

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE CÉLULAS
MULTIPOTENTES E PLURIPOTENTES INDUZIDAS EM
*Blastocerus dichotomus***

**Luciana Diniz Rola
Médica Veterinária**

2017

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE CÉLULAS
MULTIPOTENTES E PLURIPOTENTES INDUZIDAS EM
*Blastocerus dichotomus***

Luciana Diniz Rola

Orientador: Prof. Dr. José Maurício Barbanti Duarte

Coorientador: Prof. Dr. Lawrence Charles Smith

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para obtenção do título de Doutora em Medicina Veterinária, área Reprodução Animal.

2017

R744p Rola, Luciana Diniz
Produção e caracterização de células multipotentes e pluripotentes induzidas em *Blastocerus dichotomus* / Luciana Diniz Rola. -- Jaboticabal, 2017
viii, 101 p. : il. ; 29 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2017
Orientador: José Mauricio Barbanti Duarte
Banca examinadora: Joaquim Mansano Garcia, Eveline dos Santos Zanetti, Fabiana Fernandes Bressan, José Antônio Visintin

Bibliografia

1. Células de pluripotência induzida. 2. Células multipotentes 3. Cervídeos Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:636.082:599.735.31

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Luciana Diniz Rola - Nascida na cidade de São Paulo em 12 de março de 1988, iniciou o curso de graduação em Medicina Veterinária na Universidade Estadual Paulista “Dr. Júlio de Mesquita Filho” – UNESP – Câmpus de Jaboticabal, em março de 2006. Em 2007 ingressou como estagiária no Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos (NUPECCE), onde desenvolveu dois trabalhos de iniciação científica como bolsista da FAPESP, sob orientação do Prof. Dr. José Maurício Barbanti Duarte e coorientação da Dra. Eveline dos Santos Zanetti em 2007 e 2009. Em 2008 obteve bolsa de iniciação científica do PIBIC, participando do projeto linfoma, sob a orientação do Prof. Dr. Áureo Evangelista. Em fevereiro de 2013 obteve o título de Mestre em Medicina Veterinária (área de concentração Reprodução Animal), sob orientação do Prof. Dr. Maurício Barbanti e coorientação da Dra. Eveline Zanetti, com bolsa contemplada pela FAPESP (2010/14785-1). Ingressou em março de 2013 no curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária (área de concentração Reprodução Animal), sob orientação do Prof. Dr. Maurício Barbanti e co-orientação do Prof. Dr. Lawrence Charles Smith, sendo bolsista pela FAPESP (2013/13972-0). Realizou estágio sanduíche na Université de Montréal durante o período 09 de setembro de 2014 a 07 de setembro de 2015, sob supervisão do Prof. Dr. Lawrence Charles Smith, sendo bolsista da FAPESP (2014/02439-2).

***“Suba o primeiro degrau com fé.
Não é necessário que você veja toda a escada.
Apenas dê o primeiro passo”***

Martin Luther King

Agradecimentos

*“No nosso cotidiano,
devemos entender que não é a felicidade que nos faz agradecidos,
mas a gratidão é que nos faz felizes”*

Albert Clarke

Agradeço ao Prof. José Maurício Barbanti Duarte, que esteve presente durante toda a minha trajetória científica, e foi o grande responsável, com toda sua dedicação e discurso contagiante, por inspirar em mim a paixão pela ciência e pelo mundo da cervidologia. Esse doutorado foi certamente um desafio muito intenso, e poder contar com o seu apoio em desenvolvê-lo foi muito gratificante. Agradeço por sua disposição e pelo fato de sempre poder contar sua ajuda para encarar este desafio, desenvolvê-lo e discuti-lo.

Ao Prof. Lawrence Smith, pelos votos de confiança, e principalmente pelos ensinamentos dessa área tão nova e fascinante das células-tronco. Por toda sua colaboração, que veio desde o desenho experimental, passando pelo desenvolvimento do trabalho em si, e finalmente no auxílio na redação final. Agradeço pela oportunidade que me deu em fazer parte da rotina do seu laboratório no Canadá, onde tive todo o apoio necessário para conduzir a maior parte desta pesquisa, pelo suporte de forma sempre atenciosa, aberta a novas possibilidades e opiniões, pelas discussões metodológicas e por me permitir ser persistente.

A Dra. Fabiana Bressan e Prof. Flávio Meireles, que neste momento final foram tão disponíveis, atenciosos e puderam fazer contribuições essenciais. São certamente profissionais modelo, e que com sua competência nos inspiram e agregam muito.

Agradeço a toda ajuda que tive dos membros do NUPECCE, seja durante as viagens como motoristas ou auxiliares na obtenção das amostras, no processamento delas durante toda a madrugada, ou ainda nas discussões científicas (ou não), fazendo com que o clima fosse sempre leve e alegre: aos reprodutólogos Gabi, Lincy, David, Rosana, Duca, Cláudia; aos geneticistas Lara, Kokotinha, Jorge, Carol, Lorena, Louise e aos ecólogos Márcio, Pedro, Naomi, Chico, Granada.

Aos ex-integrantes do Nupecce, sempre lembrados com carinho. Agradecimento especial a minha querida mãe científica, Eveline Zanetti, que me guiou de perto ao longo da minha jornada científica, com seu jeito único, leve e especial.

A todos os colegas de convivência no Canadá: Em especial a Jacinthe Terrien, por toda sua didática e vontade de ajudar e fazer as coisas darem certo. Agradeço a minhas queridas roommates e agregadas: Amanda, Lary, Marina e Nathia, pela convivência agradável e tantos momentos de comilança, companheirismo e risadas, fazendo sempre do Canadá um pouquinho mais brasileiro. A tantos outros como os funcionários do CRRA, aos pós-graduandos e professores.

Aos profissionais que auxiliaram nas anestésias e manipulação dos animais: Juliana Linardi, Prof. Adriano Carregaro, André Nicolai e Prof. André Escobar.

Agradeço agora nessa etapa final e de muita correria aos pós-graduandos da USP- Pirassununga em especial Lucas, Naira, Maite, Aline e Laís.

Agradeço aos meus amigos, minha família e todos aqueles que cercam minha vida pelo apoio e compreensão da minha ausência, e por tantas vezes me proverem conforto emocional. Em especial ao Marcos, por sua participação tão intensa na minha

rotina, por sua dedicação e companheirismo. Seu jeito me faz sempre querer ficar “nesse lugar”, que é ao seu lado.

Agradeço ao apoio financeiro da FAPESP (Processo 2013/13972-0).

Finalizo agradecendo aos animais, que cederam um “pedacinho de si” em prol deste experimento. Apesar das dificuldades que se mostraram diante deste trabalho, desejo sincera e profundamente que ele não se encerre aqui, e que um dia possamos alcançar os objetivos finais e contribuir com as populações ameaçadas.

Meu muito obrigada! Tê-los participando disso tudo comigo tornou os obstáculos menores. Tenho muito carinho por cada um que contribuiu. Vocês foram, sem dúvidas, essenciais e serão sempre lembrados por mim com muita gratidão.

SUMÁRIO

RESUMO.....	v
ABSTRACT.....	vi
CAPÍTULO 1 – Considerações Gerais	1
1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	3
2.1. A espécie <i>Blastocerus dichotomus</i>	3
2.2 Programas de conservação para cervo-do-pantanal.....	4
2.3 Células-tronco como potencial para auxiliar na conservação de espécies ameaçadas	7
2.4 Reprogramação de células somáticas em células de pluripotência induzida.....	8
2.5 Produção de células da linhagem germinativa <i>in vitro</i>	10
3. OBJETIVOS	13
4. REFERÊNCIAS.....	14
CAPÍTULO 2 - Isolamento, expansão e caracterização de três tipos de células- tronco multipotentes de cervo-do-pantanal (<i>Blastocerus dichotomus</i>).....	27
RESUMO.....	27
ABSTRACT.....	28
1. INTRODUÇÃO	29
2. MATERIAL E MÉTODOS	31
2.1. Obtenção das biópsias	31
2.2. Isolamento das células-tronco multipotentes.....	32
2.3. Cultivo e criopreservação de células-tronco multipotentes.....	32
2.4. Capacidade de diferenciação.....	33
2.5. Tempo de duplicação da população celular	34
2.6. RT-qPCR para genes marcadores de pluripotência	34
2.7. Imunocitoquímica (ICC)	35
2.8. Análise estatística	36
3. RESULTADOS	36
3.1. Derivação das linhagens multipotentes.....	36
3.2. Capacidade de diferenciação.....	37
3.3. Tempo de duplicação da população celular	40

3.4. RT-qPCR para genes marcadores de pluripotência	40
3.5. Imunocitoquímica (ICC)	41
4. DISCUSSÃO	42
5. CONCLUSÃO.....	47
6. REFERÊNCIAS.....	47
CAPÍTULO 3 – Tentativa de indução de pluripotência em células-tronco adultas de cervo-do-pantanal.....	55
RESUMO	55
ABSTRACT	56
1. INTRODUÇÃO	57
2. MATERIAL E MÉTODOS	59
2.1. Obtenção das biópsias.....	59
2.2. Isolamento das células-tronco multipotentes.....	59
2.3. Indução da pluripotência	60
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	63
4. CONCLUSÃO.....	69
5. REFERÊNCIAS.....	69
CAPÍTULO 4 – Uso de células multipotentes de cervo-do-pantanal para induzir a diferenciação em células semelhantes as germinativas primordiais – dados preliminares	75
RESUMO	75
ABSTRACT	76
1. INTRODUÇÃO	77
2. MATERIAL E MÉTODOS	79
2.1. Obtenção das biópsias.....	79
2.2. Isolamento das células-tronco multipotentes.....	80
2.3. Cultivo de células-tronco multipotentes.....	80
2.4. Experimento 1.....	81
2.5. Experimento 2.....	84
3. RESULTADOS.....	86
3.1. Experimento 1.....	86
3.2. Experimento 2.....	89
4. DISCUSSÃO	92
5. CONCLUSÃO.....	96

6. REFERÊNCIAS..... 96



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Jaboticabal




CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 025986/13 do trabalho de pesquisa intitulado "**Produção e caracterização de células multipotentes e pluripotentes induzidas em *Blastocerus dichotomus***", sob a responsabilidade do Prof. Dr. José Maurício Barbanti Duarte está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), em reunião ordinária de 04 de dezembro de 2013.

Jaboticabal, 04 de dezembro de 2013.


