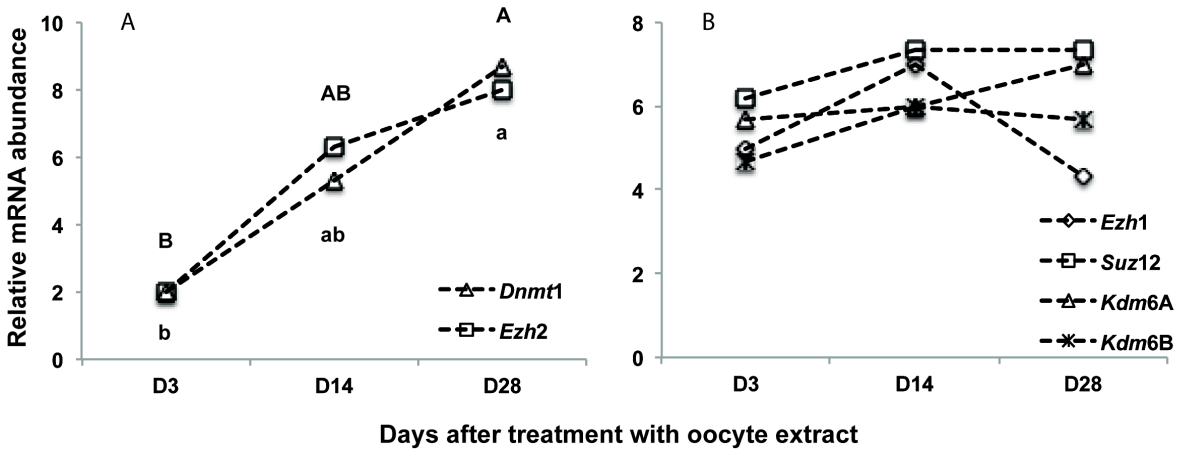

Colonies D21
Colonies D28
Relative mRNA Abundance
Dnmt1
Ezh1
Ezh2
SUZ12
Kdm6A
Kdm6B
*
Oocyte extract-derived colonies
Oocyte extract-derived colonies cultured in Feed layer

Figure 4.


A
B
Relative mRNA abundance
10
8
6
4
2
0
A
AB
a
B
ab
b
D3
D14
D28
Dnmt1
Ezh2
Ezh1
Suz12
Kdm6A
Kdm6B
Days after treatment with oocyte extract

ARTIGO 2

TRABALHO A SER SUBMETIDO PARA PUBLICAÇÃO:

Expression of BRG1, histone demethylases and H3K4 methylation differ between high and low developmental competent embryos at the time of embryonic genome activation

Werner Giehl Glanzner, Audrey Watcher, Ana Rita Coutinho, Marcelo Albornoz, Raj Duggavathi, Paulo Bayard Dias Gonçalves, Vilceu Bordignon.

MOLECULAR, REPRODUCTION AND DEVELOPMENT, 2016

Expression of BRG1, histone demethylases and H3K4 methylation differ between high and low developmental competent embryos at the time of embryonic genome activation

Glanzner, W.G.[1a]; Wachter, A.[1b]; Coutinho, A.R.S.[b]; Albornoz, M.S.[b]; Duggavathi, R.[b], Gonçalves, P.B.D.[a]; Bordignon, V.[b*]

[a]*Laboratory of Biotechnology and Animal Reproduction - BioRep, Federal University of Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, Brazil.*

[b]*Department of Animal Science, McGill University, Sainte Anne de Bellevue, QC, Canada.*

[1]These authors contributed equally to this work.

**Corresponding author. Email: vilceu.bordignon@mcgill.ca Phone: 514-398-7793*

21111, Lakeshore Road. Ste. Anne de Bellevue, Quebec, Canada, H9X 3V9.

Running Head: **H3K4 methylation and embryo development**

Keywords: BRG1, KDM1A, H3K4, embryo genome activation, embryo development.

Funding: This study was financially supported by the Natural Sciences and Engineering Research Council (NSERC) of Canada.

Abbreviations: EGA, embryonic genome activation; IVF, in vitro fertilization/fertilized; PA, parthenogenetic activation/activated; BRG1, brahma related gene 1; KDM1A, lysine demethylase 1 A; H3K4me, methylation on lysine 4 of histone 3

Abstract

Epigenetics is a fundamental component in the regulation of many biological functions including development and cell differentiation. Epigenetic modifications affect key chromatin functions, including gene transcription and DNA repair, which are critical for normal embryo development. In this study, the profile of important epigenetic modifiers and epigenetic changes was evaluated in porcine embryos at different stages of development. We observed that the brahma related gene 1 (BRG-1) and the lysine demethylase 1 A (KDM1A), which can alter the methylation status of the lysine 4 in the histone 3 (H3K4), become nuclear localized at days 3-4 of development, which corresponds to the main period of embryonic genome activation (EGA). Immunofluorescence signal for both proteins was similar in embryos produced by fertilization (IVF) and parthenogenetic activation (PA). Using a well-stablished model of embryo developmental competence, based on the time to the first cell cleavage, we found that mRNA abundance for BRG-1, KDM1A, as well as other lysine demethylases (KDM1B, KDM5A, KDM5B AND KDM5C), were significantly higher in late- comparing to early-cleaving embryos near the EGA period but similar at the blastocyst stage. Moreover, the fluorescence signal for H3K4 mono- (H3K4me) and di-methylation (H3K4me2) was lower in late-cleaving and less developmental competent embryos near the EGA period. The fluorescence intensity of BRG1, KDM1A and H3K4me2 was higher in embryos having 4 or more cells at day 3-4 of development compared to those having less than 4 cells. These findings suggest that altered epigenetic modifications in the H3K4 near the EGA period affect the developmental competence of swine embryos to reach the blastocyst stage.

Introduction

Oocyte competence refers to its capacity to complete meiotic maturation and support embryo development. Features associated with oocyte quality and competence have been identified and include follicular size, follicular environment, oocyte aging, oocyte-cumulus cells communication, oxidative stress, metabolism, growth factors and oocyte transcriptional activity (Algriany et al., 2004; Bagg et al., 2007; Fair, 2010; Labrecque and Sirard, 2014; Dumesic et al., 2015; Keefe et al., 2015; Moussa et al., 2015).

The potential of oocytes to support embryo develop in vitro has been shown to be influenced by length of the first cell cycle and embryo cleavage kinetics in different species including mice, pigs, bovine and humans (Bos-Mikich et al., 2001; Kobayashi et al., 2004; Coutinho et al., 2011; Henrique Barreta et al., 2012; Isom et al., 2012; Bohrer et al., 2015). In addition, early cleaving embryos have less incidence of DNA damage as evidenced by the lower number of DNA double strand breaks compared to late cleaving embryos (Bohrer et al., 2015). However, the molecular and cellular mechanisms controlling the acquisition of developmental competence remain poorly understood.

One of the critical stages when a significant proportion of embryos cultured in vitro arrest development is the maternal-to-zygote transition, the period when the embryo genome is activated (EGA) (Wong et al., 2010; Lee et al., 2014). During this process a series of chromatin changes and epigenetic modifications are necessary to allow gene transcription (Ostrup et al., 2013a).

Epigenetic changes have been shown to be involved in the regulation of embryo genome activation and gene expression in developing embryos (Mason et al., 2012; Beaujean, 2014a; Beaujean, 2014b; Cheedipudi et al., 2014). Among the observed epigenetic changes, increased methylation in the lysine 4 of the histone 3 (H3K4me) around the EGA period has been correlated with transcriptional activity in the embryo (Gao et al., 2010; Ostrup et al.,

2013a). In pigs, H3K4me is detected during oogenesis from primary to antral follicle stages (Seneda et al., 2008). Proteins known to be involved in histone modifications, such as KDM1A and BRG1, have been shown to regulate early embryo development (Bultman et al., 2006; Wang et al., 2007; Carey et al., 2015).

The BRG1 is the ATPase subunit of the brahma related gene 1/ mammalian brahma complex (BRG1/BRM) (Glaros et al., 2008) and acts as a transcriptional coregulator (Trotter and Archer, 2008). Knockout studies have showed that BRG1 is essential for genome activation in mice, since oocytes were fertilized but embryos arrested development at the 2- or 4-cells stage (Bultman et al., 2006). Moreover, BRG1 is known to regulate cell pluripotency by affecting gene expression including Nanog, Oct4, Sox2 (Kidder et al., 2009; Carey et al., 2015). BRG1 is also known to stimulate the mesodermal lineage commitment during fetal development (Alexander et al., 2015) and to participate in the regulation of DNA double strand breaks repair (Wang et al., 2012).

KDM1A is a histone demethylase specific for demethylation of H3K4 and H3K9 (Wang et al., 2009). It acts as a transcriptional co-repressor component of the coREST, C-terminal binding protein complex (CtBP) complex, which is involved in cell-lineage determination, and regulates gene activation and repression (Shi et al., 2004; Wang et al., 2007). KDM1A is essential for survival of postimplantation stage embryos (Foster et al., 2010). In mice, KDM1A knockout embryos do not develop further than E7.5 (Wang et al., 2007). On the other hand, mice overexpressing KDM1A in sperm had abnormal fetal development and altered epigenetic patterns (Siklenka et al., 2015). Furthermore, mice embryos treated with a KDM1A inhibitor from 1-cell stage had abnormal development to 4-cell stage and altered expression of Oct4 (Shao et al., 2008), which suggests that KDM1A activity is also important for regulation of early embryo transcription.

In light of those previous findings, we hypothesized that BRG1 and KDM1A would affect developmental competence of oocytes to reach the blastocyst stage. Therefore, we have used a well-stablished model for embryo developmental competence based on the time to first embryo cleavage to investigate the temporal changes in the expression of *BRG1*, *KDM1A*, *KDM1B*, *KDM5A*, *KDM5B* AND *KDM5C* genes, and localization of BRG1 and KDM1A, H3K4me, H3K4me2 proteins during early development of porcine embryos.

Results

Immunolocalization and quantification of fluorescent signal for BRG1 and KDM1A in IVF and PA embryos

Samples collected from matured oocytes to blastocyst stage embryos at day 7 of development after IVF were stained for BRG1 and KDM1A. The percentages of oocytes/embryos presenting nuclear localization are shown in figure 1A. Both proteins were not detected in MII-stage oocytes. KDM1A nuclear localization increased from 46.67% of embryos at day 2 to 100% at days 3-4 and days 5-7 of development. BRG-1 showed a similar pattern, with 36.36%, 84.21% and 100% of embryos presenting nuclear staining at days 2, 3-4 and 5-7 of culture, respectively.

Days 3-4 of development represent the main period of the maternal zygote transition leading to the activation of the embryonic genome in swine. Therefore, we assessed the fluorescent signal of BRG-1 and KDM1A in IVF and PA embryos during (days 3-4) and after (days 6-7) the main period of EGA (Figure 2). For PA embryos, we observed a reduction in the fluorescent intensity at the initial stages of development for both BRG-1 and KDM1A proteins. However, on later stages of development we only observed a reduction in the fluorescent intensity in PA embryos for KDM1A (Figure 2).

Embryo development and total cell number in early- and late-cleaving embryos

Embryos that cleaved before 24 h were cultured separated from those that cleaved between 24 and 48 h after PA, and the average number of cells was compared between embryos from each group at different stages of development. The total cleavage rate was 81.24%, but the proportion of early-cleaving (64.59%) was higher than late-cleaving (16.97%) embryos (Figure 3A). Early-cleaving embryos developed to blastocysts in a higher proportion (67.48%) than late-cleaving embryos (34.27%), which combined represented 62.37% of the cleaved embryos the reached the blastocyst stage at day 7 of culture (Figure 3B). The average cell number was consistently higher in early- compared to late-cleaving embryos from day 3 to day 7 of development (Figure 3C). These data shown that early-cleaving embryos not only have superior developmental capacity but also form better quality embryos having higher cell numbers.

Relative abundance of transcripts in early- and late-cleaving embryos

Relative mRNA levels of *BRG1*, *KDM1A*, *KDM1B, KDM5A*, *KDM5B* AND *KDM5C* (Table 1) were compared between early- and late-cleaving embryos at day 4 and 7 of development. Late-cleaving embryos had higher mRNA levels of *BRG1*, *KDM1A*, *KDM1B*, *KDM5A* AND *KDM5B* at day 4 of development compared to early-cleaving embryos. There was no difference in transcripts abundance for any of the analyzed genes between early- and late-cleaving embryos that developed to the blastocyst stage at day 7. Transcripts abundance for all genes was significantly lower in day 7 blastocysts compared to day 4 embryos (Figure 4).

Fluorescence signal for H3K4me and H3K4me2 in early- and late-cleaving embryos

Mono (H3K4me) and dimethylation (H3K4me2) status of H3K4 were compared between early- and late-cleaving embryos during the main period of EGA (days 3-4). Lower immunofluorescence intensity for both H3K4me and H3K4me2 was detected in late- compared to early-cleaving embryos (Figure 5).

Immunofluorescence signal for Brg1, Kdm1A, H3K4me and H3K4me2 in day 3-4 embryos having different cell numbers

To investigate if the nuclear profile of BRG1, KDM1A, H3K4me and H3K4me2 near the EGA was affected the embryo cell number, the fluorescence intensity was compared between day 3-4 embryos having less than 4 cells, 4-8 cells or more than 8 cells (Figure 6). The fluorescence intensity for BRG1 and KDM1A was higher in embryos having 4 or more cells compared to those having less than 4 cells. Similarly, H3K4me2 florescence intensity was significantly higher in embryos that reached more than 8 cells compared to those having 8 or less cells. On the other hand, the fluorescence intensity for H3K4me remained similar in embryos having different cell numbers (Figure 6).

Discussion

Findings from this study provided evidence that epigenetic programing at the time of embryo genome activation is altered in late-cleaving and less developmental competent porcine embryos. It was first observed in this study that the chromatin remodelling factor BRG-1 and the histone demethylase KDM1A proteins become nuclear localized at days 3-4 of development in embryos produced either by IVF and PA. This developmental stage represents the time when the genome of the pig embryo is activated at the transition from 4- to 8-cell stage (Hyttel et al., 2000; Cao et al., 2014). Our findings suggest that both BRG1 and KDM1A proteins participate in promoting the chromatin changes required to initiate gene

transcription at this critical stage of embryo development. Indeed, given their actions in promoting epigenetics changes on histone tail residues, including the H3K4, the BRG1 and KDM1A are important transcriptional modulators of gene expression (Klose and Zhang, 2007; Shi, 2007; Trotter and Archer, 2008).