Prof.^a Dr.^a Paola Castro Moraes
Coordenadora - CEUA

PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE CÉLULAS MULTIPOTENTES E PLURIPOTENTES INDUZIDAS EM *Blastocerus dichotomus*

RESUMO – Os cervídeos têm sofrido com a diminuição do seu habitat natural, segregação entre populações e diminuição da diversidade genética. Embora a criopreservação e estocagem de gametas e embriões seja usada como estratégia de preservação de populações selvagens, poucos estudos tem obtido sucesso devido a dificuldades na sua obtenção. Recentes estudos com células tronco de pluripotência induzida (“*induced pluripotent stem cells*” - iPSC) derivadas de células somáticas humanas e de camundongos conseguiram diferenciação em células germinativas, espermatozoides e oócitos. Deste modo, tem-se o objetivo a longo prazo de produzir gametas viáveis de cervídeos, a partir de células somáticas. Porém, como até a presente data células iPSC ainda não foram derivadas em cervídeos, o enfoque principal neste projeto foi estabelecer protocolos que propiciem a obtenção de linhagens iPSC estáveis. O processo de reprogramação de células somáticas em células iPSC é facilitado pelo uso de células-tronco adultas que possuam capacidade multipotente. Como pouco se conhece a respeito de células-tronco multipotentes em cervídeos, a **primeira meta** deste trabalho teve como objetivo obter biopsias de diversos tecidos com capacidade multipotente. Entre elas encontram-se as células-tronco do tecido adiposo, chifre e pele. Uma vez estabelecidas, as linhagens de cada tecido foram avaliadas quanto ao seu tempo de duplicação da população celular e foram induzidas à diferenciação em outros tipos de células (adipócitos, condrócitos e osteócitos) para avaliar sua plasticidade *in vitro*. Ainda, foi caracterizada a expressão de marcadores moleculares por meio da imunocitoquímica (OCT4, SOX2, Nanog, REX1) e RT-qPCR (OCT4, SOX2, Nanog, LIN28, REX1). A **segunda meta** teve como enfoque a derivação de células iPSC a partir das linhagens tronco multipotentes obtidas anteriormente. A derivação das linhagens iPSC foi testada pelo uso de integração gênica que exprimem quatro fatores de transcrição (c-Myc, Klf4, Oct4 e Sox2) pelos métodos de nucleofecção, lipofecção ou lentiviral. As colônias do tipo iPSC foram obtidas somente pelo método de nucleofecção e foram repicadas isoladamente. Porém, falharam em estabelecer linhagens clonais para posterior caracterização. A **terceira meta** deste trabalho visou estabelecer linhagens de células semelhantes as germinativas primordiais (“*Primordial germ cell-like*” PGCLs). Devido a falha em reprogramar as células-tronco adultas em iPSC, foram estabelecidas as linhagens de PGCLs por diferenciação de células de chifre, gordura e pele, passando pela fase de células semelhantes as epiblasticas (“*epiblast-like cells*” EpiLCs) e posteriormente sendo diferenciadas nas PGCLs. Após diferenciação, as PGCLs foram submetidas a testes de imunocitoquímica (DDX4 e DAZL) e RT-qPCR (DDX4, Stra8, Stella, Fragilis, OCT4). Ainda, foi testada a influência do ácido retinoico e do BMP4, bem como os sistemas de cultivo em adesão e em suspensão para a diferenciação das células multipotentes em PGCLs.

Palavras-chave: células de pluripotência induzida, células multipotentes, células semelhantes as germinativas primordiais, cervídeos

PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF MULTIPOTENT AND INDUCED PLURIPOTENT CELLS IN *Blastocerus dichotomus*

ABSTRACT - Deer have been enduring pressures on their natural habitat, which causes segregation between populations and reduced genetic diversity. Although cryopreservation and storage of gamete and embryos can be used as a strategy for the preservation of wild populations, few studies have been successful due to difficulties to recover these materials. Recent studies in mice and humans have shown that induced pluripotent stem cells (iPSC) derived from somatic cells can be differentiated into germ cells, oocytes, and spermatozoa. Thus, we hypothesize that viable gametes could also be obtained from somatic cells in deer. To date, iPSC cells have not been derived in cervids and therefore our main goal is to establish protocols to obtain stable iPSC lines from deer somatic cells. The process of reprogramming somatic cells into iPSC cells is facilitated by the use of adult stem cells that still have the multipotent capacity. As little is known about multipotent stem cells in deer, the **first objective** of this study was to obtain biopsies from various tissues with multipotent differentiation capacity. Among these tissues are the stem cells from adipose tissue, antler, and skin. Once primary cultures were established, cells from each tissue were evaluated for doubling time and then induced *in vitro* to differentiate into adipocytes, osteocytes and chondrocytes lineages in order to assess their plasticity. Moreover, the expression of molecular markers was characterized by immunocytochemistry (OCT4, SOX2, Nanog, REX1) and RT-PCR (OCT4, SOX2, Nanog, LIN28, REX1). The **second objective** of this study was to derive iPSC lineages from multipotent stem cells in deer. The derivation of iPSC lines was tested by transfection with four transcription factors (c-Myc, Klf4, Oct4, and Sox2) using nucleofection, lipofection or lentiviral reprogramming system. Although iPSC-like colonies were obtained in nucleofection system, they failed to establish stable clonal lines for further characterization. Due to failure to reprogram adult stem cells into iPSC, we next tried to establish the primordial germ cell (PGC) lines by differentiation of antler, fat and skin-derived cells first into epiblast stem cells (EpiSC) and then, in a second step, differentiate these into PGC. Therefore, the **third objective** was to establish PGC directly from multipotent stem cells. After differentiation, PGC-like were analyzed through immunocytochemistry (DDX4, DAZL) and RT-qPCR (DDX4, Stra8, Stella, Fragilis, OCT4). Furthermore, the influence of retinoic acid and BMP4, as well as the adhesion and suspension culture systems for the differentiation of the multipotent cells in PGCLs, were tested.

Keywords: induced pluripotent stem cells, multipotent stem cells, primordial germ cells-like, deer

Lista de abreviaturas

ALK/TGF – “*Anaplastic lymphoma kinase/transforming growth factor beta*”

bFGF – “*basic fibroblast growth factor*”

BMP4 – “*Bone morphogenetic protein 4*”

BPE – “*bovine pituitary extract*”

CCCP - Centro de Conservação do Cervo do Pantanal

CR – Criticamente em perigo

DMEM – “*Dulbecco’s modified Eagle’s minimal essential médium*”

DMSO - Dimetilsulfóxido

EGF – “*Epidermal growth factor*”

EpiLCs – Células semelhantes as do epiblasto

ESC – Células-tronco embrionárias

FACS – “*Fluorescence-activated cell sorting*”

FSH - hormônio folículo-estimulante

GFP – Proteína fluorescente verde

GSK – “*Glycogen synthase kinase*”

ICC - Imunocitoquímica

ICSI – Injeção Intracitoplasmática de espermatozoide

IM – Intramuscular

iPSC – Células-tronco de pluripotência induzida

IUCN - “*International Union for Conservation of Nature*”

KOSR - Substituto de soro Knockout

LIF – “*Leukemia inhibitory factor*”

MEF - Fibroblastos embrionários de murino

MEK – “*Mitogen-activated protein/extracellular signal-regulated kinase kinase*”

MET - Transição mesenquimal para epitelial

MSC – Células-tronco mesenquimais

NEAA – Aminoácidos não-essenciais

NUPECCE - Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos

OSKM – OCT4, SOX2, KLF4 e c-MYC

PBS – “*Phosphate-buffered saline*”

PCR – Reação em cadeia da polimerase

PGCLs – Células semelhantes às germinativas primordiais

PGCs – Células germinativas primordiais

PIVE – Produção *in vitro* de embriões

RA – Ácido retinoico

RT-qPCR – Reação em cadeia da polimerase quantitativo em tempo real

SCF – “*Stem cell factor*”

SCNT - Clonagem por transferência nuclear

SFB – Soro fetal bovino

TGFb1 – “*Transforming growth factor beta 1*”

VU – Vulnerável

CAPÍTULO 1 – Considerações Gerais

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Geográfica e fenotipicamente, os cervídeos formam um grupo extraordinariamente diverso de ungulados, com aproximadamente 43 espécies e 206 subespécies descritas (WHITEHEAD, 2008). Algumas delas correm perigo de extinção (MONFORT et al., 1993) e muitas outras apresentam escassez de estudos para afirmar sua real situação. Assim como outras espécies brasileiras de vida livre, o cervo-do-pantanal (*Blastocerus dichotomus*) têm sofrido pressões sobre seu habitat, o que provoca segregação entre populações, diminuição de troca gênica e de diversidade genética, aumento da endogamia, e conseqüentemente maior risco de extinção (DUARTE, 2005). Devido às dificuldades para a conservação dos habitats naturais, as técnicas de reprodução assistida associadas aos bancos de reserva genômica têm se mostrado ferramentas importantes para os programas de conservação *in situ* e *ex situ* (HOLT; PICKARD, 1999). Essas ferramentas têm potencial para reduzir a perda de diversidade genética em pequenas populações, possibilitando a contribuição igualitária de todos os indivíduos para a próxima geração, e estendendo o intervalo entre gerações por meio da criopreservação de gametas e embriões (JABBOUR; HAYSSEN; BRUFORD, 1997).

Nesse contexto, gerar células-tronco pluripotentes induzidas (iPSCs) de espécies ameaçadas de extinção cria possibilidades fascinantes para a conservação das espécies, uma vez que a obtenção de gametas tem sido um entrave na construção de bancos de reserva genômica e desenvolvimento das biotécnicas reprodutivas. As iPSCs possuem propriedades que são equivalentes às células-tronco embrionárias (ESC), e vários estudos têm relatado que as células-tronco pluripotentes de humano e camundongo podem dar origem a células semelhantes as germinativas primordiais (PGCLs) *in vitro*. Isso sugere que as células-tronco possuem capacidade necessária para iniciar a gametogênese quando expostas a condições de cultura adequadas. Em alguns estudos, estas supostas PGCLs tem capacidade de se diferenciarem e formarem células que se assemelham muito a gametas masculinos e femininos maduros (LINHER; LI, 2011).

As células iPSC já foram derivadas a partir de células somáticas de camundongos (TAKAHASHI; YAMANAKA, 2006), cães (SHIMADA et al., 2009), suínos (ESTEBAN et al., 2009), ratos (CHANG et al., 2010), lagomorfos (HONDA et al., 2010), ovinos (BAO et al., 2011), cavalos (NAGY et al., 2011), bovinos (SUMER et al., 2011), bubalinos (DENG et al., 2012), codornas (LU et al., 2012), galinhas (YU et al., 2014), caprinos (TAI et al., 2015) e também em espécies selvagens como macaco rhesus (*Macaca mulatta* - LIU et al., 2008), rinoceronte branco (*Ceratotherium simum* - BEN-NUN et al., 2011), mandril (*Mandrillus leucophaeus* - BEN-NUN et al., 2011), leopardo das neves (*Panthera uncia* - VERMA et al., 2012), tigre de bengala (*Panthera tigris* - VERMA et al., 2013), serval (*Leptailurus serval* - VERMA et al., 2013), onça-pintada (*Panthera onca* - VERMA et al., 2013), mandarim (*Taeniopygia guttata* - ROSSELLÓ et al., 2013), peixe-zebra (*Danio rerio* - ROSSELLÓ et al., 2013), e morcego (*Myotis lucifugus* - MO; LI; WU, 2014), mas não há relatos de células iPSC de quaisquer espécies de cervídeos. Portanto, seria importante o desenvolvimento de células iPSC para a conservação da espécie *B. dichotomus* e de outros cervídeos ameaçados de extinção, sendo que este estudo serviria como modelo, visando a diferenciação dessas células pluripotentes em gametas.

HIPÓTESE

- As células obtidas dos tecidos de chifre, gordura e pele de *B. dichotomus* são células-tronco mesenquimais.
- A indução da pluripotência celular e a manutenção do seu estado indiferenciado *in vitro* são possíveis em células de chifre, gordura e pele na espécie *B. dichotomus* através de expressão forçada de fatores de transcrição exógenos conhecidos.
- As células de chifre, gordura e pele possuem plasticidade que permite sua diferenciação ao estado de células semelhantes a primordiais germinativas.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. A espécie *Blastocerus dichotomus*

O cervo-do-pantanal (*Blastocerus dichotomus*) é o maior cervídeo neotropical e um dos maiores mamíferos brasileiros. Os indivíduos adultos apresentam altura média de cernelha de 1,30 m, com fêmeas pesando cerca de 100 kg e machos pesando aproximadamente 130 kg. Sua pelagem é castanho-avermelhada, as extremidades dos membros, a cauda, o focinho e a região periocular são pretas, e a parte inferior do tórax, o abdômen, pescoço e face interna das orelhas são brancas. Os machos possuem chifres dicotomizados próximo à base, e destes dois ramos principais podem crescer até dez pontas, dependendo da idade e estado nutricional do animal (DUARTE, 1996). O desenvolvimento do primeiro par de galhadas ocorre com cerca de um ano e meio de vida e a troca desses chifres pode ocorrer em qualquer época do ano (DUARTE; GARCIA, 1997), sofrendo pouca ou nenhuma influência do fotoperíodo (PEREIRA, 2010). As fêmeas são poliétricas e apresentam estro pós-parto, refletindo a ausência de sazonalidade reprodutiva. O ciclo estral tem duração de 21 a 24 dias (DUARTE; GARCIA, 1995; POLEGATO, 2008), e a gestação de 251 à 271 dias (FRADICH, 1987; POLEGATO, 2008), com nascimento de apenas um filhote por gestação (DUARTE; GARCIA, 1995).

Originalmente a área de ocorrência de *B. dichotomus* abrangia as cinco regiões geográficas do Brasil (DUARTE, 1997). Porém, sua distribuição geográfica original foi drasticamente reduzida (Figura 1), sendo que aproximadamente 65% das áreas ocupadas pela espécie foram perdidas em apenas quatro décadas (WEBER; GONZALEZ, 2003). Em países como Uruguai e Peru a espécie possivelmente se extinguiu (GARCIA et al., 2001) e estados brasileiros que antes eram habitados com populações vigorosas de cervos (por exemplo São Paulo, Paraná, Rio Grande do Sul, Goiás, Minas Gerais e Bahia) possuem hoje apenas populações relictuais da espécie (PINDER; SEAL, 1994) havendo possibilidade de extinções locais em curto período de tempo

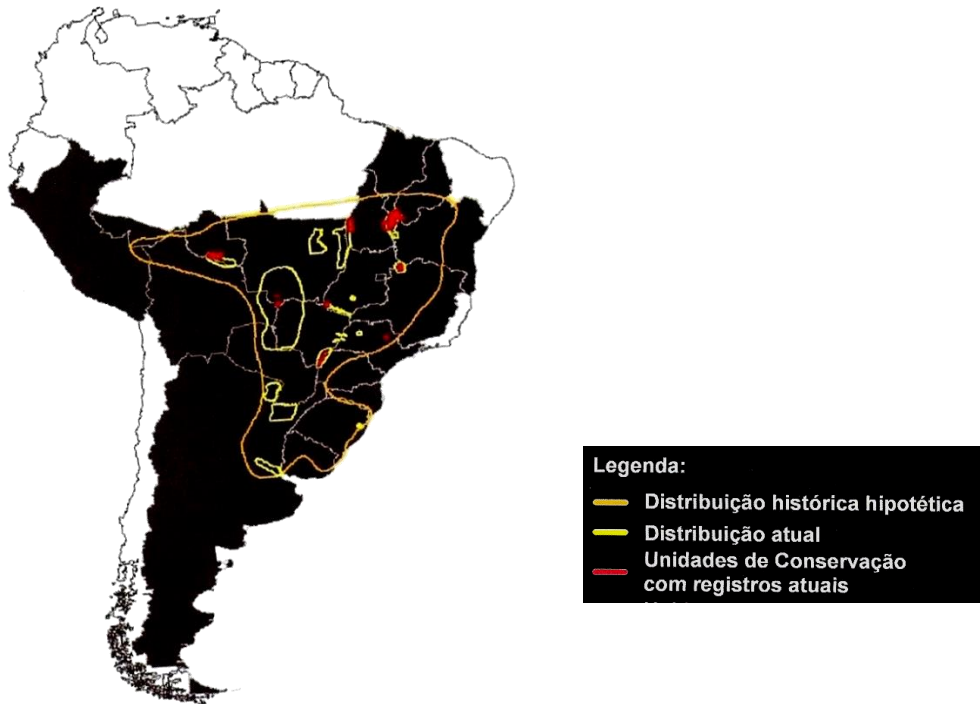


Figura 1 – Área de distribuição original (laranja) e atual (amarelo) das populações de *B. dichotomus*. Em vermelho estão as Unidades de Conservação encontradas na área de ocorrência da espécie. (Fonte: Plano de Ação Nacional para a Conservação dos Cervídeos Ameaçados de Extinção, Série espécies ameaçadas nº22, ICMBio 2011).

Além da perda e fragmentação do habitat, outros fatores são responsáveis pela diminuição das populações de cervo-do-pantanal, como a aproximação da espécie aos animais domésticos, favorecendo a transmissão de patógenos, e a caça (PINDER, 1996; DUARTE, 1997). Devido a estes fatores, é uma espécie classificada como vulnerável (VU) à extinção pela lista vermelha da “*International Union for Conservation of Nature*” (IUCN, 2015) e também pela Lista Nacional das Espécies da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção (MMA, 2003), e ainda se encontra na categoria de criticamente em perigo (CR) nas listas estaduais de Minas Gerais (BIODIVERSITAS, 2008), São Paulo (BRESSAN; KIERULFF; SUGIEDA, 2009), Paraná (MIKICH; BÉRNILS, 2004) e Rio Grande do Sul (MARQUES et al., 2002).

2.2 Programas de conservação para cervo-do-pantanal

Embora o cervo-do-pantanal se encontre presente em diversas unidades de conservação, essa estratégia não tem sido suficiente para assegurar a viabilidade das

populações diante das ameaças a que estão expostas (TIEPOLO; TOMAS; LIMA-BORGES, 2010). Sabe-se que, em populações pequenas, a perda de variabilidade genética ocorre principalmente devido à deriva genética. Essa diminuição da diversidade genética pode causar diminuição da fertilidade, menor resistência contra doenças infecciosas e parasitárias e menor flexibilidade de adaptação a um determinado ambiente (LACY, 1997). A endogamia deve ser evitada em pequenas populações porque pode aumentar substancialmente a possibilidade de fixação de alelos recessivos deletérios que podem causar a morte precoce dos indivíduos (DUARTE, 2001).

Em 1998 foi criado o programa de conservação desta espécie em cativeiro, visando manter estoque de material genético que poderia ser reintroduzido em populações de vida livre. Entretanto, para o sucesso deste programa é necessário que haja o fluxo genético entre as instituições envolvidas no programa e a manutenção da diversidade genética da população (DUARTE, 2001; ZANETTI; DUARTE, 2008). Um grande problema observado quando se tenta manter populações geneticamente viáveis *ex situ* é o processo de seleção imposto pelo cativeiro, que favorece a reprodução de apenas alguns indivíduos. A população de cervos-do-pantanal capturados na área inundada do Projeto Hidrelétrica Porto Primavera no Brasil pode ser citada como exemplo deste processo. Dos 105 animais capturados e mantidos em quarentena por 60 dias, 35% vieram a óbito, principalmente por causa da falta de adaptação ao cativeiro (DUARTE, 2001), e entre aqueles que sobreviveram, somente 35 geraram descendentes (DUARTE; CAPALBO, 2002).

No entanto, existem formas de minimizar os efeitos gerados pela seleção artificial, por meio da utilização de material genético criopreservado (WILDT, 1989). Assim, mesmo após muitas gerações criadas em cativeiro, o material genético poderá ser reintroduzido com o objetivo de recuperar a frequência de alelos originais dos animais oriundos de vida livre (DUARTE, 2001). Portanto, os bancos genômicos (sêmen, oócitos, embriões, fibroblastos, etc.) e as biotécnicas de reprodução assistida são ferramentas que contribuem diretamente para a conservação de espécies ameaçadas, uma vez que auxiliam o manejo reprodutivo, promovem a manutenção da variabilidade genética e a reprodução igualitária dos indivíduos (WILDT, 1989; HOLT; PICKARD, 1999).

Entretanto, a obtenção de gametas em espécies selvagens e a aplicação das biotécnicas reprodutivas é complexa. Mesmo quando se trata de materiais considerados de fácil obtenção, como é o caso de gametas masculinos, é possível encontrar alguns entraves. A colheita de ejaculado em cervídeos geralmente é feita por meio da eletroejaculação (JABBOUR; HAYSSSEN; BRUFORD, 1997). Este método exige a contenção química dos animais, havendo o risco anestésico iminente do procedimento, chance de contaminação do ejaculado com urina e de desencadeamento de estresse agudo nos indivíduos (WILDT, 1989). Além disso, a técnica de eletroejaculação em cervo-do-pantanal não possibilita a obtenção de ejaculado de todos os animais, com taxa de insucesso de cerca de 20% (falha na colheita de quatro de um total de vinte e dois indivíduos) (GARCIA et al., 2001; NUNES et al., 2001).