In order to investigate if changes occurring at the time of embryo genome activation are correlated with the embryo developmental capacity to reach the blastocyst stage, we have compared gene expression and immunofluorescence signals in embryos of higher and lower developmental capacity based on the time of their first cell cleavage (Coutinho et al., 2011; Bohrer et al., 2015). Because IVF in pigs is often associated with high polyspermy rates (Suzuki et al., 2003; Park et al., 2009), the studies with early- and late-cleaving embryos we conducted using PA embryos. Similarly to the findings of previous studies (Coutinho et al., 2011; Isom et al., 2012; Bohrer et al., 2015), we observed that early-cleaving embryos not only produced higher rates of blastocysts but their average number of cells are significantly higher, starting at day 3 of development and up to the blastocyst stage, compared to late-cleaving embryos. Interestingly, we found that late-cleaving embryos had higher transcript levels for BRG1, KDM1A, as well as for the histone demethylases *KDM1B, KDM5A*, *KDM5B* AND *KDM5C*, which are known to be involved in several epigenetic processes, including demethylation of H3K4 (Shi, 2007; Wang et al., 2007; Wang et al., 2009), and regulation of gene transcription (Liu and Secombe, 2015), including imprinting genes (Ciccone et al., 2009). The fact that those transcripts were increased in late cleaving-embryos suggest that epigenetic changes affected by those genes would be altered compared to the early-cleaving and more developmental competent embryos.

We have then compared the mono- and di-methylation status of H3K4 between early and late cleaving embryos near the EGA period. It was observed, based on the intensity of the fluorescence signal, that the levels of both H3K4me and H3K4me2 were decreased in late-

compared to the early-cleaving embryos. These results corroborate with the high mRNA levels of demethylases in the late-cleaving embryos detected in the q-PCR analyses. Mono-, di- and tri-methylation of H3K4 were shown to be present in pig oocytes since preantral follicle stages (Seneda et al., 2008), and are involved in the regulation of embryo transcription (Gao et al., 2010; Ostrup et al., 2013a).

It was also observed in this study that the immunofluorescence signal for BRG-1, KDM1A and H3K4me2 but not H3K4me increased in the nuclei of embryos during the transition from 4-8 cells in embryos at day 3-4 of development. This indicates that BRG-1, KDM1A and H3K4me2 become more abundant in porcine embryos achieving transcriptional activity. Previous studies have proposed that BRG1 regulates H3K4me2 promoting its methylation, since knockout mice presented a significant reduction on H3K4me2 levels in foetal liver cells (Kim et al., 2009).

Although the reasons causing the observed variations in transcript levels and nuclear localization of epigenetic marks at time of embryo genome activation between embryos having different developmental capacities remain to be elucidated, one possibility is that late-cleaving oocytes are derived from less developed follicles and have consequently not stored sufficient amount of transcripts and proteins required for the proper activation of embryo genome (Fair et al., 1995; Hay-Schmidt et al., 2001; Donnison and Pfeffer, 2004; Kanka et al., 2012; Ostrup et al., 2013b). On the other hand, the altered pattern of transcripts and proteins observed in the less developmental competent embryos may be associated with the activation of coping responses induced by environmental, metabolic or genotoxic stress. For instance, increase in DNA damage and genome instability has been correlated with the EGA period (Butuci et al., 2015). Moreover, late-cleaving embryos were shown to have higher incidence of DNA double strand breaks and increased mRNA levels for genes encoding DNA repair and cell cycle checkpoint proteins (Bohrer et al., 2015). In summary, results from this

224 study revealed that: a) BRG-1 and KDM1A became nuclear localized near the period of EGA;
225 b) less developmental competent embryos have higher mRNA levels of *BRG-1*, *KDM1A*,
226 *Kdm1B, Kdm5A*, *Kdm5B* and *Kdm5C* at the time of EGA; and c) more developmental
227 competent embryos have higher levels of H3K4me and H3K4me2 at the time of EGA.
228 Together these data indicate that the activation of the embryo genome is altered in embryos
229 having low developmental competence.
230
231 **Material & Methods**
232 Unless stated otherwise, all chemicals were purchased from Sigma Chemicals
233 Company (Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada).
234
235 *Oocyte collection and in vitro maturation (IVM)*
236 Ovaries of prepubertal gilts were collected at a local slaughterhouse (Olymel
237 S.E.C./L.P., Saint-Esprit, QC, Canada) and transported to the laboratory at 30 to 35˚C in
238 saline solution (0.9% NaCl) containing penicillin (100 UI/ml) and streptomycin (10 mg/ml).
239 Cumulus-oocyte complexes (COCs) were aspirated from 3 to 6 mm follicles using a 10 mL
240 syringe and 18-gauge needle. COCs surrounded by a minimum of three cumulus cells layers
241 and having a homogeneous granulated cytoplasm were selected for IVM.
242 Groups of 30 oocytes were cultured in 90 µL droplets of maturation medium using
243 cell culture plates in a humidified atmosphere of 5% CO_2 and 95% air at 38.5°C. Maturation
244 medium consisted of TCM 199 (TCM199; Gibco, Invitrogen life technologies, Burlington,
245 ON, Canada), supplemented with 20% porcine follicular fluid, 1mM of dibutyryl cyclic
246 adenosine monophosphate (dbcAMP), 0.1µg/ml cysteine, 10ng/ml epidermal growth factor
247 (EGF; Life Technologies), 0.91mM sodium pyruvate, 3.05mM D-glucose, 0.5µg/ml LH
248 (Lutropin-V, Bioniche, Ontario, CA, USA), 0.5µg/ml FSH (Folltropin-V, Bioniche, Ontario

CA, USA) and 20μg/ml gentamicin. After 22 to 24h of maturation, oocytes were transferred to the same IVM medium, but without LH, FSH and dbcAMP for an additional 20 to 22h under the same conditions.

In vitro fertilization (IVF), parthenogenetic activation (PA) and embryo culture

After IVM, cumulus cells were removed by vortexing in TCM 199 HEPES-buffered medium (Life Technologies) supplemented with 0.1% hyaluronidase to get the oocytes ready for IVF or PA. For IVF, denuded oocytes were washed three times and then fertilized in mTBM media in four well plates with $2x10^5$ spermatozoa/ml (Abeydeera and Day, 1997). After 6 hours, the oocytes were washed twice in PZM-3 media (Yoshioka et al., 2002) and cultured in a humidified atmosphere of 5% CO_2 and 95% air at 38.5°C for up to 7 days. For PA, denuded oocytes were activated using a previously described protocol (Che et al., 2007). Accordingly, the oocytes were first exposed to ionomycin (15 μM) for 5 min in TCM199 medium supplemented with 2mg/ml BSA. The oocytes were then washed in the same media without ionomycin and transferred to Ca^{2+}-free PZM-3 supplemented with 10mM strontium chloride, cytochalasin B (7.5μg/ml) and cycloheximide (10μg/ml) for 4h. Oocytes were then washed in PZM-3 and transferred to PZM-3 supplemented with 3 mg/ml BSA fatty acid-free for embryo culture in a humidified atmosphere of 5% CO_2 and 95% air at 38.5°C.

Cleavage was assessed at 24h and 48h after PA and 48h after IVF. Embryos that cleaved within 24h after PA are herein referred as early-cleaving and those that cleaved between 24 and 48h after PA as late-cleaving. Early- and late-cleaving groups were cultured separately. At day 5 of development, the medium was supplemented with 10% of fetal bovine serum (FBS).

Immunodetection of HDAC-1, LSD-1, BRG-1, H3K4me1 and H3K4me2 in oocytes and developing embryos

Groups of oocytes and embryos were rinsed in PBS, fixed for 15 min in 4% paraformaldehyde, and then stored in PBS supplemented with 0.5% triton 100X and 0.3% bovine serum albumin (BSA) at 4ºC.

Prior to immunocytochemistry, oocytes and embryos were exposed for 30 min to a permeabilization solution consisting of PBS supplemented with 1% triton. Samples were then washed twice for 10 min each in blocking solution composed of PBS supplemented with 0.2% Tween20 and 3% of BSA. Samples were then exposed overnight at 4^{o}C to the primary antibodies diluted in blocking solution. The primary antibodies were anti-rabbit LSD-1 (Upstate, cell signaling solutions, Charlotteville, VA, USA), anti-rabbit BRG-1 (Upstate), anti- rabbit H3K4me1 (Abcam, Cambridge, MA, USA), and anti-rabbit H3K4me2 (Upstate). The respective dilutions of the primary antibodies were 1:400, 1:500, 1:500 and 1:250 in blocking solution. Negative control samples were exposed to control rabbit IgG (Jackson Immunoresearch Laboratories Inc., West Grove, PA) at the same concentration as the primary antibodies. Samples were then washed three times for 20 min each in blocking solution and incubated for 1h at room temperature in the presence of Alexa Flour 488 goat anti-rabbit (Molecular Probes, Eugene, OR; 1:200) or Alexa Fluor 594 goat anti-rabbit (Molecular Probes Inc., 1:500) secondary antibodies. Samples were finally washed three times in blocking solution and mounted on microscope slides using a drop of Mowiol containing 10 μg/ml of Hoechst 33342 for chromatin visualization.

Slides were examined by epifluorescence in a Nikon eclipse 80i microscope (Nikon, Tokyo, Japan). Images were individually recorded using a Retiga 2000R monochrome digital camera (Qimaging, BC, Canada). All images were captured using the same settings and saved in TIFF format. In order to quantify the fluorescence intensity, the grayscale signal (pixel

298 values) was measured using the SimplePCI Imaging Software (Compix, Inc., Sewickley, PA).
299 The pixel values were measured in entire oocytes or embryos (nuclei + cytoplasms) in
300 samples of mature (metaphase II stage; MII) oocytes and cleaved (24h after PA) embryos. In
301 samples fixed at later stages of development (from day 2 to 7 of culture) the pixel values were
302 measured only on the nuclear area in up to 10 randomly selected nuclei per embryo.
303
304 *RNA extraction and qRT-PCR*
305 Total RNA was extracted from groups of 20 (day 4; D4) and 15 (day 7; D7) PA
306 embryos using the PicoPure RNA Isolation Kit (Life Technologies) according to the
307 manufacturer's instructions. RNA was treated with DNase I (Qiagen) and reverse transcribed
308 using SuperScript VILO cDNA Synthesis Kit (Life Technologies).
309 Real-time quantitative PCR (qPCR) reactions were performed in a CFX 384 real-time
310 PCR detection system (BioRad) using the advanced qPCR Mastermix (Wisent Bioproducts,
311 St-Bruno, QC, CA). Primers were designed based on swine sequences available in GenBank
312 (Table 1) and synthesized by IDT (Windsor, ON, CA). Samples were run in duplicates and
313 the standard curve method was used to determine the abundance of mRNA for each gene and
314 expression was normalized to the mean abundance of the internal control genes *Beta actin* and
315 *Gapdh*. All reactions had efficiency between 90 and 110%, $r^2 \geq 0.98$ and slope values from -
316 3.6 to -3.1. Dissociation curve analyses were performed to validate the specificity of the
317 amplification products.
318
319 *Statistical Analysis*
320 Data were analyzed using the JMP software (SAS Institute Inc., Cary, NC). The
321 proportion of oocytes or embryos presenting nuclear localization of the different proteins was
322 analyzed by Chi-square. At least 3 replicates and 18 embryos were used per group. Analysis

of variance (ANOVA) was used to analyze pixel signals and number of nuclei. Means were compared using Student's t-test or Tukey's HSD test. Pixel values were normalized for each stage of development and for each protein using control samples that were exposed to IgG control antibodies. The value obtained for each stage was subtracted by the mean pixel values of the corresponding control group. Differences in transcript levels were analyzed by multi-comparison test using LSMeans Student t-test. Data were tested for normal distribution using Shapiro-Wilk test. Results are presented as means ± SEM, and $P<0.05$ was considered statistically significant.

Acknowledgments

The authors are thankful to Olymel S.E.C. / L.P. for donation of porcine ovaries. W.G. is thankful for the scholarship financial support of the by the Brazilian council of Scientific and Technological Development (CNPq). This study was financially supported by the Natural Sciences and Engineering Research Council (NSERC) of Canada. The authors declare that there are no conflicts of interest.

References

Abeydeera LR, Day BN. 1997. Fertilization and subsequent development in vitro of pig oocytes inseminated in a modified tris-buffered medium with frozen-thawed ejaculated spermatozoa. Biol Reprod 57:729-734.

Alexander JM, Hota SK, He D, Thomas S, Ho L, Pennacchio LA, Bruneau BG. 2015. Brg1 modulates enhancer activation in mesoderm lineage commitment. Development 142:1418-1430.

Algriany O, Bevers M, Schoevers E, Colenbrander B, Dieleman S. 2004. Follicle size-dependent effects of sow follicular fluid on in vitro cumulus expansion, nuclear maturation and blastocyst formation of sow cumulus oocytes complexes. Theriogenology 62:1483-1497.

Bagg MA, Nottle MB, Armstrong DT, Grupen CG. 2007. Relationship between follicle size and oocyte developmental competence in prepubertal and adult pigs. Reprod Fertil Dev 19:797-803.

Beaujean N. 2014a. Epigenetics, embryo quality and developmental potential. Reprod Fertil Dev 27:53-62.