O principal obstáculo se dá na obtenção de gametas femininos e embriões. Estudos visando colher embriões foram realizados em *B. dichotomus* recentemente. Foram testados 6 diferentes protocolos em 17 animais, resultando na coleta de apenas 2 embriões viáveis durante todo projeto (J.M.B. Duarte, 2015, comunicação pessoal). Esse é um exemplo que ilustra as dificuldades em estabelecer protocolos hormonais que possibilitassem a superovulação e colheita específicas para esta espécie. Estudos em outras espécies de cervídeos também têm demonstrado resultados muitas vezes desanimadores para a obtenção de embriões devido à variabilidade da resposta superovulatória, as baixas taxas de fertilização bem como da colheita de embriões (FENNESSY et al., 1989; ZANETTI, 2009; ZANETTI; DUARTE, 2012; ZANETTI et al., 2014). A colheita de oócitos em cervídeos tem resultado em quantidade satisfatória de gametas por indivíduo/seção de colheita (COMIZZOLI et al., 2001; LOCATELLI et al., 2006; SIRIAROONTAT, 2006; SIRIAROONRAT et al., 2010; ROLA, 2013). Porém, há necessidade de grande número de oócitos para estabelecer técnicas como a PIVE e clonagem, o que se torna inviável considerando o baixo número de indivíduos disponíveis para as pesquisas. Além disso, tanto a congelação/vitrificação de embriões e, principalmente a de oócitos, são processos complexos e que praticamente não têm sido estudados em cervídeos (LEIBO; SONGSASEN, 2002).

A facilidade em se obter e congelar tecidos e células tornam estas fontes de material biológico muito promissoras. Avanços recentes na tecnologia de células-tronco têm proporcionado abordagens alternativas, em que células pluripotentes são capazes de se diferenciar em gametas (oócitos e espermatozoides) (CHELOUFI; HOCHEDLINGER, 2012) e células-tronco multipotentes podem facilitar a reprogramação celular ao servirem como células doadoras para clonagem por transferência nuclear (LIU, 2001; HOCHEDLINGER E JAENISCH, 2002).

2.3 Células-tronco como potencial para auxiliar na conservação de espécies ameaçadas

As células-tronco embrionárias (ESC) são pluripotentes e têm potencial para se diferenciarem em todos os tipos celulares que compõe um indivíduo, possuem capacidade ilimitada de expansão quando cultivadas em condições adequadas, e podem ser congeladas e descongeladas sem perder suas características originais. Entretanto, a dificuldade na obtenção de embriões em espécies selvagens torna quase impossível obter as ESC. Além disso, é que possível a obtenção de linhagens de ESC seja uma tarefa complexa para os cervídeos, uma vez que muitos trabalhos têm relatado dificuldades para derivar e manter linhagens de ESC de espécies de ungulados domésticos (BREVINI et al., 2007; KEEFER et al., 2007; VACKOVA; UNGROVA; LOPES, 2007; TALBOT; BLOMBERG, 2008). Nestas espécies, muitas das linhagens obtidas se proliferam lentamente, perdem os marcadores de pluripotência ou param de se dividir em passagens iniciais (SAITO; STRELCHENKO; NIEMANN, 1992; MUÑOZ et al., 2008; CAO et al., 2009; MALAVER-ORTEGA et al., 2012; MARUOTTI et al., 2012). Uma alternativa para essa questão é a utilização das células-tronco de pluripotência induzida (iPSC), reprogramando células somáticas para que expressem a pluripotência de maneira semelhante às ESC. Takahashi e Yamanaka, (2006) foram os primeiros a obter iPSC, por meio da expressão de quatro fatores de transcrição exógenos (Oct4, Sox2, KLF4 e c-Myc). Os fatores de transcrição exógenos conseguem alterar o perfil de transcrição endógeno das células, o que favorece a indução bem como manutenção da pluripotência.

Por meio da diferenciação de células pluripotentes (ESC e iPSC) de camundongo, Hayashi et al., (2011) induziram à formação de oócitos e células

espermáticas funcionais, após transplantarem PGCLs para o túbulo seminífero, ou para a bursa ovárica (HAYASHI et al., 2012; HAYASHI; SAITOU; YAMANAKA, 2012). Após a formação destes gametas, foi possível produzir embriões e alguns deles deram origem a filhotes saudáveis que cresceram até a vida adulta (HAYASHI et al., 2012; HAYASHI; SAITOU; YAMANAKA, 2012). Recentemente, trabalhos demonstraram a capacidade de recriar toda a gametogênese, inclusive a meiose, *in vitro* em camundongos, gerando crias saudáveis. Após diferenciar as iPSC até o estado de PGCLs, estas células foram cultivadas com células somáticas testiculares neonatais, possibilitando a formação de espermátides (ZHOU et al., 2016), enquanto Hikabe et al., (2016) cultivaram as PGCLs em conjunto com células somáticas de ovários de embriões, e por meio deste ovário reconstruído foram produzidos oócitos, que deram origem a indivíduos saudáveis. Em humanos, também foi possível a obtenção de células haploides semelhantes à espermátides a partir de iPSC, no entanto, sem provas sobre sua fertilidade até o momento (EASLEY et al., 2012).

Portanto, a utilização das iPSC oferece a possibilidade de obtenção de gametas e traz vantagens como: 1) a partir da obtenção de um único fragmento de tecido tornam-se fonte inesgotável de gametas, mesmo após a morte do animal; 2) torna desnecessária a contenção química/física dos animais sucessivas vezes para a obtenção de gametas e embriões, uma vez que uma única colheita de tecido é suficiente; 3) facilita a possibilidade de obter material de animais de vida livre, uma vez que não necessita do desenvolvimento de protocolos hormonais e métodos para a colheita dos gametas e embriões; 4) permite o desenvolvimento e a aplicação das biotecnologias reprodutivas e, por meio delas, a obtenção de embriões; 5) possibilita utilizar animais logo após seu nascimento, nas quais ainda não há a produção de gametas, ou ainda de animais senis que dispõe de gametas com baixa qualidade; 6) dispensa a necessidade de congelar/vitrificar oócitos e embriões, que possuem maior complexidade em se manterem viáveis após esses processos em relação a congelação das iPSC.

2.4 Reprogramação de células somáticas em células de pluripotência induzida

A eficiência de reprogramação das iPSC varia significativamente entre os diferentes tipos de células, sendo mais baixa em células terminalmente diferenciadas

e mais rápida e eficiente em células adultas menos diferenciadas ou indiferenciadas (LEE et al., 2010). Portanto, levando-se em consideração o desenvolvimento de linhagens de iPSC, a escolha do tipo celular a ter a pluripotência induzida é relevante e questões como a capacidade da célula em se reprogramar, a facilidade de acesso ao tecido e a facilidade de manter as células *in vitro* devem ser consideradas.

No caso dos cervídeos, existe a possibilidade singular de se trabalhar com células-tronco de chifres. Por ser um exemplo único de regeneração nos mamíferos, os chifres são utilizados como modelo nos estudos de redução da formação de cicatrizes, resistência à formação de tumores em uma estrutura de rápido crescimento e abordagens terapêuticas para o estímulo da regeneração de membros (KIERDORF; KIERDORF, 2011). Eles são estruturas que são substituídas periodicamente devido à proliferação de células-tronco e se projetam a partir do osso frontal de veados machos e também de fêmeas no caso das renas (*Rangifer tarandus*) (KIERDORF; KIERDORF, 2011), o que restringe a obtenção desse tipo de material em fêmeas de outras espécies. Estudos prévios com *Cervus elaphus* e *Dama dama* demonstraram que o perióstio do pedículo contém células que expressam diferentes marcadores de células-tronco (CD9, OCT-4, Nanog, STRO-1) (ROLF et al., 2008; LI; YANG; SHEPPARD, 2009), porém não há relatos de criação de linhagens iPSC a partir dessa fonte de tecido.

As células-tronco derivadas de tecido adiposo são outra fonte interessante para se trabalhar, uma vez que alguns autores a consideram como a fonte ideal de células somáticas para a obtenção de iPSC (TAT et al., 2010), pois possuem rápida proliferação, e tem demonstrado gerar linhas de células iPSC de maneira mais eficiente do que outros tipos de tecido (por exemplo fibroblastos embrionários de rato e células-tronco neurais adultas). Além disso, há possibilidade de fácil acesso à grande quantidade de material (COLEMAN, 1995; YOKOMIZO; BENEMOND; KADUNC, 2005; YARAK; OKAMOTO, 2010) e é possível obter este tecido em ambos os sexos em qualquer momento da vida do indivíduo.

Apesar de muitos estudos já terem sido realizados, o mecanismo preciso da reprogramação ainda permanece desconhecido (RAIS et al., 2013). É sabido que colônias que não são iPSC muitas vezes aparecem num estágio de reprogramação intermediário, porém, as características destas células que falharam em reprogramar

ainda não são compreendidas (OHNISHI et al., 2014). Para caracterizar as diferentes fases da reprogramação, análises moleculares definiram nove categorias de expressão dos genes, cuja superexpressão ou silenciamento levam à formação da iPSC. A falha em ativar estes genes e seus relacionados constituem barreiras na reprogramação e são parte da razão pela qual a formação das iPSC é ineficiente e leva um tempo relativamente longo (POLO et al., 2012). A observação de duas grandes ondas de transcrição e um período intermediário de menos mudanças é condizente com estudos anteriores que identificaram três fases na reprogramação: iniciação, maturação e estabilização (SAMAVARCHI-TEHRANI et al., 2010).

As células iPSC já foram derivadas a partir de células somáticas em muitas espécies de mamíferos, porém não há relatos de células iPSC em cervídeos. O desenvolvimento de células iPSC visando sua diferenciação em gametas no futuro seria importante para auxiliar na conservação da família Cervidae e estudos com *B. dichotomus*, uma espécie ameaçada de extinção, beneficiariam a própria espécie e poderiam servir como modelo para a obtenção de iPSC em outros cervídeos.