355 Beaujean N. 2014b. Histone post-translational modifications in preimplantation mouse
356 embryos and their role in nuclear architecture. Mol Reprod Dev 81:100-112.
357 Bohrer RC, Coutinho AR, Duggavathi R, Bordignon V. 2015. The Incidence of DNA Double-
358 Strand Breaks Is Higher in Late-Cleaving and Less Developmentally Competent
359 Porcine Embryos. Biol Reprod 93:59.
360 Bos-Mikich A, Mattos AL, Ferrari AN. 2001. Early cleavage of human embryos: an effective
361 method for predicting successful IVF/ICSI outcome. Hum Reprod 16:2658-2661.
362 Bultman SJ, Gebuhr TC, Pan H, Svoboda P, Schultz RM, Magnuson T. 2006. Maternal BRG1
363 regulates zygotic genome activation in the mouse. Genes Dev 20:1744-1754.
364 Butuci M, Williams AB, Wong MM, Kramer B, Michael WM. 2015. Zygotic Genome
365 Activation Triggers Chromosome Damage and Checkpoint Signaling in C. elegans
366 Primordial Germ Cells. Dev Cell 34:85-95.
367 Cao S, Han J, Wu J, Li Q, Liu S, Zhang W, Pei Y, Ruan X, Liu Z, Wang X, Lim B, Li N.
368 2014. Specific gene-regulation networks during the pre-implantation development of
369 the pig embryo as revealed by deep sequencing. BMC Genomics 15:4.
370 Carey TS, Cao Z, Choi I, Ganguly A, Wilson CA, Paul S, Knott JG. 2015. BRG1 Governs
371 Nanog Transcription in Early Mouse Embryos and Embryonic Stem Cells via
372 Antagonism of Histone H3 Lysine 9/14 Acetylation. Mol Cell Biol 35:4158-4169.
373 Che L, Lalonde A, Bordignon V. 2007. Chemical activation of parthenogenetic and nuclear
374 transfer porcine oocytes using ionomycin and strontium chloride. Theriogenology
375 67:1297-1304.
376 Cheedipudi S, Genolet O, Dobreva G. 2014. Epigenetic inheritance of cell fates during
377 embryonic development. Front Genet 5:19.
378 Ciccone DN, Su H, Hevi S, Gay F, Lei H, Bajko J, Xu G, Li E, Chen T. 2009. KDM1B is a
379 histone H3K4 demethylase required to establish maternal genomic imprints. Nature
380 461:415-418.
381 Coutinho AR, Assumpcao ME, Bordignon V. 2011. Presence of cleaved caspase 3 in swine
382 embryos of different developmental capacities produced by parthenogenetic
383 activation. Mol Reprod Dev 78:673-683.
384 Donnison M, Pfeffer PL. 2004. Isolation of genes associated with developmentally competent
385 bovine oocytes and quantitation of their levels during development. Biol Reprod
386 71:1813-1821.
387 Dumesic DA, Meldrum DR, Katz-Jaffe MG, Krisher RL, Schoolcraft WB. 2015. Oocyte
388 environment: follicular fluid and cumulus cells are critical for oocyte health. Fertil
389 Steril 103:303-316.
390 Fair T. 2010. Mammalian oocyte development: checkpoints for competence. Reprod Fertil
391 Dev 22:13-20.
392 Fair T, Hyttel P, Greve T. 1995. Bovine oocyte diameter in relation to maturational
393 competence and transcriptional activity. Mol Reprod Dev 42:437-442.
394 Foster CT, Dovey OM, Lezina L, Luo JL, Gant TW, Barlev N, Bradley A, Cowley SM. 2010.
395 Lysine-specific demethylase 1 regulates the embryonic transcriptome and CoREST
396 stability. Mol Cell Biol 30:4851-4863.
397 Gao Y, Hyttel P, Hall VJ. 2010. Regulation of H3K27me3 and H3K4me3 during early
398 porcine embryonic development. Mol Reprod Dev 77:540-549.
399 Glaros S, Cirrincione GM, Palanca A, Metzger D, Reisman D. 2008. Targeted knockout of
400 BRG1 potentiates lung cancer development. Cancer research 68:3689-3696.
401 Hay-Schmidt A, Viuff D, Greve T, Hyttel P. 2001. Transcriptional activity in in vivo
402 developed early cleavage stage bovine embryos. Theriogenology 56:167-176.
403 Henrique Barreta M, Garziera Gasperin B, Braga Rissi V, de Cesaro MP, Ferreira R, de
404 Oliveira JF, Goncalves PB, Bordignon V. 2012. Homologous recombination and non-

405 homologous end-joining repair pathways in bovine embryos with different
406 developmental competence. Exp Cell Res 318:2049-2058.
407 Hyttel P, Laurincik J, Rosenkranz C, Rath D, Niemann H, Ochs RL, Schellander K. 2000.
408 Nucleolar proteins and ultrastructure in preimplantation porcine embryos developed in
409 vivo. Biol Reprod 63:1848-1856.
410 Isom SC, Li RF, Whitworth KM, Prather RS. 2012. Timing of first embryonic cleavage is a
411 positive indicator of the in vitro developmental potential of porcine embryos derived
412 from in vitro fertilization, somatic cell nuclear transfer and parthenogenesis. Mol
413 Reprod Dev 79:197-207.
414 Kanka J, Nemcova L, Toralova T, Vodickova-Kepkova K, Vodicka P, Jeseta M, Machatkova
415 M. 2012. Association of the transcription profile of bovine oocytes and embryos with
416 developmental potential. Anim Reprod Sci 134:29-35.
417 Keefe D, Kumar M, Kalmbach K. 2015. Oocyte competency is the key to embryo potential.
418 Fertil Steril 103:317-322.
419 Kidder BL, Palmer S, Knott JG. 2009. SWI/SNF-Brg1 regulates self-renewal and occupies
420 core pluripotency-related genes in embryonic stem cells. Stem Cells 27:317-328.
421 Kim SI, Bresnick EH, Bultman SJ. 2009. BRG1 directly regulates nucleosome structure and
422 chromatin looping of the alpha globin locus to activate transcription. Nucleic Acids
423 Res 37:6019-6027.
424 Klose RJ, Zhang Y. 2007. Regulation of histone methylation by demethylimination and
425 demethylation. Nat Rev Mol Cell Biol 8:307-318.
426 Kobayashi T, Kato Y, Tsunoda Y. 2004. Effect of the timing of the first cleavage on the
427 developmental potential of nuclear-transferred mouse oocytes receiving embryonic
428 stem cells. Theriogenology 62:854-860.
429 Labrecque R, Sirard MA. 2014. The study of mammalian oocyte competence by
430 transcriptome analysis: progress and challenges. Mol Hum Reprod 20:103-116.
431 Lee MT, Bonneau AR, Giraldez AJ. 2014. Zygotic genome activation during the maternal-to-
432 zygotic transition. Annu Rev Cell Dev Biol 30:581-613.
433 Liu X, Secombe J. 2015. The Histone Demethylase KDM5 Activates Gene Expression by
434 Recognizing Chromatin Context through Its PHD Reader Motif. Cell Rep 13:2219-
435 2231.
436 Mason K, Liu Z, Aguirre-Lavin T, Beaujean N. 2012. Chromatin and epigenetic
437 modifications during early mammalian development. Anim Reprod Sci 134:45-55.
438 Moussa M, Shu J, Zhang XH, Zeng F. 2015. Maternal control of oocyte quality in cattle "a
439 review". Anim Reprod Sci 155:11-27.
440 Ostrup O, Andersen IS, Collas P. 2013a. Chromatin-linked determinants of zygotic genome
441 activation. Cell Mol Life Sci 70:1425-1437.
442 Ostrup O, Olbricht G, Ostrup E, Hyttel P, Collas P, Cabot R. 2013b. RNA profiles of porcine
443 embryos during genome activation reveal complex metabolic switch sensitive to in
444 vitro conditions. PLoS One 8:e61547.
445 Park CH, Lee SG, Choi DH, Lee CK. 2009. A modified swim-up method reduces polyspermy
446 during in vitro fertilization of porcine oocytes. Anim Reprod Sci 115:169-181.
447 Seneda MM, Godmann M, Murphy BD, Kimmins S, Bordignon V. 2008. Developmental
448 regulation of histone H3 methylation at lysine 4 in the porcine ovary. Reproduction
449 135:829-838.
450 Shao GB, Ding HM, Gong AH. 2008. Role of histone methylation in zygotic genome
451 activation in the preimplantation mouse embryo. In Vitro Cell Dev Biol Anim 44:115-
452 120.
453 Shi Y. 2007. Histone lysine demethylases: emerging roles in development, physiology and
454 disease. Nat Rev Genet 8:829-833.

455 Shi Y, Lan F, Matson C, Mulligan P, Whetstine JR, Cole PA, Casero RA, Shi Y. 2004.
456 Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1. Cell
457 119:941-953.
458 Siklenka K, Erkek S, Godmann M, Lambrot R, McGraw S, Lafleur C, Cohen T, Xia J,
459 Suderman M, Hallett M, Trasler J, Peters AH, Kimmins S. 2015. Disruption of histone
460 methylation in developing sperm impairs offspring health transgenerationally. Science
461 350:aab2006.
462 Suzuki H, Saito Y, Kagawa N, Yang X. 2003. In vitro fertilization and polyspermy in the pig:
463 factors affecting fertilization rates and cytoskeletal reorganization of the oocyte.
464 Microsc Res Tech 61:327-334.
465 Trotter KW, Archer TK. 2008. The BRG1 transcriptional coregulator. Nucl Recept Signal
466 6:e004.
467 Wang J, Gu H, Lin H, Chi T. 2012. Essential roles of the chromatin remodeling factor BRG1
468 in spermatogenesis in mice. Biol Reprod 86:186.
469 Wang J, Hevi S, Kurash JK, Lei H, Gay F, Bajko J, Su H, Sun W, Chang H, Xu G, Gaudet F,
470 Li E, Chen T. 2009. The lysine demethylase LSD1 (KDM1) is required for
471 maintenance of global DNA methylation. Nat Genet 41:125-129.
472 Wang J, Scully K, Zhu X, Cai L, Zhang J, Prefontaine GG, Krones A, Ohgi KA, Zhu P,
473 Garcia-Bassets I, Liu F, Taylor H, Lozach J, Jayes FL, Korach KS, Glass CK, Fu XD,
474 Rosenfeld MG. 2007. Opposing LSD1 complexes function in developmental gene
475 activation and repression programmes. Nature 446:882-887.
476 Wong CC, Loewke KE, Bossert NL, Behr B, De Jonge CJ, Baer TM, Reijo Pera RA. 2010.
477 Non-invasive imaging of human embryos before embryonic genome activation
478 predicts development to the blastocyst stage. Nat Biotechnol 28:1115-1121.
479 Yoshioka K, Suzuki C, Tanaka A, Anas IM, Iwamura S. 2002. Birth of piglets derived from
480 porcine zygotes cultured in a chemically defined medium. Biol Reprod 66:112-119.

481

482 **List of figures**

483 **Figure 1**. A) Nuclear localization of BRG1 and KDM1A in mature metaphase II stage
484 oocytes and IVF embryos ad different stages of development. B) Representative images of
485 metaphase II and embryos stained for BRG1 and KDM1A.

486 **Figure 2**. Immunofluorescence signal for BRG1 and KDM1A proteins in days 3-4 and 6-7 of
487 embryo development in IVF and PA embryos. Different letters indicate statistical difference
488 between developmental stages within the same group (IVF or PA).

489 **Figure 3**. Rates of cleavage (A), embryo development (B), and average number of cell nuclei
490 (C) in early- and late-cleaving embryos. Superscripts (* or letters) indicate statistical
491 difference between early- and late-cleaving embryos.

492 **Figure 4**. Transcript levels of Brg1, Kdm1A and H3K4 histone demethylases (Kdm1B,

493 Kdm5A, Kdm5B and Kdm5C) genes in early- and late-cleaving embryos at different stages of
494 development. Different letters indicate statistical differences between groups.

495 **Figure 5**. A) Immunofluorescence signal for H3K4me and H3K4me2 in early- and late-
496 cleaving embryos at days 3-4 of development. Different letters indicate statistical difference
497 between early- and late-cleaving embryos. B) Representative images of early- and late-
498 cleaving embryos stained for H3K4me and H3K4me2.

499 **Figure 6**. Immunofluorescence signal for BRG1, KDM1A, H3K4me and H3K4me2 in
500 embryos at days 3-4 of development according to the number of cells. Different letters
501 indicate statistical differences between groups.

Table 1. List of primers used for detection and quantification of gene transcripts.

Gene	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')	Acession Number
Brg1	ATTTGCGAACCAAAGCGACC	TGTAGGCCTTGGCATTGAGG	(*)
Kdm1A	TCGTGTGGGTGGAAGAGTTG	CTTGTTTGCTGACCACAGCC	NM_001112687.1
Kdm1B	GGAATCTCATCCTCGCCCTG	GATGAGACCTTTCCGCGTCA	(#)
Kdm5A	TTGCCACAGACGAACTCTCC	AGCAGCTTTCTGGAGCTCTG	XM_013997855.1
Kdm5B	GACGTGTGCCAGTTTTGGAC	TCGAGGACACAGCACCTCTA	XM_005668019.2
Kdm5C	GGCATGGTCTTCTCAGCCTT	TGAGGGTACCCCATACCAGG	NM_001097433.1
Gapdh	ATTGCCCTCAACGACCACTT	GGCTCTTACTCCTTGGAGGC	NM_001206359.1
Actb	TGTGGATCAGCAAGCAGGAGT	TGCGCAAGTTAGGTTTTGTCA	XM_003124280.3

*Homologous region between 7 transcripts: XM_013994690.1; XM_013994689.1; XM_005661255.2; XM_013994688.1; XM_013994687.1; XM_013994691.1; XM_013994692.1

#Homologous region between 2 transcripts: XM_013977460.1; XM_001927844.4

Figure 1.

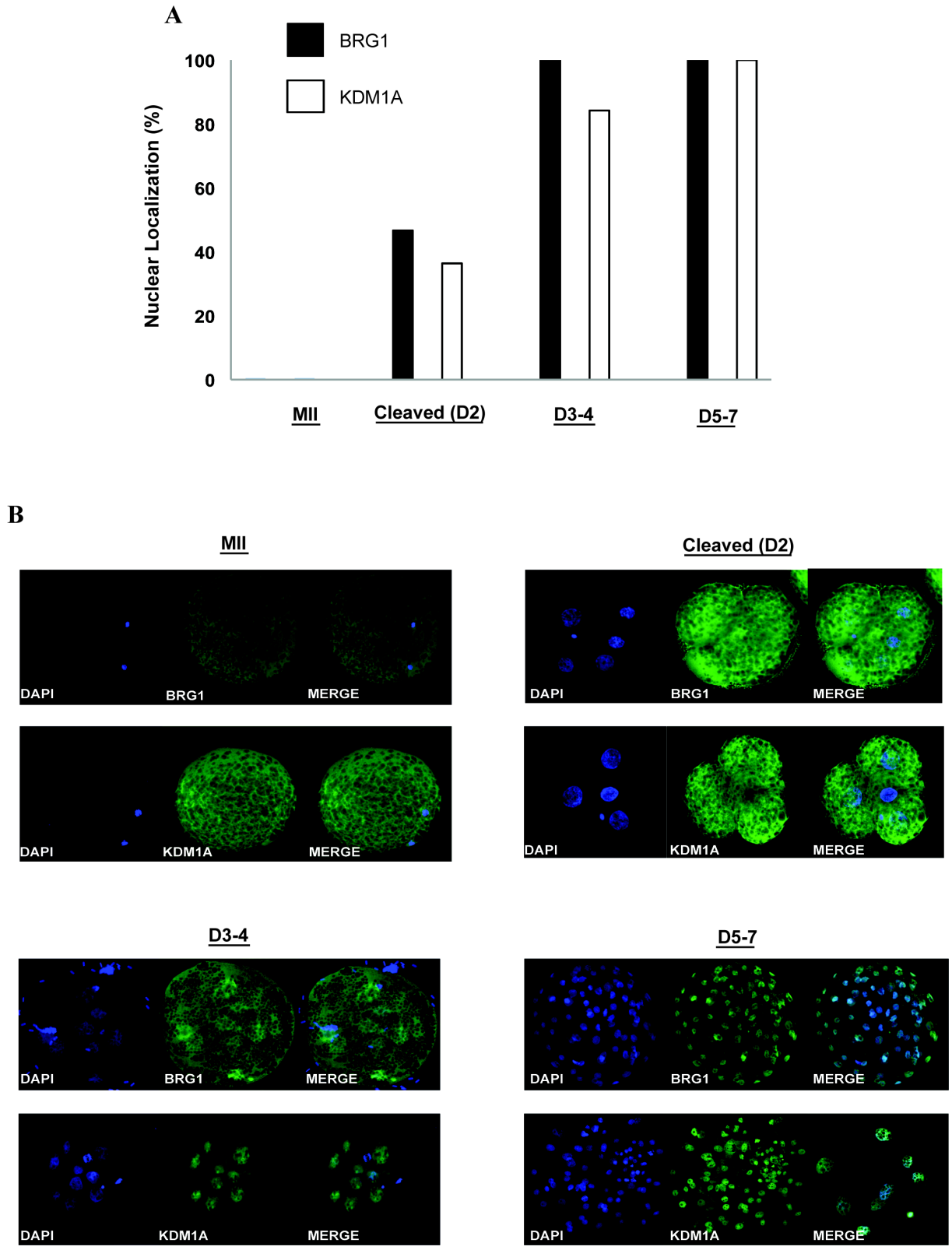

A
BRG1
KDM1A
Nuclear Localization (%)
100
80
60
40
20
0
MII
Cleaved (D2)
D3-4
D5-7
B
MII
Cleaved (D2)
DAPI
BRG1
MERGE
DAPI
KDM1A
MERGE
DAPI
BRG1
MERGE
DAPI
KDM1A
MERGE
D3-4
D5-7
DAPI
BRG1
MERGE
DAPI
KDM1A
MERGE
DAPI
BRG1
MERGE
DAPI
KDM1A
MERGE

Figure 2.

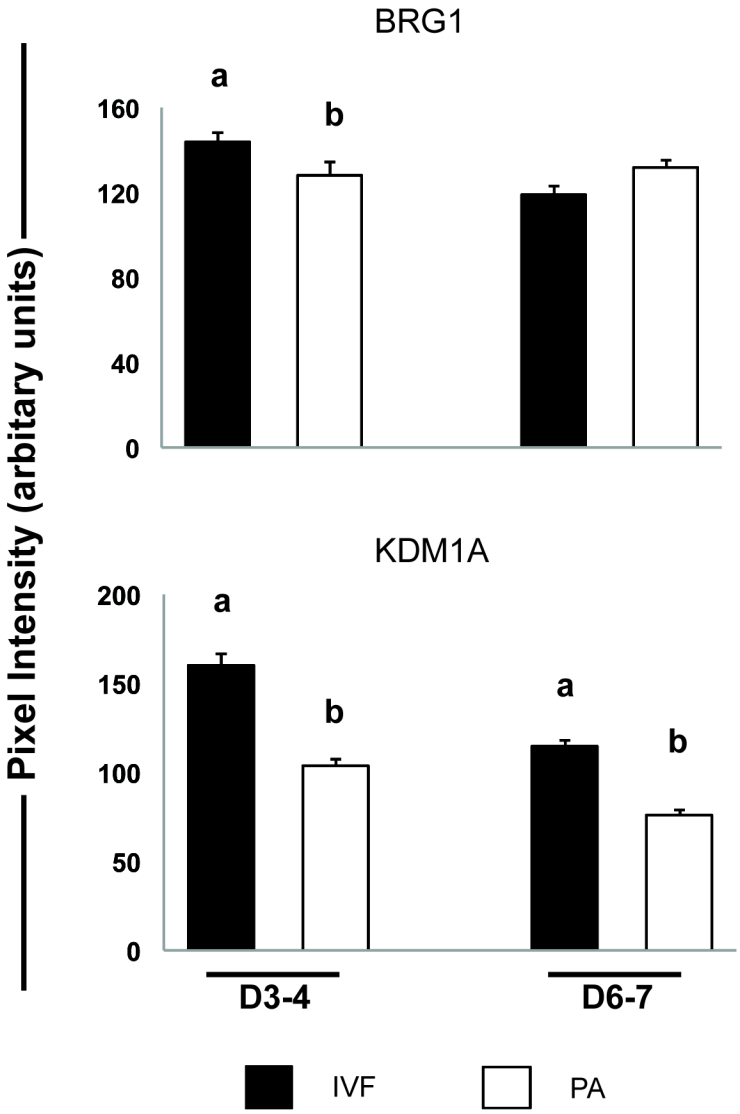

BRG1
a
b
160
120
80
40
0
KDM1A
a
b
a
b
200
150
100
50
0
Pixel Intensity (arbitary units)
D3-4
D6-7
IVF
PA

Figure 3.

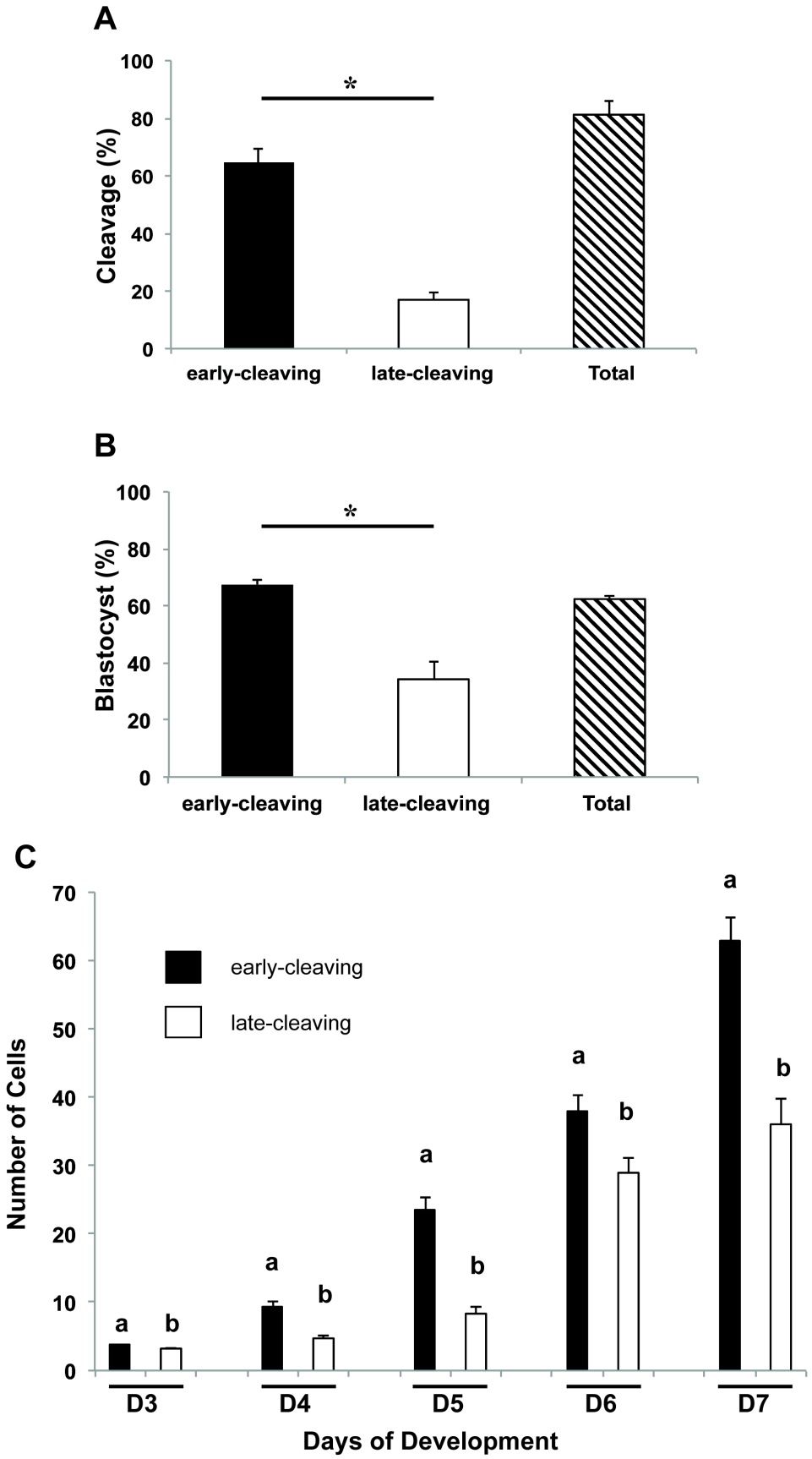

A
100
80
60
40
20
0
Cleavage (%)
*
early-cleaving
late-cleaving
Total
B
100
80
60
40
20
0
Blastocyst (%)
*
early-cleaving
late-cleaving
Total
C
70
60
50
40
30
20
10
0
Number of Cells
early-cleaving
late-cleaving
a
b
a
b
a
b
a
b
a
b
D3
D4
D5
D6
D7
Days of Development

Figure 4.

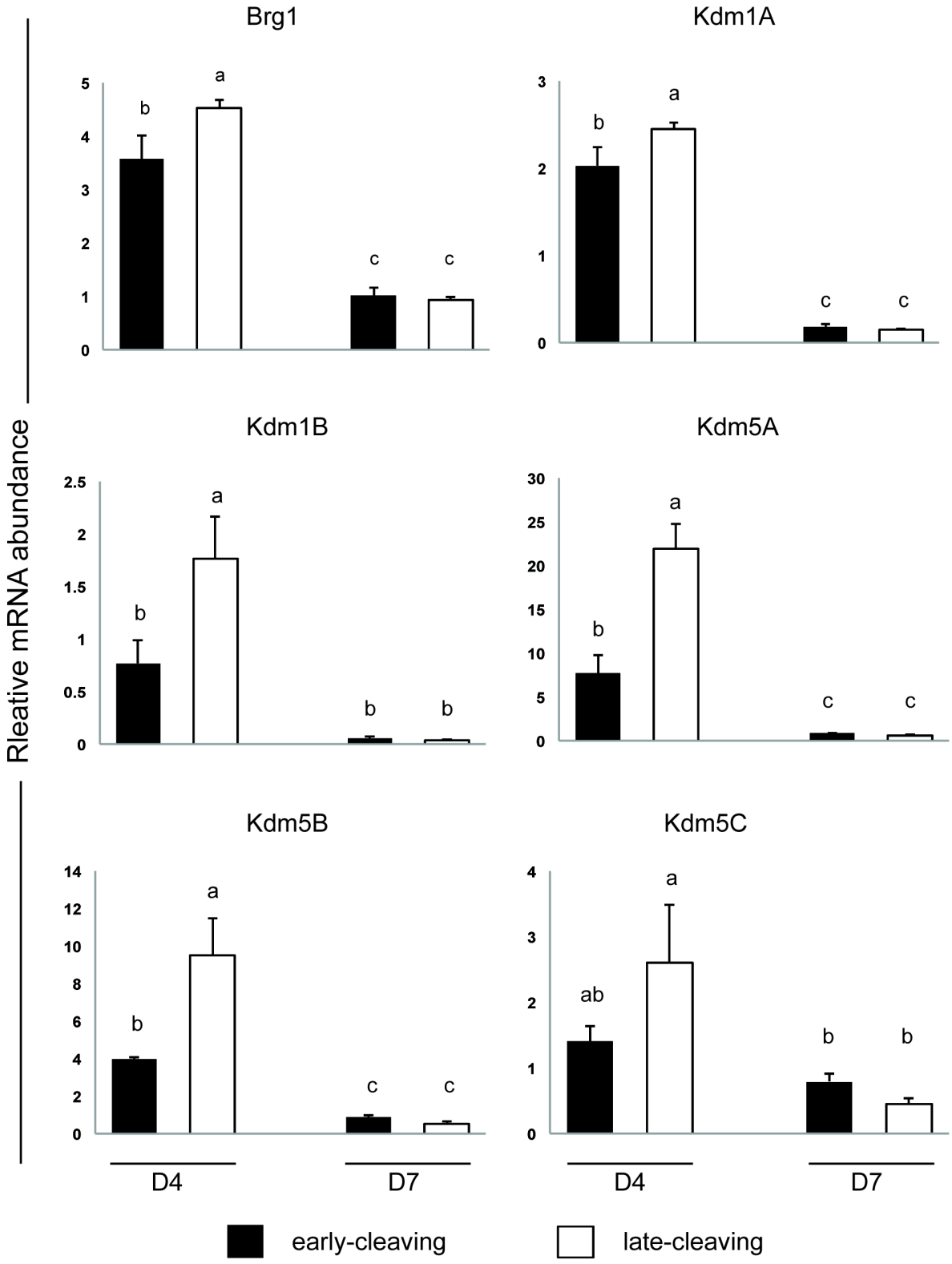

Brg1
Kdm1A
Kdm1B
Kdm5A
Kdm5B
Kdm5C
Rleative mRNA abundance
D4
D7
early-cleaving
late-cleaving

Figure 5.