2.5 Produção de células da linhagem germinativa *in vitro*

A última década foi marcada pelo substancial progresso nos métodos para o desenvolvimento de linhagens germinativas *in vitro*. Entre todas as células do corpo, as células germinativas passam pela reprogramação epigenética mais drástica, além do rearranjo dos genes alelos por meio do crossing over (HANDEL; EPPIG; SCHIMENTI, 2014). Essa reprogramação epigenética sofrida pelas células germinativas envolve também o “*imprinting*” genômico. Já foi descrito em experimentos que utilizaram a TNCS que os genomas materno e paterno são necessários para o desenvolvimento embrionário normal (MCGRATH; SOLTER, 1984). O “*imprinting*” genômico envolve a expressão de um conjunto específico de genes que é definida pela origem parental, ou seja, os genomas materno e paterno se distinguem um do outro devido a metilação diferencial dos gametas masculino e feminino (REIK; WALTER, 2001). Antes de colonizar a crista genital durante o desenvolvimento *in vivo*, as PGCs são altamente metiladas, de forma semelhante ao padrão das demais células somáticas da massa celular interna. Entretanto, esse perfil epigenético estabelecido deve ser apagado nas PGCs que, portanto, sofrem

desmetilação e tem seu “*imprinting*” apagado. Isso garante que o “*imprinting*” parental seja estabelecido adequadamente nos gametas (NICHOLAS et al., 2009). No caso das PGCs de fêmea, o cromossomo X que foi aleatoriamente inativado nas demais células da massa celular interna é reativado (SAGA, 2008).

Muitos estudos têm mostrado ser possível a diferenciação *in vitro* de células-tronco embrionárias (ESC) e de pluripotência induzida (iPSC) em células semelhantes as germinativas primordiais (PGCLs) (HÜBNER et al., 2003; CLARK et al., 2004; GEIJSEN et al., 2004; KEE et al., 2006, 2009; NAYERNIA et al., 2006; SASAKI et al., 2015) ou mesmo em oócitos ou espermatozoides funcionais após passarem por uma etapa *in vivo* (EASLEY et al., 2012; HAYASHI et al., 2011; HAYASHI et al., 2012) ou completa gametogênese *in vitro* (HIKABE et al., 2016; ZHOU et al., 2016).

Entre os trabalhos de maior destaque, se encontram os realizados em camundongos por Hayashi e colaboradores (HAYASHI et al., 2011, 2012; HAYASHI; SAITOU; YAMANAKA, 2012). Estes pesquisadores diferenciaram ESC ou iPSC em células semelhantes às do epiblasto (EpiCLs), que quando cultivados na presença de “*bone morphogenetic protein 4*” (BMP4), deram origem a PGCLs. Após serem transplantadas em túbulos seminíferos de um receptor infértil, estas células possibilitaram o reestabelecimento da espermatogênese, e gametas haploides foram usados para fertilizar oócitos por meio da ICSI (HAYASHI et al., 2011). Já para as fêmeas, após gerar EpiCLs e PGCLs, estas células foram agregadas as células somáticas ovarianas de feto, formando como um ovário reconstruído, e transplantadas na bursa ovariana de receptoras, onde foi possível produzir oócitos funcionais capazes de gerar crias saudáveis (HAYASHI et al., 2012; HAYASHI; SAITOU; YAMANAKA, 2012). Em humanos, estudos relataram sucesso na geração de células germinativas haploides *in vitro* a partir de células pluripotentes (GEIJSEN et al., 2004; EGUIZABAL et al., 2011). No entanto, nenhum desses estudos mostrou até o momento a funcionalidade destas células ou trouxe provas convincentes da ocorrência da meiose.

Recentemente, foi relatado um passo importantíssimo para a produção de gametas em laboratório: a completa meiose *in vitro*. Nestes estudos para linhagens de macho foram utilizadas células ESC, que após serem diferenciadas ao estágio de EpiCLs e posteriormente de PGCLs, foram co-cultivadas com células dissociadas de

testículos de camundongos neonatais na presença de ácido retinoico (RA), BMP2/4/7 e Actina A. No dia 6 as PGCLs entraram na primeira prófase da meiose durante os primeiros 6 dias, e a partir daí o meio de co-cultivo foi suplementado com hormônio folículo-estimulante (FSH), extrato de pituitária de bovino (BPE) e testosterona, possibilitando que as células completassem a meiose após 8 dias. Essas células, consideradas como semelhante as espermatídes, possibilitaram gerar descendentes férteis mediante seu uso na ICSI (ZHOU et al., 2016). Para linhagens de fêmeas foram utilizadas tanto ESC quanto iPSC, que após serem diferenciadas para o estágio de EpiCLs e, posteriormente, de PGCLs, foram agregadas a células somáticas gonadais fetais de fêmea, formando “ovários reconstruídos”. Após passarem pela etapa de diferenciação e crescimento *in vitro* em sistema de cultivo especial, os oócitos foram maturados, fertilizados e transferidos para receptoras, que deram origem a filhotes saudáveis (HIKABE et al., 2016).

Muitos trabalhos para a transdiferenciação de células mesenquimais (MSC) em células semelhantes às germinativas também foram realizados (NAYERNIA et al., 2006; HUA et al., 2009a, 2009b, 2011; MAKOOLATI; MOVAHEDIN; FOROUZANDEH-MOGHADAM, 2011; MAZAHERI et al., 2011; SHIRAZI et al., 2012; HOSSEINZADEH SHIRZEILY et al., 2013; JOUNI et al., 2014; LI et al., 2014). Ainda, outros estudos demonstraram a formação de células semelhantes a oócitos a partir de células mesenquimais (MSC) (DANNER et al., 2006; SONG et al., 2011; QIU et al., 2013; YU et al., 2014). Para realizar a diferenciação, estes trabalhos utilizaram RA ou BMP4 e dentre as linhagens de MSC testadas para a diferenciação encontram-se gordura, medula óssea, pele, tecido ovariano, pulmão, cordão umbilical e pâncreas.

O BMP4 e o BMP8 são fisiologicamente produzidos pelo ectoderma extraembrionário e são críticos para gerar as PGCs *in vivo*. Estudos anteriores demonstraram que o BMP4 sozinho é suficiente para levar as células do epiblasto a se transformarem em PGCs. Já o RA demonstrou promover a diferenciação de ESC em células germinativas, e até mesmo gametas funcionais, que puderam iniciar e suportar o desenvolvimento de crias após realizar ICSI (GEIJSEN et al., 2004; NAYERNIA et al., 2006). O início da meiose é estimulado pelo RA e mediado pelo gene *Stra8* (KOUBOVA et al., 2006). Outros genes como o *DDX4* e o *DAZL* são de grande importância no desenvolvimento e identificação da linhagem germinativa, uma

vez que também se relacionam com o início da meiose. Em humanos, ESC/iPSC que mostraram superexpressão de DAZL e DDX4, iniciaram a meiose, e geraram células haploides com uma eficiência de 2% após passar por 2 semanas em cultivo de diferenciação (KEE et al., 2009; PANULA et al., 2011; MEDRANO et al., 2012).

3. OBJETIVOS

Objetivos gerais

- Derivar e caracterizar linhagens de células-tronco multipotentes de tecidos adiposo, chifre e pele de *B. dichotomus*.
- Derivar e caracterizar linhagens de células-tronco de pluripotência induzida (iPSC) de *B. dichotomus* por meio da reprogramação gênica de linhagens de células-tronco multipotentes (chifre, gordura e pele).
- Realizar a diferenciação celular de linhagens multipotentes (gordura, chifre e pele) de *B. dichotomus* em células semelhantes as germinativas primordiais.

Objetivos específicos

- Obtenção, isolamento, cultivo e caracterização de células obtidas da gordura, chifre e pele da espécie *B. dichotomus*.
- Produzir linhagens estáveis de iPSC a partir de células-tronco adultas (chifre, gordura e pele) de *B. dichotomus*.
- Comparar a eficiência da reprogramação das iPSC entre os diferentes tipos celulares testados em *B. dichotomus*
- Comparar a eficiência da reprogramação dos diferentes métodos de indução de pluripotência
- Identificar fatores que favoreçam a diferenciação de células multipotentes de *B. dichotomus* em células semelhantes às germinativas primordiais (PGCLs)
- Reprogramar células multipotentes de *B. dichotomus* para PGCLs utilizando protocolos anteriormente descritos com células pluripotentes

4. REFERÊNCIAS

BAO, L.; HE, L.; CHEN, J.; WU, Z.; LIAO, J.; RAO, L.; REN, J.; LI, H.; ZHU, H.; QIAN, L.; GU, Y.; DAI, H.; XU, X.; ZHOU, J.; WANG, W.; CUI, C.; XIAO, L. Reprogramming of ovine adult fibroblasts to pluripotency via drug-inducible expression of defined factors. **Cell Research**, v. 21, n. 4, p. 600–608, 2011.

BEN-NUN, I. F.; MONTAGUE, S. C.; HOUCK, M. L.; TRAN, H. T.; GARITAONANDIA, I.; LEONARDO, T. R.; WANG, Y.-C.; CHARTER, S. J.; LAURENT, L. C.; RYDER, O. A.; LORING, J. F. Induced pluripotent stem cells from highly endangered species. **Nature Methods**, v. 8, n. 10, p. 829–831, 2011.

BIODIVERSITAS. **Listas Vermelhas das Espécies da Fauna e da Flora Ameaçada de Extinção em Minas Gerais**. 2008. Disponível em: <<http://www.biodiversitas.org.br/cdlistavermelha/default.asp>>. Acesso em: 1 mar. 2013.

BRESSAN, P.; KIERULFF, M.; SUGIEDA, A. **Fauna ameaçada de extinção no estado de são paulo: vertebrados**. São Paulo: Secretaria do Meio Ambiente, 2009.

BREVINI, T. A. L.; ANTONINI, S.; CILLO, F.; CRESTAN, M.; GANDOLFI, F. Porcine embryonic stem cells: Facts, challenges and hopes. **Theriogenology**, v. 68, p. 206–213, 2007.

CAO, S.; WANG, F.; CHEN, Z.; LIU, Z.; MEI, C.; WU, H.; HUANG, J.; LI, C.; ZHOU, L.; LIU, L. Isolation and culture of primary bovine embryonic stem cell colonies by a novel method. **Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology**, v. 311, n. 5, p. 368–376, 2009.

CHANG, M.-Y.; KIM, D.; KIM, C.-H.; KANG, H.-C.; YANG, E.; MOON, J.-I.; KO, S.; PARK, J.; PARK, K.-S.; LEE, K.-A.; HWANG, D.-Y.; CHUNG, Y.; LANZA, R.; KIM, K.-S. Direct Reprogramming of Rat Neural Precursor Cells and Fibroblasts into Pluripotent Stem Cells. **PLoS ONE**, v. 5, n. 3, p. e9838, 2010.

CHELOUFI, S.; HOCHEDLINGER, K. Reproductive biology: Stem cells bear eggs. **Nature**, v. 491, n. 7425, p. 535–536, 2012.

CLARK, A. T.; BODNAR, M. S.; FOX, M.; RODRIQUEZ, R. T.; ABEYTA, M. J.; FIRPO, M. T.; PERA, R. A. Spontaneous differentiation of germ cells from human embryonic stem cells in vitro. **Human Molecular Genetics**, v. 13, n. 7, p. 727–739, 2004.