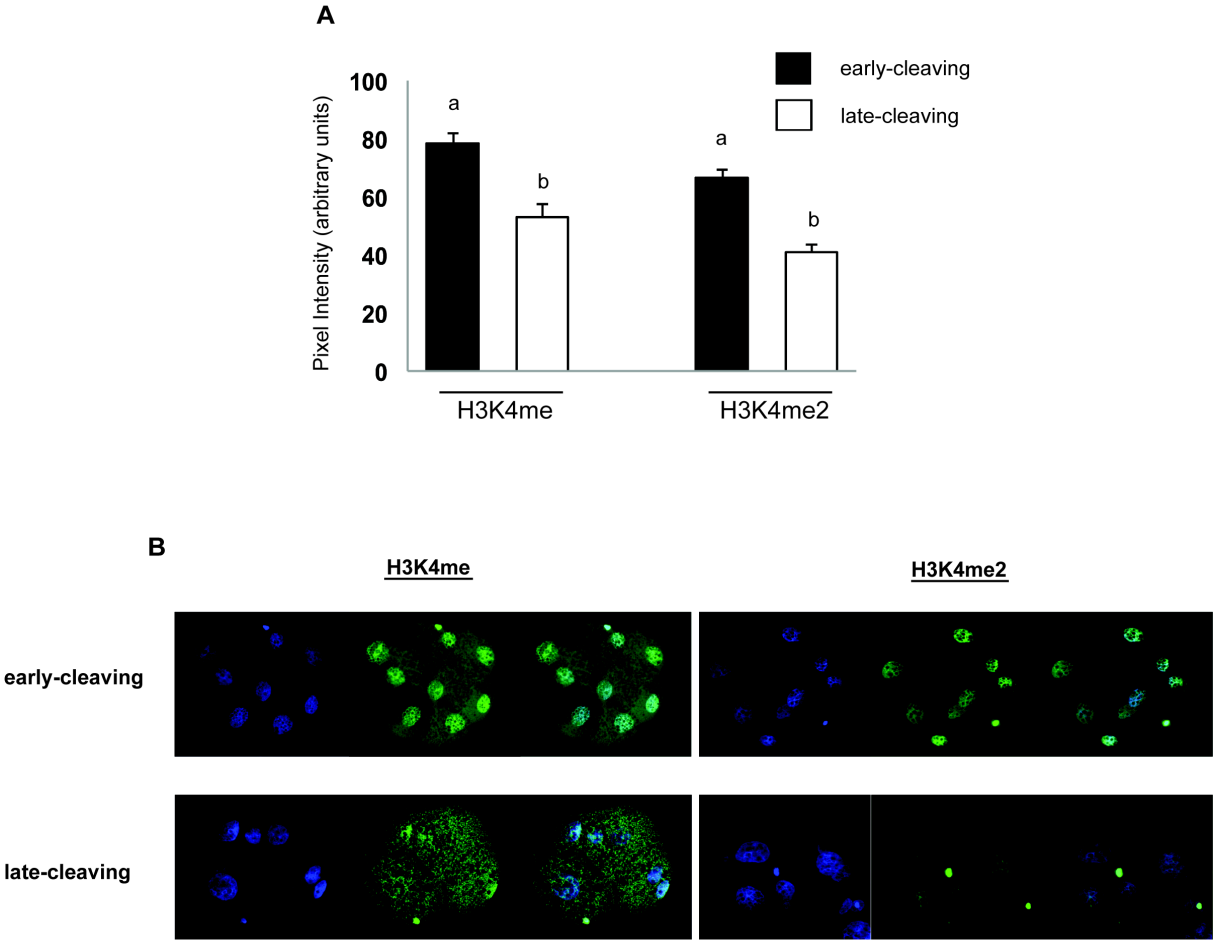
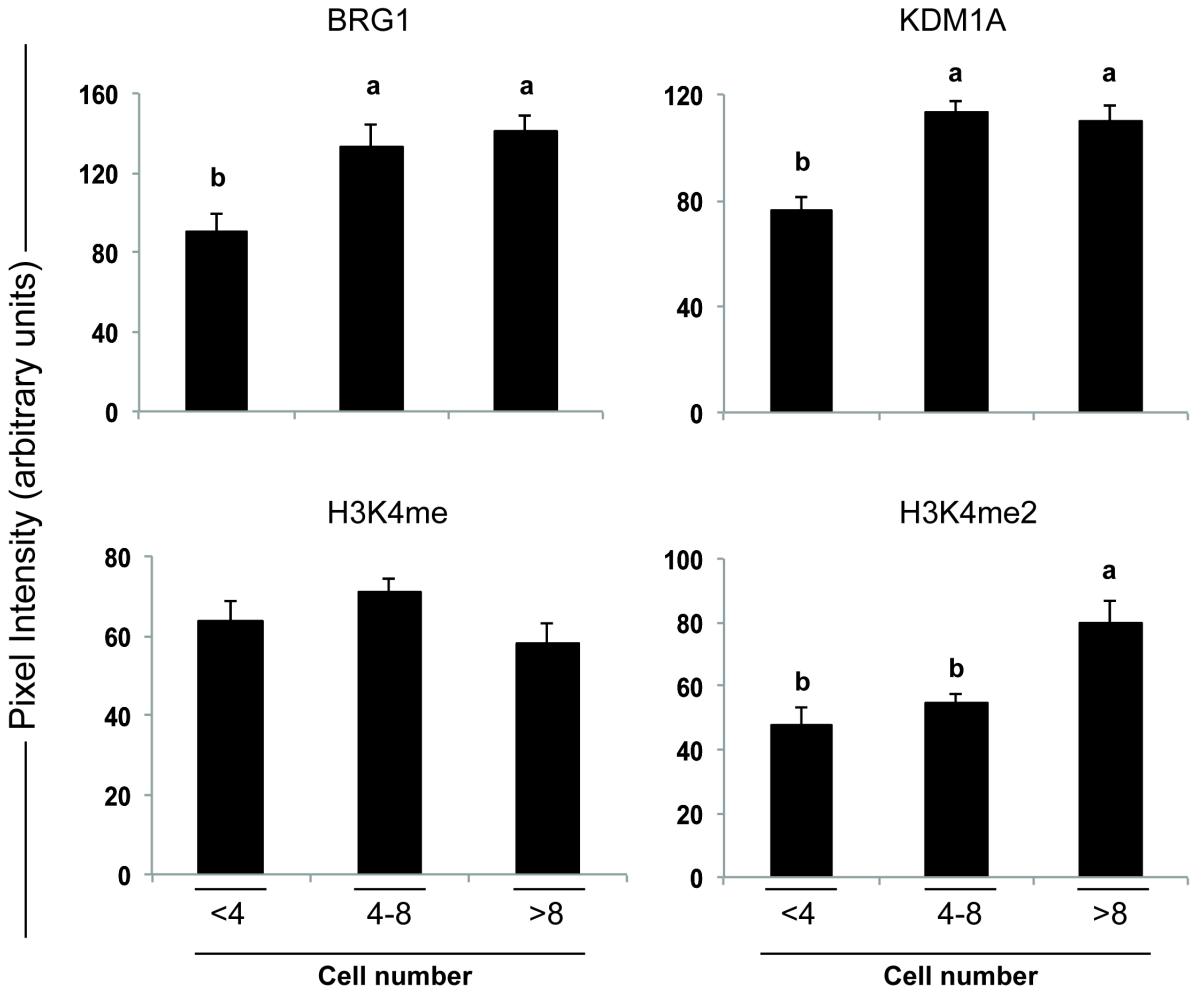

A
Pixel Intensity (arbitrary units)
100
80
60
40
20
0
a
b
a
b
early-cleaving
late-cleaving
H3K4me
H3K4me2
B
H3K4me
H3K4me2
early-cleaving
late-cleaving

Figure 6.


BRG1
KDM1A
H3K4me
H3K4me2
Pixel Intensity (arbitrary units)
Cell number
Cell number
<4
4-8
>8
a
b

3. DISCUSSÃO

O número de estudos mostrando a relação dos eventos epigenéticos na regulação dos processos biológicos e consequentemente reprodutivos é crescente. Sejam esses indícios em processos fisiológicos como o desenvolvimento embrionário ou em processos indiretos como a reprogramação celular por SCNT ou para geração de iPSC. Na área da reprogramação celular, visando principalmente a obtenção de células iPSC, células passíveis de serem utilizadas para diferenciação celular, o modelo suíno representa um dos melhores modelos animais. O suíno é uma espécie que tem sido amplamente utilizada em estudos de SCNT para geração de animais transgênicos, na pesquisa e produção de modelos biomédicos e fontes de órgãos para xenotransplantes (PHELPS et al., 2003; LUTZ et al., 2013; YAO et al., 2014; GUTIERREZ et al., 2015). No primeiro estudo, portanto, utilizando oócitos suínos em estádio de vesícula germinativa, foi produzido um extrato de oócitos. Fibroblastos de suínos neonatos foram eletroporados e tratados com o extrato produzido, na proporção de 1:10, e cultivados em meio de manutenção de células indiferenciadas. Sabe-se que o oócito é rico em fatores responsáveis pela remodelação da cromatina e pela reprogramação celular (ALLEGRUCCI et al., 2011; AWE & BYRNE, 2013; JULLIEN et al., 2014). Além disso, esse potencial do oócito é mais do que provado pelo sucesso na SCNT. Sendo assim, hipotetizamos que adicionando esses fatores dentro do oócito eles remodelariam a cromatina e reprogramariam as células tratadas. Nossos resultados nos permitiram observar formação de colônias semelhantes à células-tronco que começaram a se originar a partir de duas semanas de cultivo (aproximadamente 16 dias) e após a primeira passagem. Esse aparecimento reduziu qualquer possibilidade de que as colônias pudessem ser algum resíduo de oócitos remanescentes, uma vez que só foram visualizadas após a primeira passagem. A esse delineamento, foi adicionada a associação ou não de um inibidor de deacetilase, Scriptaid. Os inibidores de deacetilases foram descritos por melhorar taxas de clonagem em varias espécies e também a reclonagem (VAN THUAN et al., 2009; WANG et al., 2011; XU et al., 2013; WEN et al., 2014), e têm um efeito ciclo celular dependente na SCNT de suínos (et al., 2016), no entanto, nenhum efeito foi observado sobre número e/ou morfologia das colônias.

Sobre a modulação gênica, foi observado que o extrato de oócitos modula parcialmente alguns genes de pluripotência celular como o *Nanog*, *Rex*1 e o c-*Myc*, tanto nas células tratadas, quanto nas colônias formadas. Esses genes de pluripotência que sofrem modulação parecem interagir com o PcG, principalmente o *Ezh*2 durante a aquisição e

manutenção de pluripotência celular (VILLASANTE et al., 2011; NERI et al., 2012; GAGLIARDI et al., 2013; SON et al., 2013; BENETATOS et al., 2014; KREPELOVA et al., 2014; RAO et al., 2015). Esses dados sugerem que as células adquiriram, algum grau de pluripotência celular, o que não foi mantido, provavelmente devido a falha na ativação de todos os genes como por exemplo, o *Oct*4. Isso pode ser explicado, uma vez que estudos mostram que os fatores de pluripotência atuam sobre os seus próprios promotores atuando em sinergia (BOYER et al., 2005; JAENISCH & YOUNG, 2008). Desta forma, a total pluripotência depende da ativação endógena de todos os genes. Uma vez que não observamos a ativação endógena completa do *Oct*4, por exemplo, esse pode ter sido um ponto crucial no fato da reprogramação ter sido parcial, considerando que esse gene parece ter um efeito central na reprogramação. Após a observação da ativação parcial dos genes de pluripotência, resolvemos investigar qual a regulação dos transcritos de alguns membros do PcG e da *Dnmt*1. Observamos uma redução dos níveis de RNAm para os genes *Ezh*2 e *Dnmt*1, logo após o tratamento, o que corrobora mais uma vez com um perfil de reprogramação parcial. A redução dos níveis de metilação é essencial para redução da memória epigenética, e a *Dnmt*1 é a principal enzima responsável pela manutenção dos níveis da metilação (MOHAN & CHAILLET, 2013). Além disso, o gene *Ezh*2 é responsável por apagar a memória epigenética da H3K27me3 (RAO et al., 2015) facilitando desta forma a geração das iPSC. Desta forma é possível concluir que tanto a memória epigenética do DNA como a relacionada à H3K27 foi parcialmente, senão completamente removida.

Estudos bem recentes têm demonstrado que um dos fatores determinantes para reprogramação tem sido a trimetilacão da H3K9 (CHEN et al., 2013b; MATOBA et al., 2014; CHUNG et al., 2015). Essa memória epigenética seria uma das principais barreiras tanto na SCNT como na geração de iPSC. Em um desses estudos, os pesquisadores removeram a trimetilação da H3K9 em embriões clonados após a fusão aumentando seus índices de desenvolvimento embrionário em mais de 60%. Esses dados foram conseguidos através da adição de RNAm de uma demetilase. Além disso, o RNA não foi adicionado às células e sim aos embriões dentro do ambiente oocitário. Esses dados sugerem que a reprogramação possa ser devido a uma cooperação de fatores presentes no oócito e as demetilase utilizada por esses pesquisadores. No presente estudo (artigo 1), nós avaliamos a expressão das KDM6A e 6B e não observamos nenhuma diferença em relação a nenhum tratamento. No entanto, a mesma demetilase utilizada no estudo (KDM4) pelos pesquisadores não foi expressa ou não foi detectada em nosso estudo. Isso nos leva a crer, que uma das possibilidades de não termos conseguido obter uma plena reprogramação em nossas células seja devido a não remoção da

memória epigenética relacionada aos padrões de metilação da H3K9. Desta forma, mais estudos são necessários relacionando demetilases que removam a memória epigenética relacionada a H3K9 associadas ao extrato do oócito para obtenção de células, talvez com um caráter de plena reprogramação e com plena ativação dos marcadores de pluripotência.

No segundo estudo descrito nesta tese, nós primeiramente avaliamos a presença nuclear de duas proteínas essencias, BRG1 e KDM1A, para o remodelamento da cromatina e envolvimento na regulação epigenética durante o desenvolvimento embrionário de embriões suínos produzidos por FIV (fertilização *in vitro*). O BRG1 e a KDM1A são importantes reguladores da atividade transcricional e moduladores da expressão gênica (KLOSE & ZHANG, 2007; SHI, 2007; TROTTER & ARCHER, 2008). Não foi observada marcação nuclear em oócitos maturados, em estádio de metáfase II, e pouca marcação foi observada em embriões no dia D2 do desenvolvimento embrionário. No entanto, nos dias D3-4, que coincide com o período que compreende a transição materno-zigótica e ativação do genoma do embrião, que em suínos ocorre entre 4-8 células (HYTTEL et al., 2000; CAO et al., 2014), ocorreu um grande aumento nessas proteínas, estando visivelmente presentes nos núcleos das células dos embriões. Esse padrão se seguiu ao longo do desenvolvimento. Esses dados sugerem que no momento que o embrião dá inicio a atividade de transcrição, esses fatores se dirigem ao núcleo, para remodelar a cromatina e facilitar o acesso de vários outros co-fatores e proteínas, aos promotores de genes específicos. Sabe-se que esses fatores interagem com fatores de transcrição ou outras proteínas modificadoras de histonas para modular a atividade gênica (SHI, 2007; TROTTER & ARCHER, 2008).