COLEMAN, S. R. Long-Term survival of fat transplants: Controlled demonstrations. **Aesthetic Plastic Surgery**, v. 19, n. 5, p. 421–425, 1995.

COMIZZOLI, P.; MERMILLOD, P.; COGNIÉ, Y.; CHAI, N.; LEGENDRE, X.; MAUGET, R. Successful in vitro production of embryos in the red deer (*Cervus elaphus*) and the sika deer (*Cervus nippon*). **Theriogenology**, v. 55, n. 2, p. 649–659, 2001.

DANNER, S.; KAJAHN, J.; GEISMANN, C.; KLINK, E.; KRUSE, C. Derivation of oocyte-like cells from a clonal pancreatic stem cell line. **Molecular Human Reproduction**, v. 13, n. 1, p. 11–20, 2006.

DENG, Y.; LIU, Q.; LUO, C.; CHEN, S.; LI, X.; WANG, C.; LIU, Z.; LEI, X.; ZHANG, H.; SUN, H.; LU, F.; JIANG, J.; SHI, D. Generation of Induced Pluripotent Stem Cells From Buffalo (*Bubalus bubalis*) Fetal Fibroblasts with Buffalo Defined Factors. **Stem Cells and Development**, v. 21, n. 13, p. 2485–2494, 2012.

DUARTE, J. M. B. **Guia de identificação de cervídeos brasileiros**. Jaboticabal: Funep, 1996.

DUARTE, J. M. B. **Biologia e conservacao de cervideos sul americanos**. Jaboticabal: Funep, 1997.

DUARTE, J. M. B. **O cervo do- pantanal (*blastocerus dichotomus*) de porto primavera. resultado de dois anos de pesquisa**. Jaboticabal: Funep, 2001.

DUARTE, J. M. B. Coleta, conservação e multiplicação de recursos genéticos em animais silvestres: o exemplo dos cervídeos. **Agrociencia**, v. 9, n. 1–2, p. 541–544, 2005.

DUARTE, J. M. B.; CAPALBO, C. R. **O cervo-dopantanal de porto primavera: livro de registro genealógico e protocolo básico de manejo em cativeiro**. Jaboticabal: Funep, 2002.

DUARTE, J. M. B.; GARCIA, J. M. Reprodução assistida em Cervidae brasileiros. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 19, n. 1–2, p. 111–121, 1995.

DUARTE, J. M. B.; GARCIA, J. M. Tecnologia da reprodução para propagação e conservação de espécies ameaçadas de extinção. In: DUARTE, J. M. B. (Ed.). **Biologia e Conservação de Cervídeos Sul-americano: Blastocerus, Ozotocerus e Mazama**. Jaboticabal: Funep, 1997. p. 228–238, 1997.

EASLEY, C. A.; PHILLIPS, B. T.; MCGUIRE, M. M.; BARRINGER, J. M.; VALLI, H.; HERMANN, B. P.; SIMERLY, C. R.; RAJKOVIC, A.; MIKI, T.; ORWIG, K. E.; SCHATTEEN, G. P. Direct Differentiation of Human Pluripotent Stem Cells into Haploid Spermatogenic Cells. **Cell Reports**, v. 2, n. 3, p. 440–446, 2012.

EGUIZABAL, C.; MONTSERRAT, N.; VASSENA, R.; BARRAGAN, M.; GARRETA, E.; GARCIA-QUEVEDO, L.; VIDAL, F.; GIORGETTI, A.; VEIGA, A.; BELMONTE, J. C. I. Complete Meiosis from Human Induced Pluripotent Stem Cells. **Stem Cells**, v. 29, n. 8, p. 1186–1195, 2011.

ESTEBAN, M. A.; XU, J.; YANG, J.; PENG, M.; QIN, D.; LI, W.; JIANG, Z.; CHEN, J.; DENG, K.; ZHONG, M.; CAI, J.; LAI, L.; PEI, D. Generation of Induced Pluripotent Stem Cell Lines from Tibetan Miniature Pig. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 26, p. 17634–17640, 2009.

FENNESSY, P. F.; FISHER, M. W.; SHACKELL, G. .; MACKINTOSH, C. G. Superovulation and embryo recovery in Red deer (*Cervus elaphus*) hinds. **Theriogenology**, v. 32, n. 5, p. 877–883, 1989.

FRADICH, H. The husbandry of tropical and temperate cervids in the West Berlin Zoo. In: WEMMER, C. (Ed.). **Biology and management of the Cervidae**. Washington: Smithsonian Inst Press, 1987. p. 422–428, 1987.

GARCIA, J. M. B.; FERREIRA, J. C. P.; LOPES, M. D.; NASCIMENTO, C. C.; BARROSO, L. A.; SILVA, A. A. R. E. Avaliação de alguns parâmetros da situação reprodutiva da população de cervos-do pantanal da área do reservatório da Usina Hidrelétrica de Porto Primavera. In: DUARTE, J. M. B. (Ed.). **O cervo-do-pantanal de Porto Primavera: resultado de dois anos de pesquisa**. Jaboticabal: Funep, 2001. p. CD-ROM, 2001.

GEIJSEN, N.; HOROSCHAK, M.; KIM, K.; GRIBNAU, J.; EGGAN, K.; DALEY, G. Q. Derivation of embryonic germ cells and male gametes from embryonic stem cells.

Nature, v. 427, n. 6970, p. 148–154, 2004.

HANDEL, M. A.; EPPIG, J. J.; SCHIMENTI, J. C. Applying “Gold Standards” to In-Vitro-Derived Germ Cells. **Cell**, v. 157, n. 6, p. 1257–1261, 2014.

HAYASHI, K.; OGUSHI, S.; KURIMOTO, K.; SHIMAMOTO, S.; OHTA, H.; SAITOU, M. Offspring from Oocytes Derived from in Vitro Primordial Germ Cell-like Cells in Mice. **Science**, v. 338, n. 6109, p. 971–975, 2012.

HAYASHI, K.; OHTA, H.; KURIMOTO, K.; ARAMAKI, S.; SAITOU, M. Reconstitution of the Mouse Germ Cell Specification Pathway in Culture by Pluripotent Stem Cells. **Cell**, v. 146, n. 4, p. 519–532, 2011.

HAYASHI, Y.; SAITOU, M.; YAMANAKA, S. Germline development from human pluripotent stem cells toward disease modeling of infertility. **Fertility and Sterility**, v. 97, n. 6, p. 1250–1259, 2012.

HIKABE, O.; HAMAZAKI, N.; NAGAMATSU, G.; OBATA, Y.; HIRAO, Y.; HAMADA, N.; SHIMAMOTO, S.; IMAMURA, T.; NAKASHIMA, K.; SAITOU, M.; HAYASHI, K. Reconstitution in vitro of the entire cycle of the mouse female germ line. **Nature**, v. 539, n. 7628, p. 299–303, 2016.

HOLT, W. V.; PICKARD, A. R. Role of reproductive technologies and genetic resource banks in animal conservation. **Reviews of Reproduction**, v. 4, p. 143–150, 1999.

HONDA, A.; HIROSE, M.; HATORI, M.; MATOBA, S.; MIYOSHI, H.; INOUE, K.; OGURA, A. Generation of Induced Pluripotent Stem Cells in Rabbits: Potential Experimental Models for Human Regenerative Medicine. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 41, p. 31362–31369, 2010.

HOSSEINZADEH SHIRZEILY, M.; PASBAKSH, P.; AMIDI, F.; MEHRANNIA, K.; SOBHANI, A. Comparison of differentiation potential of male mouse adipose tissue and bone marrow derived-mesenchymal stem cells into germ cells. **Iranian Journal of Reproductive Medicine**, v. 11, n. 2, p. 965–976, 2013.

HUA, J.; PAN, S.; YANG, C.; DONG, W.; DOU, Z.; SIDHU, K. S. Derivation of male germ cell-like lineage from human fetal bone marrow stem cells. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 19, n. 1, p. 99–105, 2009a.

HUA, J.; QIU, P.; ZHU, H.; CAO, H.; WANG, F.; LI, W. Multipotent mesenchymal stem cells (MSCs) from human umbilical cord: Potential differentiation of germ cells. **African Journal of Biochemistry Research**, v. 5, n. 4, p. 113–123, 2011.

HUA, J.; YU, H.; DONG, W.; YANG, C.; GAO, Z.; LEI, A.; SUN, Y.; PAN, S.; WU, Y.; DOU, Z. Characterization of mesenchymal stem cells (MSCs) from human fetal lung: Potential differentiation of germ cells. **Tissue and Cell**, v. 41, n. 6, p. 448–455, 2009b.

HÜBNER, K.; FUHRMANN, G.; CHRISTENSON, L. K.; KEHLER, J.; REINBOLD, R.; FUENTE, R.; WOOD, J.; STRAUSS III, J. F.; BOIANI, M.; SCHÖLER, H. R. Derivation of Oocytes from Mouse Embryonic Stem Cells. **Science**, v. 300, n. 5623, p. 1251–1256, 2003.

IUCN. **The International Union for Conservation of Nature Red List of Threatened Species. Version 2015-4.** . Acesso em: 1 jan. 2016.

JABBOUR, H. N.; HAYSEN, V.; BRUFORD, M. W. Conservation of deer: contributions from molecular biology, evolutionary ecology, and reproductive physiology. **Journal of Zoology**, v. 243, n. 3, p. 461–484, 1997.

JOUNI, F. J.; ABDOLMALEKI, P.; BEHMANESH, M.; MOVAHEDIN, M. An in vitro study of the impact of 4mT static magnetic field to modify the differentiation rate of rat bone marrow stem cells into primordial germ cells. **Differentiation**, v. 87, n. 5, p. 230–237, 2014.

KEE, K.; ANGELES, V. T.; FLORES, M.; NGUYEN, H. N.; REIJO PERA, R. A. Human DAZL, DAZ and BOULE genes modulate primordial germ-cell and haploid gamete formation. **Nature**, v. 462, n. 7270, p. 222–225, 2009.

KEE, K.; GONSALVES, J. M.; CLARK, A. T.; PERA, R. A. R. Bone Morphogenetic Proteins Induce Germ Cell Differentiation from Human Embryonic Stem Cells. **Stem Cells and Development**, v. 15, n. 6, p. 831–837, 2006.

KEEFER, C. L.; PANT, D.; BLOMBERG, L.; TALBOT, N. C. Challenges and prospects for the establishment of embryonic stem cell lines of domesticated ungulates. **Animal Reproduction Science**, v. 98, n. 1–2, p. 147–168, 2007.