A utilização de embriões partenogeneticamente ativados (PA) concomitante com o uso de dados de clivagem tem sido usado com um confiável modelo de desenvolvimento (BASTOS et al., 2008; COUTINHO et al., 2011; BOHRER et al., 2015). Portanto, utilizando esse modelo, avaliamos a regulação desses fatores (BRG1 e KDM1A), níveis de H3K4me e H3K4me2 e demais demetilases reguladores da H3K4 em embriões com diferentes potencias de desenvolvimento. Observamos uma tendência geral de maiores níveis de RNAm no D4 em embrião que clivam mais tarde (entre 24-48hs) para todos os genes analisados, no entanto, no D7 nenhuma diferença foi observada. Esses dados corroboram com análises feitas para outros genes em outro estudo, com diferentes objetivos. Nesse estudo, os autores observaram diferenças nos níveis de expressão para todos os genes analisados somente no D5, porém, nenhuma diferença foi encontrada no D7 (BOHRER et al., 2015). Além disso, existem evidências de que embriões com menor competência tendem a ter uma atividade transcricional prematura (BASTOS et al., 2008). No entanto, outra explicação poderia ser que

justamente por serem embriões que clivam mais tarde, estarem ativando o genoma mais tarde, em relação aos com maior potencial de desenvolvimento, esse aumento seria um reflexo do atraso.

Ainda no segundo estudo, avaliamos também os níveis de H3K4me e H3K4me2, que juntamente com a H3K4m3 participam na ativação do genoma embrionário (OSTRUP et al., 2013). Os níveis de ambas as proteínas se mostraram reduzidos nos embriões com menor desenvolvimento embrionário. No entanto, a H3K4me2 se mostrou mais abundante conforme o número de células no embrião aumenta. Esses dados podem sugerir que os embriões com menor desenvolvimento embrionário tem menores níveis de metilação, o que está diretamente relacionado com a ativação do genoma. Além disso, embriões com menor desenvolvimento também apresentam menor número de células.

4. CONCLUSÃO

O presente trabalho conclui que o extrato de oócitos suínos em estádio de vesícula germinativa é capaz de induzir uma reprogramação parcial em células somáticas ativando parcialmente genes de pluripotência e moduladores de cromatina sugerindo um grau de perda da memória epigenética nessas células tratadas. O trabalho demonstrou ainda que fatores reguladores da atividade transcricional como o BRG1 e a KDM1A estão predominantemente presentes no núcleo celular durante o período da ativação do genoma embrionário sendo regulados durante seu desenvolvimento, exercendo um papel importante para o potencial e a competência para o desenvolvimento embrionário.

REFERÊNCIAS

ALBERIO, R., et al. Differential nuclear remodeling of mammalian somatic cells by Xenopus laevis oocyte and egg cytoplasm. **Exp Cell Res**, v.307, n.1, p.131-41. 2005. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15922733%3E. Acesso em: 20 abr. 2015. doi: 10.1016/j.yexcr.2005.02.028.

ALEXANDER, J. M., et al. Brg1 modulates enhancer activation in mesoderm lineage commitment. **Development**, v.142, n.8, p.1418-30. 2015. Disponível em: <http://dev.biologists.org/content/develop/142/8/1418.full.pdf%3E. Acesso em: 25 abr. 2015. doi: 10.1242/dev.109496.

ALGRIANY, O., et al. Follicle size-dependent effects of sow follicular fluid on in vitro cumulus expansion, nuclear maturation and blastocyst formation of sow cumulus oocytes complexes. **Theriogenology**, v.62, n.8, p.1483-97. 2004. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15451257. Acesso em: 12 jun. 2014. doi: 10.1016/j.theriogenology.2004.02.008.

ALLEGRUCCI, C., et al. Epigenetic reprogramming of breast cancer cells with oocyte extracts. **Mol Cancer**, v.10, n.1, p.7. 2011. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21232089%3E. Acesso em: 20 abr. 2015. doi: 10.1186/1476-4598-10-7.

ALOIA, L., et al. Polycomb complexes in stem cells and embryonic development. **Development**, v.140, n.12, p.2525-34. 2013. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23715546. Acesso em: 25 abr. 2014. doi: 10.1242/dev.091553.

AMARIGLIO, N., et al. Donor-derived brain tumor following neural stem cell transplantation in an ataxia telangiectasia patient. **PLoS Med**, v.6, n.2, p.e1000029. 2009. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19226183%3E. Acesso em: 15 jun. 2015. doi: 07-PLME-RA-1020 [pii]10.1371/journal.pmed.1000029.

ANTONY, J., et al. Transient JMJD2B-mediated reduction of H3K9me3 levels improves reprogramming of embryonic stem cells into cloned embryos. **Mol Cell Biol**, v.33, n.5, p.974-83. 2013. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23263990. Acesso em: 15 abr. 2015. doi: 10.1128/MCB.01014-12.

ARMSTRONG, L., et al. Epigenetic modification is central to genome reprogramming in somatic cell nuclear transfer. **Stem Cells**, v.24, n.4, p.805-14. 2006. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16282443. Acesso em: 20 jul. 2015. doi: 10.1634/stemcells.2005-0350.

AWE, J. P.; J. A. BYRNE. Identifying candidate oocyte reprogramming factors using cross-species global transcriptional analysis. **Cell Reprogram**, v.15, n.2, p.126-33. 2013. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23458164. Acesso em: 15 dez. 2015. doi: 10.1089/cell.2012.0060.

BAGG, M. A., et al. Relationship between follicle size and oocyte developmental competence in prepubertal and adult pigs. **Reprod Fertil Dev**, v.19, n.7, p.797-803. 2007. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17897582. Acesso em: 15 abr. 2010. doi.

BANNISTER, A. J.; T. KOUZARIDES. Regulation of chromatin by histone modifications. **Cell Res**, v.21, n.3, p.381-95. 2011. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21321607. Acesso em: 20 nov. 2015. doi: 10.1038/cr.2011.22.

BAO, S., et al. Epigenetic modifications necessary for normal development are established during oocyte growth in mice. **Biol Reprod**, v.62, n.3, p.616-21. 2000. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10684802%3E. Acesso em: 15 nov. 2015. doi.

BASTOS, G. M., et al. Immunolocalization of the high-mobility group N2 protein and acetylated histone H3K14 in early developing parthenogenetic bovine embryos derived from oocytes of high and low developmental competence. **Mol Reprod Dev**, v.75, n.2, p.282-90. 2008. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17712799%3E. Acesso em: 20 dez. 2015. doi: 10.1002/mrd.20798.

BENETATOS, L., et al. Polycomb group proteins and MYC: the cancer connection. **Cell Mol Life Sci**, v.71, n.2, p.257-69. 2014. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23897499. Acesso em: 15 jun. 2015. doi: 10.1007/s00018-013-1426-x.

BESTOR, T. H. The DNA methyltransferases of mammals. **Hum Mol Genet**, v.9, n.16, p.2395-402. 2000. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11005794. Acesso em: 22 mai. 2015. doi.

BIRAN, A.; E. MESHORER. Concise review: chromatin and genome organization in reprogramming. **Stem Cells**, v.30, n.9, p.1793-9. 2012. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22782851. Acesso em: 15 jan. 2015. doi: 10.1002/stem.1169.

BOHRER, R. C., et al. The Incidence of DNA Double-Strand Breaks Is Higher in Late-Cleaving and Less Developmentally Competent Porcine Embryos. **Biol Reprod**, v.93, n.3,

p.59. 2015. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26134870. Acesso em: 15 out. 2015. doi: 10.1095/biolreprod.115.130542.

BOS-MIKICH, A., et al. Early cleavage of human embryos: an effective method for predicting successful IVF/ICSI outcome. **Hum Reprod**, v.16, n.12, p.2658-61. 2001. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11726591. Acesso em: 20 nov. 2015. doi.

BOYER, L. A., et al. Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. **Cell**, v.122, n.6, p.947-56. 2005. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16153702%3E. Acesso em: 17 abr. 2015. doi: S0092-8674(05)00825-1 [pii]10.1016/j.cell.2005.08.020.

BUI, H. T., et al. Epigenetic reprogramming in somatic cells induced by extract from germinal vesicle stage pig oocytes. **Development**, v.139, n.23, p.4330-40. 2012. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23132243. Acesso em: 15 nov. 2015. doi: 10.1242/dev.086116.

BUI, H. T., et al. The cytoplasm of mouse germinal vesicle stage oocytes can enhance somatic cell nuclear reprogramming. **Development**, v.135, n.23, p.3935-45. 2008. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18997114. Acesso em: 21 nov. 2015. doi: 10.1242/dev.023747.

BULTMAN, S. J., et al. Maternal BRG1 regulates zygotic genome activation in the mouse. **Genes Dev**, v.20, n.13, p.1744-54. 2006. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16818606. Acesso em: 15 jun. 2011. doi: 10.1101/gad.1435106.

BYRNE, J. A., et al. Producing primate embryonic stem cells by somatic cell nuclear transfer. **Nature**, v.450, n.7169, p.497-502. 2007. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18004281%3E. Acesso em: 25 set. 2015. doi: 10.1038/nature06357.

CAO, S., et al. Specific gene-regulation networks during the pre-implantation development of the pig embryo as revealed by deep sequencing. **BMC Genomics**, v.15, p.4. 2014. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24383959. Acesso em: 25 set. 2015. doi: 10.1186/1471-2164-15-4.

CAREY, T. S., et al. BRG1 Governs Nanog Transcription in Early Mouse Embryos and Embryonic Stem Cells via Antagonism of Histone H3 Lysine 9/14 Acetylation. **Mol Cell Biol**, v.35, n.24, p.4158-69. 2015. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26416882. Acesso em: 15 nov. 2015. doi: 10.1128/MCB.00546-15.

CHEN, C. H., et al. Synergistic effect of trichostatin A and scriptaid on the development of cloned rabbit embryos. **Theriogenology**, v.79, n.9, p.1284-93. 2013a. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23566670%3E. Acesso em: 15 mai. 2015. doi: 10.1016/j.theriogenology.2013.03.003.

CHEN, J., et al. H3K9 methylation is a barrier during somatic cell reprogramming into iPSCs. **Nat Genet**, v.45, n.1, p.34-42. 2013b. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/ng.2491. Acesso em: 15 jun. 2015. doi: http://www.nature.com/ng/journal/v45/n1/abs/ng.2491.html - supplementary-information.

CHEN, Y. H., et al. EZH2: a pivotal regulator in controlling cell differentiation. **Am J Transl Res**, v.4, n.4, p.364-75. 2012. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23145205. Acesso em: 15 dez. 2015. doi.

CHIN, M. H., et al. Induced pluripotent stem cells and embryonic stem cells are distinguished by gene expression signatures. **Cell Stem Cell**, v.5, n.1, p.111-23. 2009. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19570518. Acesso em: 20 nov. 2015. doi: 10.1016/j.stem.2009.06.008.

CHRISTENSEN, J., et al. RBP2 belongs to a family of demethylases, specific for tri-and dimethylated lysine 4 on histone 3. **Cell**, v.128, n.6, p.1063-76. 2007. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17320161. Acesso em: 15 nov. 2015. doi: 10.1016/j.cell.2007.02.003.

CHUNG, Y. G., et al. Histone Demethylase Expression Enhances Human Somatic Cell Nuclear Transfer Efficiency and Promotes Derivation of Pluripotent Stem Cells. **Cell Stem Cell**. 2015. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26526725%3E. Acesso em: 20 nov. 2015. doi: 10.1016/j.stem.2015.10.001.

CIBELLI, J. B., et al. Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblasts. **Science**, v.280, n.5367, p.1256-8. 1998. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9596577%3E. Acesso em: 15 mai. 2015. doi.

CICCONE, D. N., et al. KDM1B is a histone H3K4 demethylase required to establish maternal genomic imprints. **Nature**, v.461, n.7262, p.415-8. 2009. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19727073. Acesso em: 20 set. 2015. doi: 10.1038/nature08315.

CLOOS, P. A., et al. Erasing the methyl mark: histone demethylases at the center of cellular differentiation and disease. **Genes Dev**, v.22, n.9, p.1115-40. 2008. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18451103. Acesso em: 15 abr. 2015. doi: 10.1101/gad.1652908.

COSGROVE, M. S.; C. WOLBERGER. How does the histone code work? **Biochem Cell Biol**, v.83, n.4, p.468-76. 2005. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16094450. Acesso em: 15 nov. 2010. doi: 10.1139/o05-137.

COUTINHO, A. R., et al. Presence of cleaved caspase 3 in swine embryos of different developmental capacities produced by parthenogenetic activation. **Mol Reprod Dev**, v.78, n.9, p.673-83. 2011. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21887717. Acesso em: 10 jan. 2016. doi: 10.1002/mrd.21368.

DA SILVEIRA, J. C., et al. cell-secreted vesicles in equine ovarian follicular fluid contain miRNAs and proteins: a possible new form of cell communication within the ovarian follicle. **Biol Reprod**, v.86, n.3, p.71. 2012. Disponível em: em: 20 nov. 2015. doi: 10.1095/biolreprod.111.093252.

DU, J., et al. DNA methylation pathways and their crosstalk with histone methylation. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v.16, n.9, p.519-32. 2015. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26296162%3E. Acesso em: 20 nov. 2015. doi: 10.1038/nrm4043.

DUMESIC, D. A., et al. Oocyte environment: follicular fluid and cumulus cells are critical for oocyte health. **Fertil Steril**, v.103, n.2, p.303-16. 2015. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25497448. Acesso em: 15 dez. 2015. doi: 10.1016/j.fertnstert.2014.11.015.

EL-HAYEK, S.; H. J. CLARKE. Follicle-Stimulating Hormone Increases Gap Junctional Communication Between Somatic and Germ-Line Follicular Compartments During Murine Oogenesis. **Biol Reprod**, v.93, n.2, p.47. 2015. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26063870. Acesso em: 10 jan. 2016. doi: 10.1095/biolreprod.115.129569.