KIERDORF, U.; KIERDORF, H. Deer Antlers – A Model of Mammalian Appendage Regeneration: An Extensive Review. **Gerontology**, v. 57, n. 1, p. 53–65, 2011.

KOUBOVA, J.; MENKE, D. B.; ZHOU, Q.; CAPEL, B.; GRISWOLD, M. D.; PAGE, D. C. Retinoic acid regulates sex-specific timing of meiotic initiation in mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 8, p. 2474–2479, 2006.

LACY, R. C. Importance of Genetic Variation to the Viability of Mammalian Populations. **Journal of Mammalogy**, v. 78, n. 2, p. 320–335, 1997.

LEE, H. J.; HORE, T. A.; REIK, W. Reprogramming the Methylome: Erasing Memory and Creating Diversity. **Cell Stem Cell**, v. 14, n. 6, p. 710–719, 2014.

LEE, S.-L.; KANG, E.-J.; MAENG, G.-H.; KIM, M.-J.; PARK, J.-K.; KIM, T.-S.; HYUN, S.-H.; LEE, E.-S.; RHO, G.-J. Developmental Ability of Miniature Pig Embryos Cloned with Mesenchymal Stem Cells. **Journal of Reproduction and Development**, v. 56, n. 2, p. 256–262, 2010.

LEIBO, S. P.; SONGSASEN, N. Cryopreservation of gametes and embryos of non-domestic species. **Theriogenology**, v. 57, n. 1, p. 303–326, 2002.

LI, C.; YANG, F.; SHEPPARD, A. Adult Stem Cells and Mammalian Epimorphic Regeneration-Insights from Studying Annual Renewal of Deer Antlers. **Current Stem Cell Research & Therapy**, v. 4, n. 3, p. 237–251, 2009.

LI, N.; PAN, S.; ZHU, H.; MU, H.; LIU, W.; HUA, J. BMP4 promotes SSEA-1 + hUC-MS-C differentiation into male germ-like cells in vitro. **Cell Proliferation**, v. 47, n. 4, p. 299–309, 2014.

LINHER, K.; LI, J. From Stem Cell to Gamete. In: **Comprehensive Biotechnology**. [s.l.] Elsevier, 2011. p. 407–416, 2011.

LIU, H.; ZHU, F.; YONG, J.; ZHANG, P.; HOU, P.; LI, H.; JIANG, W.; CAI, J.; LIU, M.; CUI, K.; QU, X.; XIANG, T.; LU, D.; CHI, X.; GAO, G.; JI, W.; DING, M.; DENG, H. Generation of Induced Pluripotent Stem Cells from Adult Rhesus Monkey Fibroblasts. **Cell Stem Cell**, v. 3, n. 6, p. 587–590, 2008.

LOCATELLI, Y.; VALLET, J. C.; HUYGHE, F. P.; COGNIÉ, Y.; LEGENDRE, X.; MERMILLOD, P. Laparoscopic ovum pick-up and in vitro production of sika deer embryos: Effect of season and culture conditions. **Theriogenology**, v. 66, n. 5, p. 1334–1342, 2006.

LU, Y.; WEST, F. D.; JORDAN, B. J.; MUMAW, J. L.; JORDAN, E. T.; GALLEGOS-CARDENAS, A.; BECKSTEAD, R. B.; STICE, S. L. Avian-Induced Pluripotent Stem Cells Derived Using Human Reprogramming Factors. **Stem Cells and Development**, v. 21, n. 3, p. 394–403, 2012.

MAKOOLATI, Z.; MOVAHEDIN, M.; FOROUZANDEH-MOGHADAM, M. Bone morphogenetic protein 4 is an efficient inducer for mouse embryonic stem cell differentiation into primordial germ cell. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal**, v. 47, n. 5–6, p. 391–398, 2011.

MALAVAR-ORTEGA, L. F.; SUMER, H.; LIU, J.; VERMA, P. J. The state of the art for pluripotent stem cells derivation in domestic ungulates. **Theriogenology**, v. 78, n. 8, p. 1749–1762, 2012.

MARQUES, A. A. B. de; SUERTEGARAY, C.; FONTANA; VÉLEZ, E.; BENCKE, G. A.; SCHNEIDER, M.; REIS, R. E. **Lista das espécies da fauna ameaçadas de extinção no rio grande do sul**. Porto Alegre: FZB/MCT–PUCRS/PANGEA, 2002.

MARUOTTI, J.; MUÑOZ, M.; DEGRELLE, S. A.; GÓMEZ, E.; LOUET, C.; MONFORTE, C. D.; DE LONGCHAMP, P. H.; BROCHARD, V.; HUE, I.; CAAMAÑO, J. N.; JOUNEAU, A. Efficient derivation of bovine embryonic stem cells needs more than active core pluripotency factors. **Molecular Reproduction and Development**, v. 79, n. 7, p. 461–477, 2012.

MAZAHERI, Z.; MOVAHEDIN, M.; RAHBARIZADEH, F.; AMANPOUR, S. Different doses of bone morphogenetic protein 4 promote the expression of early germ cell-specific gene in bone marrow mesenchymal stem cells. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal**, v. 47, n. 8, p. 521–525, 2011.

MCGRATH, J.; SOLTER, D. Completion of mouse embryogenesis requires both the maternal and paternal genomes. **Cell**, v. 37, n. 1, p. 179–183, 1984.

MEDRANO, J. V.; RAMATHAL, C.; NGUYEN, H. N.; SIMON, C.; REIJO PERA, R. A. Divergent RNA-binding Proteins, DAZL and VASA, Induce Meiotic Progression in Human Germ Cells Derived in Vitro. **Stem Cells**, v. 30, n. 3, p. 441–451, 2012.

MIKICH, A. B.; BÉRNILS, R. S. **Livro vermelho da fauna ameacada no estado do parana**. [s.l.] Instituto ambiental do Paraná, 2004.

MMA. **Lista nacional de espécies da fauna brasileira ameaçada de extinção**. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, 2003.

MO, X.; LI, N.; WU, S. Generation and characterization of bat-induced pluripotent stem cells. **Theriogenology**, v. 82, n. 2, p. 283–293, 2014.

MONFORT, S. L.; ASHER, G. W.; WILDT, D. E.; WOOD, T. C.; SCHIEWE, M. C.; WILLIAMSON, L. R.; BUSH, M.; RALL, W. F. Successful intrauterine insemination of Eld's deer (*Cervus eldi thamin*) with frozen-thawed spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 99, n. 2, p. 459–465, 1993.

MUÑOZ, M.; RODRÍGUEZ, A.; DE FRUTOS, C.; CAAMAÑO, J. N.; DÍEZ, C.; FACAL, N.; GÓMEZ, E. Conventional pluripotency markers are unspecific for bovine embryonic-derived cell-lines. **Theriogenology**, v. 69, n. 9, p. 1159–1164, 2008.

NAGY, K.; SUNG, H.-K.; ZHANG, P.; LAFLAMME, S.; VINCENT, P.; AGHAMOHAMMADI, S.; WOLTJEN, K.; MONETTI, C.; MICHAEL, I. P.; SMITH, L. C.; NAGY, A. Induced Pluripotent Stem Cell Lines Derived from Equine Fibroblasts. **Stem Cell Reviews and Reports**, v. 7, n. 3, p. 693–702, 2011.

NAYERNIA, K.; LEE, J. H.; DRUSENHEIMER, N.; NOLTE, J.; WULF, G.; DRESSEL, R.; GROMOLL, J.; ENGEL, W. Derivation of male germ cells from bone marrow stem cells. **Laboratory Investigation**, v. 86, n. 7, p. 654–663, 2006.

NICHOLAS, C. R.; CHAVEZ, S. L.; BAKER, V. L.; REIJO PERA, R. A. Instructing an Embryonic Stem Cell-Derived Oocyte Fate: Lessons from Endogenous Oogenesis. **Endocrine Reviews**, v. 30, n. 3, p. 264–283, 2009.

NUNES, A. L. V.; PINHO, M. P.; CRUZ, M. L.; DUARTE, J. M. B. Contenção química do cervo-do-pantanal (*Blastocerus dichotomus*) em vida livre: comparação entre diversas associações das drogas. In: JoséMaurício Barbanti Duarte. (Org.). O cervo-do-pantanal de Porto Primavera: resultado de dois anos de pesquisa. 1 ed. Jabo. In: **O cervo-do-pantanal de Porto Primavera: resultado de dois anos de pesquisa**. Jaboticabal: Funep, 2001. p. CD-ROM, 2001.

OHNISHI, K.; SEMI, K.; YAMAMOTO, T.; SHIMIZU, M.; TANAKA, A.; MITSUNAGA, K.; OKITA, K.; OSAFUNE, K.; ARIOKA, Y.; MAEDA, T.; SOEJIMA, H.; MORIWAKI, H.; YAMANAKA, S.; WOLTJEN, K.; YAMADA, Y. Premature Termination of

Reprogramming In Vivo Leads to Cancer Development through Altered Epigenetic Regulation. **Cell**, v. 156, n. 4, p. 663–677, 2014.

PANULA, S.; MEDRANO, J. V.; KEE, K.; BERGSTROM, R.; NGUYEN, H. N.; BYERS, B.; WILSON, K. D.; WU, J. C.; SIMON, C.; HOVATTA, O.; REIJO PERA, R. A. Human germ cell differentiation from fetal- and adult-derived induced pluripotent stem cells. **Human Molecular Genetics**, v. 20, n. 4, p. 752–762, 2011.

PEREIRA, R. Male reproduction. In: DUARTE, J. M. B.; GONZÁLEZ, S. (Ed.). **Neotropical cervidology: Biology and medicine of Latin American deer**. Switzerland: Funep and Gland: IUCN, 2010. p. 39–50, 2010.

PINDER, L. Marsh deer *Blastocerus dichotomus* population estimate in the Paraná River, Brazil. **Biological Conservation**, v. 75, n. 1, p. 87–91, 1996.

PINDER, L.; SEAL, U. **Cervo-do-pantanal blastocerus dichotomus análise da viabilidade de população e hábitat (phva)**. [s.l.] IUCN/SSC Conservation Breeding Specialist Group, 1994.

POLEGATO, B. F. **Determinação dos perfis de estrógenos e progestinas fecais durante o ciclo estral, gestação e período pós-parto em cervos-do-pantanal (blastocerus dichotomus) em cativeiro**. 2008. 2008. 74 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2008.