EVANS, M. J.; M. H. KAUFMAN. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. **Nature**, v.292, n.5819, p.154-6. 1981. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7242681%3E. Acesso em: 15 jul. 2010. doi.

FAIR, T. Mammalian oocyte development: checkpoints for competence. **Reprod Fertil Dev**, v.22, n.1, p.13-20. 2010. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20003841. Acesso em: 15 jul. 2010. doi: 10.1071/RD09216.

FOSTER, C. T., et al. Lysine-specific demethylase 1 regulates the embryonic transcriptome and CoREST stability. **Mol Cell Biol**, v.30, n.20, p.4851-63. 2010. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20713442. Acesso em: 15 abr. 2015. doi: 10.1128/MCB.00521-10.

FOX, I. J., et al. Stem cell therapy. Use of differentiated pluripotent stem cells as replacement therapy for treating disease. **Science**, v.345, n.6199, p.1247391. 2014. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25146295%3E. Acesso em: 20 nov. 2015. doi: 10.1126/science.1247391.

FRY, C. J.; C. L. PETERSON. Chromatin remodeling enzymes: who's on first? **Curr Biol**, v.11, n.5, p.R185-97. 2001. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11267889. Acesso em: 20 nov. 2015. doi.

GAGLIARDI, A., et al. A direct physical interaction between Nanog and Sox2 regulates embryonic stem cell self-renewal. **EMBO J**, v.32, n.16, p.2231-47. 2013. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23892456%3E. Acesso em: 15 dez. 2014. doi: 10.1038/emboj.2013.161.

GANIER, O., et al. Synergic reprogramming of mammalian cells by combined exposure to mitotic Xenopus egg extracts and transcription factors. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.108, n.42, p.17331-6. 2011. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21908712. Acesso em: 15 abr. 2014. doi: 10.1073/pnas.1100733108.

GLAROS, S., et al. Targeted knockout of BRG1 potentiates lung cancer development. **Cancer Res**, v.68, n.10, p.3689-96. 2008. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18483251%3E. Acesso em: 15 abr. 2014. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-6652.

GUENTHER, M. G., et al. Chromatin structure and gene expression programs of human embryonic and induced pluripotent stem cells. **Cell Stem Cell**, v.7, n.2, p.249-57. 2010. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20682450. Acesso em: 22 abr. 2015. doi: 10.1016/j.stem.2010.06.015.

GUTIERREZ, K., et al. Gonadotoxic effects of busulfan in two strains of mice. **Reprod Toxicol**. 2015. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26524245%3E. Acesso em: 10 dez. 2015. doi: 10.1016/j.reprotox.2015.09.002.

HAMATANI, T., et al. Dynamics of global gene expression changes during mouse preimplantation development. **Dev Cell**, v.6, n.1, p.117-31. 2004. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14723852. Acesso em: 10 jan. 2016. doi.

HARIKUMAR, A.; E. MESHORER. Chromatin remodeling and bivalent histone modifications in embryonic stem cells. **EMBO Rep**, v.16, n.12, p.1609-19. 2015. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26553936. Acesso em: 10 jan. 2016. doi: 10.15252/embr.201541011.

HAYAKAWA, K., et al. Oocyte-specific linker histone H1foo is an epigenomic modulator that decondenses chromatin and impairs pluripotency. **Epigenetics**, v.7, n.9, p.1029-36. 2012. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22868987%3E. Acesso em: 15 abr. 2014. doi: 10.4161/epi.21492.

HENRIQUE BARRETA, M., et al. Homologous recombination and non-homologous end-joining repair pathways in bovine embryos with different developmental competence. **Exp Cell Res**, v.318, n.16, p.2049-58. 2012. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22691445. Acesso em: 15 jul. 2013. doi: 10.1016/j.yexcr.2012.06.003.

HENTZE, H., et al. Teratoma formation by human embryonic stem cells: evaluation of essential parameters for future safety studies. **Stem Cell Res**, v.2, n.3, p.198-210. 2009. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19393593%3E. Acesso em: 15 abr. 2010. doi: S1873-5061(09)00018-X [pii]10.1016/j.scr.2009.02.002.

HYTTEL, P., et al. Nucleolar proteins and ultrastructure in preimplantation porcine embryos developed in vivo. **Biol Reprod**, v.63, n.6, p.1848-56. 2000. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11090457. Acesso em: 15 abr. 2015. doi.

IWASE, S., et al. The X-linked mental retardation gene SMCX/JARID1C defines a family of histone H3 lysine 4 demethylases. **Cell**, v.128, n.6, p.1077-88. 2007. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17320160. Acesso em: 15 abr. 2010. doi: 10.1016/j.cell.2007.02.017.

JAENISCH, R.; R. YOUNG. Stem cells, the molecular circuitry of pluripotency and nuclear reprogramming. **Cell**, v.132, n.4, p.567-82. 2008. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18295576. Acesso em: 15 jul. 2014. doi: 10.1016/j.cell.2008.01.015.

JONES, P. A.; D. TAKAI. The role of DNA methylation in mammalian epigenetics. **Science**, v.293, n.5532, p.1068-70. 2001. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11498573. Acesso em: 20 jul. 2015. doi: 10.1126/science.1063852.

JULLIEN, J., et al. Hierarchical molecular events driven by oocyte-specific factors lead to rapid and extensive reprogramming. **Mol Cell**, v.55, n.4, p.524-36. 2014. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25066233. Acesso em: 23 nov. 2015. doi: 10.1016/j.molcel.2014.06.024.

JULLIEN, J., et al. Mechanisms of nuclear reprogramming by eggs and oocytes: a deterministic process? **Nat Rev Mol Cell Biol**, v.12, n.7, p.453-9. 2011. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21697902. Acesso em: 15 dez. 2015. doi: 10.1038/nrm3140nrm3140 [pii].

KAJI, E. H.; J. M. LEIDEN. Gene and stem cell therapies. **JAMA**, v.285, n.5, p.545-50. 2001. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11176856%3E. Acesso em: 15 abr. 2010. doi.

KEEFE, D., et al. Oocyte competency is the key to embryo potential. **Fertil Steril**, v.103, n.2, p.317-22. 2015. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25639967. Acesso em: 10 jan. 2016. doi: 10.1016/j.fertnstert.2014.12.115.

KIM, K., et al. Epigenetic memory in induced pluripotent stem cells. **Nature**, v.467, n.7313, p.285-90. 2010. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20644535. Acesso em: 15 abr. 2015. doi: 10.1038/nature09342.

KLOSE, R. J.; Y. ZHANG. Regulation of histone methylation by demethylimination and demethylation. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v.8, n.4, p.307-18. 2007. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17342184. Acesso em: 15 abr. 2015. doi: 10.1038/nrm2143.

KOBAYASHI, T., et al. Effect of the timing of the first cleavage on the developmental potential of nuclear-transferred mouse oocytes receiving embryonic stem cells. **Theriogenology**, v.62, n.5, p.854-60. 2004. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15251237. Acesso em: 15 mai. 2014. doi: 10.1016/j.theriogenology.2003.12.032.

KOCABAS, A. M., et al. The transcriptome of human oocytes. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.103, n.38, p.14027-32. 2006. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16968779. Acesso em: 15 abr. 2015. doi: 10.1073/pnas.0603227103.

KORNBERG, R. D. Chromatin structure: a repeating unit of histones and DNA. **Science**, v.184, n.4139, p.868-71. 1974. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4825889%3E. Acesso em: 15 abr. 2010. doi.

KOUZARIDES, T. Chromatin modifications and their function. **Cell**, v.128, n.4, p.693-705. 2007. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17320507. Acesso em: 15 abr. 2008. doi: 10.1016/j.cell.2007.02.005.

KREPELOVA, A., et al. Myc and max genome-wide binding sites analysis links the Myc regulatory network with the polycomb and the core pluripotency networks in mouse embryonic stem cells. **PLoS One**, v.9, n.2, p.e88933. 2014. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24586446. Acesso em: 15 nov. 2015. doi: 10.1371/journal.pone.0088933.

KRISHNAKUMAR, R.; R. H. BLELLOCH. Epigenetics of cellular reprogramming. **Current Opinion in Genetics & Development**, v.23, n.5, p.548-555. 2013. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0959437X13000981. Acesso em: 15 abr. 2015. doi: http://dx.doi.org/10.1016/j.gde.2013.06.005.

LABRECQUE, R.; M. A. SIRARD. The study of mammalian oocyte competence by transcriptome analysis: progress and challenges. **Mol Hum Reprod**, v.20, n.2, p.103-16. 2014. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24233546. Acesso em: 15 abr. 2015. doi: 10.1093/molehr/gat082.

LAWRENCE, M., et al. Lateral Thinking: How Histone Modifications Regulate Gene Expression. **Trends Genet**, v.32, n.1, p.42-56. 2016. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26704082. Acesso em: 15 abr. 2015. doi: 10.1016/j.tig.2015.10.007.

LEE, M. G., et al. Physical and functional association of a trimethyl H3K4 demethylase and Ring6a/MBLR, a polycomb-like protein. **Cell**, v.128, n.5, p.877-87. 2007. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17320162. Acesso em: 15 abr. 2015. doi: 10.1016/j.cell.2007.02.004.

LEE, M. T., et al. Zygotic genome activation during the maternal-to-zygotic transition. **Annu Rev Cell Dev Biol**, v.30, p.581-613. 2014. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25150012. Acesso em: 15 abr. 2015. doi: 10.1146/annurev-cellbio-100913-013027.

LIU, Y., et al. Long-term effect on in vitro cloning efficiency after treatment of somatic cells with Xenopus egg extract in the pig. **Reprod Fertil Dev**, v.26, n.7, p.1017-31. 2014. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25145414. Acesso em: 15 abr. 2015. doi: 10.1071/RD13147.

LONERGAN, P., et al. Effect of follicle size on bovine oocyte quality and developmental competence following maturation, fertilization, and culture in vitro. **Mol Reprod Dev**, v.37, n.1, p.48-53. 1994. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8129930. Acesso em: 15 abr. 2015. doi: 10.1002/mrd.1080370107.

LUTZ, A. J., et al. Double knockout pigs deficient in N-glycolylneuraminic acid and galactose alpha-1,3-galactose reduce the humoral barrier to xenotransplantation. **Xenotransplantation**, v.20, n.1, p.27-35. 2013. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23384142%3E. Acesso em: 15 abr. 2015. doi: 10.1111/xen.12019.

MACAULAY, A. D., et al. The gametic synapse: RNA transfer to the bovine oocyte. **Biol Reprod**, v.91, n.4, p.90. 2014. Disponível em:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25143353. Acesso em: 15 abr. 2015. doi: 10.1095/biolreprod.114.119867.

MACAULAY, A. D., et al. Cumulus Cell Transcripts Transit to the Bovine Oocyte in Preparation for Maturation. **Biol Reprod**. 2015. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26586844%3E. Acesso em: 15 abr. 2015. doi: 10.1095/biolreprod.114.127571.

MALIK, N.; M. S. RAO. A review of the methods for human iPSC derivation. **Methods Mol Biol**, v.997, p.23-33. 2013. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23546745. Acesso em: 15 abr. 2015. doi: 10.1007/978-1-62703-348-0_3.

MANSOUR, A. A., et al. The H3K27 demethylase Utx regulates somatic and germ cell epigenetic reprogramming. **Nature**, v.488, n.7411, p.409-13. 2012. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22801502. Acesso em: 15 abr. 2015. doi: 10.1038/nature11272.

MARCHETTO, M. C., et al. Transcriptional signature and memory retention of human-induced pluripotent stem cells. **PLoS One**, v.4, n.9, p.e7076. 2009. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19763270. Acesso em: 15 abr. 2015. doi: 10.1371/journal.pone.0007076.

MARGUERON, R., et al. Ezh1 and Ezh2 maintain repressive chromatin through different mechanisms. **Mol Cell**, v.32, n.4, p.503-18. 2008. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19026781%3E. Acesso em: 15 abr. 2015. doi: 10.1016/j.molcel.2008.11.004.

MARGUERON, R.; D. REINBERG. The Polycomb complex PRC2 and its mark in life. **Nature**, v.469, n.7330, p.343-9. 2011. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21248841. Acesso em: 15 abr. 2015. doi: 10.1038/nature09784.

MARTELLO, G.; A. SMITH. The nature of embryonic stem cells. **Annu Rev Cell Dev Biol**, v.30, p.647-75. 2014. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25288119%3E. Acesso em: 15 abr. 2015. doi: 10.1146/annurev-cellbio-100913-013116.

MATOBA, S., et al. Embryonic development following somatic cell nuclear transfer impeded by persisting histone methylation. **Cell**, v.159, n.4, p.884-95. 2014. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25417163%3E. Acesso em: 15 abr. 2015. doi: 10.1016/j.cell.2014.09.055.

MATTOUT, A., et al. Global epigenetic changes during somatic cell reprogramming to iPS cells. **J Mol Cell Biol**, v.3, n.6, p.341-50. 2011. Disponível em:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22044880. Acesso em: 15 abr. 2015. doi: 10.1093/jmcb/mjr028.

MCGRAW, S., et al. Characterization of linker histone H1FOO during bovine in vitro embryo development. **Mol Reprod Dev**, v.73, n.6, p.692-9. 2006. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16470586%3E. Acesso em: 15 abr. 2015. doi: 10.1002/mrd.20448.

MIGICOVSKY, Z.; I. KOVALCHUK. Epigenetic memory in mammals. **Front Genet**, v.2, p.28. 2011. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22303324. Acesso em: 15 abr. 2015. doi: 10.3389/fgene.2011.00028.

MIYAMOTO, K., et al. Identification and characterization of an oocyte factor required for development of porcine nuclear transfer embryos. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.108, n.17, p.7040-5. 2011. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21482765. Acesso em: 15 abr. 2015. doi: 10.1073/pnas.1013634108.

MOHAN, K. N.; J. R. CHAILLET. Cell and molecular biology of DNA methyltransferase 1. **Int Rev Cell Mol Biol**, v.306, p.1-42. 2013. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24016522%3E. Acesso em: 15 abr. 2015. doi: 10.1016/B978-0-12-407694-5.00001-8.

MOUSAVI, K., et al. Polycomb protein Ezh1 promotes RNA polymerase II elongation. **Mol Cell**, v.45, n.2, p.255-62. 2012. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22196887. Acesso em: 15 abr. 2015. doi: 10.1016/j.molcel.2011.11.019.

MOUSSA, M., et al. Maternal control of oocyte quality in cattle "a review". **Anim Reprod Sci**, v.155, p.11-27. 2015. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25726438. Acesso em: 15 abr. 2015. doi: 10.1016/j.anireprosci.2015.01.011.

NERI, F., et al. Myc regulates the transcription of the PRC2 gene to control the expression of developmental genes in embryonic stem cells. **Mol Cell Biol**, v.32, n.4, p.840-51. 2012. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22184065. Acesso em: 15 abr. 2015. doi: 10.1128/MCB.06148-11.

NIEMANN, H., et al. Epigenetic reprogramming in embryonic and foetal development upon somatic cell nuclear transfer cloning. **Reproduction**, v.135, n.2, p.151-63. 2008. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18239046. Acesso em: 15 abr. 2015. doi: 10.1530/REP-07-0397.

ONISHI, A., et al. Pig Cloning by Microinjection of Fetal Fibroblast Nuclei. **Science**, v.289, n.5482, p.1188-1190. 2000. Disponível em:

<http://www.sciencemag.org/content/289/5482/1188.abstract. Acesso em: 15 abr. 2015. doi: 10.1126/science.289.5482.1188.

OSTRUP, O., et al. Chromatin-linked determinants of zygotic genome activation. **Cell Mol Life Sci**, v.70, n.8, p.1425-37. 2013. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22965566. Acesso em: 15 abr. 2015. doi: 10.1007/s00018-012-1143-x.

PAPP, B.; K. PLATH. Epigenetics of reprogramming to induced pluripotency. **Cell**, v.152, n.6, p.1324-43. 2013. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23498940. Acesso em: 15 abr. 2015. doi: 10.1016/j.cell.2013.02.043.

PASQUE, V., et al. Epigenetic factors influencing resistance to nuclear reprogramming. **Trends Genet**, v.27, n.12, p.516-25. 2011. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21940062. Acesso em: 15 abr. 2015. doi: 10.1016/j.tig.2011.08.002.

PENNAROSSA, G., et al. Brief demethylation step allows the conversion of adult human skin fibroblasts into insulin-secreting cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.110, n.22, p.8948-53. 2013. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23696663%3E. Acesso em: 15 abr. 2015. doi: 10.1073/pnas.1220637110.

PHELPS, C. J., et al. Production of alpha 1,3-galactosyltransferase-deficient pigs. **Science**, v.299, n.5605, p.411-4. 2003. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12493821%3E. Acesso em: 15 jul. 2015. doi: 10.1126/science.1078942.

POLEJAEVA, I. A., et al. Cloned pigs produced by nuclear transfer from adult somatic cells. **Nature**, v.407, n.6800, p.86-90. 2000. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/35024082. Acesso em: 15 jun. 2015. doi:

QIN, Y., et al. Generation of embryonic stem cells from mouse adipose-tissue derived cells via somatic cell nuclear transfer. **Cell Cycle**, v.14, n.8, p.1282-90. 2015. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25692793%3E. Acesso em: 15 abr. 2015. doi: 10.1080/15384101.2015.1007732.

RAO, R. A., et al. Ezh2 mediated H3K27me3 activity facilitates somatic transition during human pluripotent reprogramming. **Sci Rep**, v.5, p.8229. 2015. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25648270. Acesso em: 15 abr. 2015. doi: 10.1038/srep08229.

REIK, W., et al. Epigenetic reprogramming in mammalian development. **Science**, v.293, n.5532, p.1089-93. 2001. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11498579. Acesso em: 15 abr. 2015. doi: 10.1126/science.1063443.

RISSI, V. B., et al. Effect of cell cycle interactions and inhibition of histone deacetylases on development of porcine embryos produced by nuclear transfer. **Cell Reprogram**. v.18, n.1, p.8-16. 2016. Disponível em: em: 15 jan. 2016. doi.

ROBERTSON, K. D.; A. P. WOLFFE. DNA methylation in health and disease. **Nat Rev Genet**, v.1, n.1, p.11-9. 2000. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11262868. Acesso em: 15 abr. 2015. doi: 10.1038/35049533.

ROBINTON, D. A.; G. Q. DALEY. The promise of induced pluripotent stem cells in research and therapy. **Nature**, v.481, n.7381, p.295-305. 2012. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22258608%3E. Acesso em: 15 abr. 2015. doi: 10.1038/nature10761.

SANTORO, S. W.; C. DULAC. Histone variants and cellular plasticity. **Trends Genet**, v.31, n.9, p.516-27. 2015. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26299477. Acesso em: 15 abr. 2015. doi: 10.1016/j.tig.2015.07.005.

SANTOS-ROSA, H.; C. CALDAS. Chromatin modifier enzymes, the histone code and cancer. **European Journal of Cancer**, v.41, n.16, p.2381-2402. 2005. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0959804905007100. Acesso em: 15 abr. 2015. doi: http://dx.doi.org/10.1016/j.ejca.2005.08.010.

SENEDA, M. M., et al. Developmental regulation of histone H3 methylation at lysine 4 in the porcine ovary. **Reproduction**, v.135, n.6, p.829-38. 2008. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18502896. Acesso em: 22 dez. 2015. doi: 10.1530/REP-07-0448.

SHAO, G. B., et al. Role of histone methylation in zygotic genome activation in the preimplantation mouse embryo. **In Vitro Cell Dev Biol Anim**, v.44, n.3-4, p.115-20. 2008. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18266049. Acesso em: 15 abr. 2015. doi: 10.1007/s11626-008-9082-4.

SHI, Y. Histone lysine demethylases: emerging roles in development, physiology and disease. **Nat Rev Genet**, v.8, n.11, p.829-33. 2007. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17909537. Acesso em: 15 mai. 2015. doi: 10.1038/nrg2218.

SHI, Y., et al. Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1. **Cell**, v.119, n.7, p.941-53. 2004. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15620353. Acesso em: 22 dez. 2015. doi: 10.1016/j.cell.2004.12.012.

SIKLENKA, K., et al. Disruption of histone methylation in developing sperm impairs offspring health transgenerationally. **Science**, v.350, n.6261, p.aab2006. 2015. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26449473. Acesso em: 15 nov. 2015. doi: 10.1126/science.aab2006.

SIMON, J. A.; R. E. KINGSTON. Mechanisms of polycomb gene silencing: knowns and unknowns. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v.10, n.10, p.697-708. 2009. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19738629%3E. Acesso em: 15 dez. 2015. doi: 10.1038/nrm2763.

SINGH, V. K., et al. Induced pluripotent stem cells: applications in regenerative medicine, disease modeling, and drug discovery. **Front Cell Dev Biol**, v.3, p.2. 2015. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25699255%3E. Acesso em: 15 mai. 2015. doi: 10.3389/fcell.2015.00002.

SON, M. Y., et al. Unveiling the critical role of REX1 in the regulation of human stem cell pluripotency. **Stem Cells**, v.31, n.11, p.2374-87. 2013. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23939908%3E. Acesso em: 15 mai. 2015. doi: 10.1002/stem.1509.

SU, W., et al. Bioluminescence reporter gene imaging characterize human embryonic stem cell-derived teratoma formation. **J Cell Biochem**, v.112, n.3, p.840-8. 2011. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/store/10.1002/jcb.22982/asset/22982_ftp.pdf?v=1&t=goh6g2st&s=a7f0a9b8c4a42e996a9c72ff451b17694f5e51df%3E. Acesso em: 20 nov. 2015. doi: 10.1002/jcb.22982.

TACHIBANA, M., et al. Human embryonic stem cells derived by somatic cell nuclear transfer. **Cell**, v.153, n.6, p.1228-38. 2013. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23683578%3E. Acesso em: 15 dez. 2015. doi: 10.1016/j.cell.2013.05.006.

TAKAHASHI, K., et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. **Cell**, v.131, n.5, p.861-72. 2007. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18035408%3E. Acesso em: 15 dez. 2015. doi: S0092-8674(07)01471-7 [pii]10.1016/j.cell.2007.11.019.

TAKAHASHI, K.; S. YAMANAKA. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. **Cell**, v.126, n.4, p.663-76. 2006. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16904174%3E. Acesso em: 15 dez. 2015. doi: S0092-8674(06)00976-7 [pii]10.1016/j.cell.2006.07.024.

TAN, Y., et al. Acetylated histone H3K56 interacts with Oct4 to promote mouse embryonic stem cell pluripotency. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.110, n.28, p.11493-8. 2013. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23798425. Acesso em: 15 dez. 2015. doi: 10.1073/pnas.1309914110.

TELFORD, N. A., et al. Transition from maternal to embryonic control in early mammalian development: a comparison of several species. **Mol Reprod Dev**, v.26, n.1, p.90-100. 1990. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2189447. Acesso em: 10 set. 2015. doi: 10.1002/mrd.1080260113.

THOMSON, J. A., et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. **Science**, v.282, n.5391, p.1145-7. 1998. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9804556%3E. Acesso em: 21 nov. 2015. doi.

THOMSON, J. A., et al. Isolation of a primate embryonic stem cell line. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.92, n.17, p.7844-8. 1995. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7544005%3E. Acesso em: 21 nov. 2015. doi.

TROTTER, K. W.; T. K. ARCHER. The BRG1 transcriptional coregulator. **Nucl Recept Signal**, v.6, p.e004. 2008. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18301784. Acesso em: 15 dez. 2015. doi: 10.1621/nrs.06004.

UYSAL, F., et al. Dynamic expression of DNA methyltransferases (DNMTs) in oocytes and early embryos. **Biochimie**, v.116, p.103-13. 2015. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26143007. Acesso em: 15 abr. 2015. doi: 10.1016/j.biochi.2015.06.019.

VAN THUAN, N., et al. The histone deacetylase inhibitor scriptaid enhances nascent mRNA production and rescues full-term development in cloned inbred mice. **Reproduction**, v.138, n.2, p.309-17. 2009. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19433501%3E. Acesso em: 23 abr. 2015. doi: 10.1530/REP-08-0299.

VASTENHOUW, N. L.; A. F. SCHIER. Bivalent histone modifications in early embryogenesis. **Curr Opin Cell Biol**, v.24, n.3, p.374-86. 2012. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22513113. Acesso em: 22 mai. 2015. doi: 10.1016/j.ceb.2012.03.009.

VENKATESH, S.; J. L. WORKMAN. Histone exchange, chromatin structure and the regulation of transcription. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v.16, n.3, p.178-89. 2015. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25650798. Acesso em: 15 dez. 2015. doi: 10.1038/nrm3941.

VILLASANTE, A., et al. Epigenetic regulation of Nanog expression by Ezh2 in pluripotent stem cells. **Cell Cycle**, v.10, n.9, p.1488-98. 2011. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21490431%3E. Acesso em: 15 dez. 2015. doi.

WAKAYAMA, S., et al. Successful serial recloning in the mouse over multiple generations. **Cell Stem Cell**, v.12, n.3, p.293-7. 2013. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23472871%3E. Acesso em: 15 ago. 2015. doi: 10.1016/j.stem.2013.01.005.

WAKAYAMA, T., et al. Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. **Nature**, v.394, n.6691, p.369-74. 1998. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9690471%3E. Acesso em: 15 ago. 2015. doi: 10.1038/28615.

WANG, J., et al. The lysine demethylase LSD1 (KDM1) is required for maintenance of global DNA methylation. **Nat Genet**, v.41, n.1, p.125-9. 2009. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19098913. Acesso em: 21 jul. 2015. doi: 10.1038/ng.268.

WANG, J., et al. Opposing LSD1 complexes function in developmental gene activation and repression programmes. **Nature**, v.446, n.7138, p.882-7. 2007. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17392792. Acesso em: 12 mai. 2015. doi: 10.1038/nature05671.

WANG, L. J., et al. Scriptaid improves in vitro development and nuclear reprogramming of somatic cell nuclear transfer bovine embryos. **Cell Reprogram**, v.13, n.5, p.431-9. 2011. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21774687%3E. Acesso em: 21 nov. 2015. doi: 10.1089/cell.2011.0024.

WEN, B. Q., et al. The histone deacetylase inhibitor Scriptaid improves in vitro developmental competence of ovine somatic cell nuclear transferred embryos. **Theriogenology**, v.81, n.2, p.332-9. 2014. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24182741%3E. Acesso em: 21 nov. 2015. doi: 10.1016/j.theriogenology.2013.09.032.

WILMUT, I., et al. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. **Nature**, v.385, n.6619, p.810-3. 1997. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9039911%3E. Acesso em: 15 dez. 2015. doi: 10.1038/385810a0.

WOBUS, A. M.; K. R. BOHELER. Embryonic stem cells: prospects for developmental biology and cell therapy. **Physiol Rev**, v.85, n.2, p.635-78. 2005. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15788707%3E. Acesso em: 15 dez. 2015. doi: 10.1152/physrev.00054.2003.

XIE, B., et al. Histone H3 lysine 27 trimethylation acts as an epigenetic barrier in porcine nuclear reprogramming. **Reproduction**, v.151, n.1, p.9-16. 2016. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26515777%3E. Acesso em: 20 dez. 2015. doi: 10.1530/REP-15-0338.

XU, W., et al. Effects of DNMT1 and HDAC inhibitors on gene-specific methylation reprogramming during porcine somatic cell nuclear transfer. **PLoS One**, v.8, n.5, p.e64705. 2013. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3669391/pdf/pone.0064705.pdf%3E. Acesso em: 23 abr. 2015. doi: 10.1371/journal.pone.0064705.

YAO, J., et al. Efficient bi-allelic gene knockout and site-specific knock-in mediated by TALENs in pigs. **Sci Rep**, v.4, p.6926. 2014. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25370805%3E. Acesso em: 23 abr. 2015. doi: 10.1038/srep06926.

ZHANG, X., et al. Transcriptional repression by the BRG1-SWI/SNF complex affects the pluripotency of human embryonic stem cells. **Stem Cell Reports**, v.3, n.3, p.460-74. 2014. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4266000/pdf/main.pdf%3E. Acesso em: 20 dez. 2015. doi: 10.1016/j.stemcr.2014.07.004.

ZHAO, J., et al. Significant improvement in cloning efficiency of an inbred miniature pig by histone deacetylase inhibitor treatment after somatic cell nuclear transfer. **Biol Reprod**, v.81, n.3, p.525-30. 2009. Disponível em: <http://www.biolreprod.org/content/81/3/525.full.pdf%3E. Acesso em: 20 jun. 2015. doi: 10.1095/biolreprod.109.077016.