POLO, J. M.; ANDERSSSEN, E.; WALSH, R. M.; SCHWARZ, B. A.; NEFZGER, C. M.; LIM, S. M.; BORKENT, M.; APOSTOLOU, E.; ALAEI, S.; CLOUTIER, J.; BAR-NUR, O.; CHELOUFI, S.; STADTFELD, M.; FIGUEROA, M. E.; ROBINSON, D.; NATESAN, S.; MELNICK, A.; ZHU, J.; RAMASWAMY, S.; HOCHEDLINGER, K. A Molecular Roadmap of Reprogramming Somatic Cells into iPS Cells. **Cell**, v. 151, n. 7, p. 1617–1632, 2012.

QIU, P.; BAI, Y.; PAN, S.; LI, W.; LIU, W.; HUA, J. Gender depended potentiality of differentiation of human umbilical cord mesenchymal stem cells into oocyte-Like cells in vitro. **Cell Biochemistry and Function**, v. 31, n. 5, p. 365–373, 2013.

RAIS, Y.; ZVIRAN, A.; GEULA, S.; GAFNI, O.; CHOMSKY, E.; VIUKOV, S.; MANSOUR, A. A.; CASPI, I.; KRUPALNIK, V.; ZERBIB, M.; MAZA, I.; MOR, N.;

BARAN, D.; WEINBERGER, L.; JAITIN, D. A.; LARA-ASTIASO, D.; BLECHER-GONEN, R.; SHIPONY, Z.; MUKAMEL, Z.; HAGAI, T.; GILAD, S.; AMANN-ZALCENSTEIN, D.; TANAY, A.; AMIT, I.; NOVERSHTERN, N.; HANNA, J. H. Deterministic direct reprogramming of somatic cells to pluripotency. **Nature**, v. 502, n. 7469, p. 65–70, 2013.

REIK, W.; WALTER, J. Genomic imprinting: parental influence on the genome. **Nature Reviews Genetics**, v. 2, n. 1, p. 21–32, 2001.

ROLA, L. D. **Estimulação ovariana, recuperação e maturação de oócitos de veado-catingueiro**. 2013. 2013. 57 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2013.

ROLF, H. J.; KIERDORF, U.; KIERDORF, H.; SCHULZ, J.; SEYMOUR, N.; SCHLIEPHAKE, H.; NAPP, J.; NIEBERT, S.; WÖLFEL, H.; WIESE, K. G. Localization and Characterization of STRO-1+ Cells in the Deer Pedicle and Regenerating Antler. **PLoS ONE**, v. 3, n. 4, p. e2064, 2008.

ROSSELLÓ, R. A.; CHEN, C.-C.; DAI, R.; HOWARD, J. T.; HOCHGESCHWENDER, U.; JARVIS, E. D. Mammalian genes induce partially reprogrammed pluripotent stem cells in non-mammalian vertebrate and invertebrate species. **eLife**, v. 2, 2013.

SAGA, Y. Mouse germ cell development during embryogenesis. **Current Opinion in Genetics & Development**, v. 18, n. 4, p. 337–341, 2008.

SAITO, S.; STRELCHENKO, N.; NIEMANN, H. Bovine embryonic stem cell-like cell lines cultured over several passages. **Roux's Archives of Developmental Biology**, v. 201, n. 3, p. 134–141, 1992.

SAITOU, M.; KAGIWADA, S.; KURIMOTO, K. Epigenetic reprogramming in mouse pre-implantation development and primordial germ cells. **Development**, v. 139, n. 1, p. 15–31, 2012.

SAMAVARCHI-TEHRANI, P.; GOLIPOUR, A.; DAVID, L.; SUNG, H.; BEYER, T. A.; DATTI, A.; WOLTJEN, K.; NAGY, A.; WRANA, J. L. Functional Genomics Reveals a BMP-Driven Mesenchymal-to-Epithelial Transition in the Initiation of Somatic Cell Reprogramming. **Cell Stem Cell**, v. 7, n. 1, p. 64–77, 2010.

SASAKI, K.; YOKOBAYASHI, S.; NAKAMURA, T.; OKAMOTO, I.; YABUTA, Y.; KURIMOTO, K.; OHTA, H.; MORITOKI, Y.; IWATANI, C.; TSUCHIYA, H.; NAKAMURA, S.; SEKIGUCHI, K.; SAKUMA, T.; YAMAMOTO, T.; MORI, T.; WOLTJEN, K.; NAKAGAWA, M.; YAMAMOTO, T.; TAKAHASHI, K.; YAMANAKA, S.; SAITOU, M. Robust In Vitro Induction of Human Germ Cell Fate from Pluripotent Stem Cells. **Stem Cell**, v. 17, n. 2, p. 178–194, 2015.

SHIMADA, H.; NAKADA, A.; HASHIMOTO, Y.; SHIGENO, K.; SHIONOYA, Y.; NAKAMURA, T. Generation of canine induced pluripotent stem cells by retroviral transduction and chemical inhibitors. **Molecular Reproduction and Development**, v. 77, n. 1, p. 2, 2009.

SHIRAZI, R.; ZARNANI, A. H.; SOLEIMANI, M.; ABDOLVAHABI, M. A.; NAYERNIA, K.; RAGERDI KASHANI, I. BMP4 can generate primordial germ cells from bone-marrow-derived pluripotent stem cells. **Cell Biology International**, v. 36, n. 12, p. 1185–1193, 2012.

SIRIAROONRAT, B.; COMIZZOLI, P.; SONGSASEN, N.; MONFORT, S. L.; WILDT, D. E.; PUKAZHENTHI, B. S. Oocyte quality and estradiol supplementation affect in vitro maturation success in the white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*). **Theriogenology**, v. 73, n. 1, p. 112–119, 2010.

SIRIAROONTAT, B. **Development of in vitro fertilization for the endangered eld's deer (cervus eldithamin): effects of in vitro maturation, fertilization and culture on developmental competence**. 2006. 2006, George Mason University, 2006.

SONG, S.-H.; KUMAR, B. M.; KANG, E.-J.; LEE, Y.-M.; KIM, T.-H.; OCK, S.-A.; LEE, S.-L.; JEON, B.-G.; RHO, G.-J. Characterization of Porcine Multipotent Stem/Stromal Cells Derived from Skin, Adipose, and Ovarian Tissues and Their Differentiation In Vitro into Putative Oocyte-Like Cells. **Stem Cells and Development**, v. 20, n. 8, p. 1359–1370, 2011.

SUMER, H.; LIU, J.; MALAVER-ORTEGA, L. F.; LIM, M. L.; KHODADADI, K.; VERMA, P. J. NANOG is a key factor for induction of pluripotency in bovine adult fibroblasts. **Journal of Animal Science**, v. 89, n. 9, p. 2708–2716, 2011.

TAI, D.; LIU, P.; GAO, J.; JIN, M.; XU, T.; ZUO, Y.; LIANG, H.; LIU, D. Generation of

Arbas Cashmere Goat Induced Pluripotent Stem Cells Through Fibroblast Reprogramming. **Cellular Reprogramming**, v. 17, n. 4, p. 297–305, 2015.

TAKAHASHI, K.; YAMANAKA, S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. **Cell**, v. 126, n. 4, p. 663–676, 2006.

TALBOT, N. C.; BLOMBERG, L. A. The Pursuit of ES Cell Lines of Domesticated Ungulates. **Stem Cell Reviews**, v. 4, n. 3, p. 235–254, 2008.

TAT, P. A.; SUMER, H.; JONES, K. L.; UPTON, K.; VERMA, P. J. The Efficient Generation of Induced Pluripotent Stem (iPS) Cells From Adult Mouse Adipose Tissue-Derived and Neural Stem Cells. **Cell Transplantation**, v. 19, n. 5, p. 525–536, 2010.

TIEPOLO, L. M.; TOMAS, W. M.; LIMA-BORGES, P. A. Levantamento populacional do cervo-do-pantanal *Blastocerus dichotomus* (Mammalia, Cervidae) no Parque Nacional de Ilha Grande e entorno: implicações para a conservação. **Iheringia Série Zoológica**, v. 100, n. 2, p. 111–115, 2010.

VACKOVA, I.; UNGROVA, A.; LOPES, F. Putative Embryonic Stem Cell Lines from Pig Embryos. **Journal of Reproduction and Development**, v. 53, n. 6, p. 1137–1149, 2007.

VERMA, R.; HOLLAND, M. K.; TEMPLE-SMITH, P.; VERMA, P. J. Inducing pluripotency in somatic cells from the snow leopard (*Panthera uncia*), an endangered felid. **Theriogenology**, v. 77, n. 1, p. 220–228, 2012.

VERMA, R.; LIU, J.; HOLLAND, M. K.; TEMPLE-SMITH, P.; WILLIAMSON, M.; VERMA, P. J. Nanog Is an Essential Factor for Induction of Pluripotency in Somatic Cells from Endangered Felids. **BioResearch Open Access**, v. 2, n. 1, p. 72–76, 2013.

WEBER, M.; GONZALEZ, S. Latin American deer diversity and conservation: A review of status and distribution. **Écoscience**, v. 10, n. 4, p. 443–454, 2003.

WHITEHEAD, G. K. **The whitehead encyclopedia of deer**. [s.l.] Swan Hill Press; Voyageur Press, 2008.

WILDT, D. E. Strategies for the practical application of reproductive technologies to endangered species. **Zoo Biology**, v. 8, n. S1, p. 17–20, 1989.

YARAK, S.; OKAMOTO, O. K. Human adipose-derived stem cells: current challenges and clinical perspectives. **Anais brasileiros de dermatologia**, v. 85, n. 5, p. 647–656, 2010.

YOKOMIZO, V.; BENEMOND, T.; KADUNC, B. PO94-Tratamento de cinco casos de lipodistrofia por transplante de gordura autologa. **Anais brasileiros de dermatologia**, v. 80, n. 2, p. S148, 2005.

YU, X.; WANG, N.; QIANG, R.; WAN, Q.; QIN, M.; CHEN, S.; WANG, H. Human Amniotic Fluid Stem Cells Possess the Potential to Differentiate into Primordial Follicle Oocytes In Vitro. **Biology of Reproduction**, v. 90, n. 4, p. 1–11, 2014.

ZANETTI, E. S. **Protocolos de superovulação em veado-catingueiro (mazama gouazoubira)**. 2009. 87 f. Tese (Medicina Veterinária), – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2009.

ZANETTI, E. S.; DUARTE, J. M. B. **Livro de registro genealógico da população cativa de cervo-do-pantanal (blastocerus dichotomus)**. Jaboticabal: Funep, 2008.

ZANETTI, E. S.; DUARTE, J. M. B. Comparison of three protocols for superovulation of brown brocket deer (*Mazama gouazoubira*). **Zoo Biology**, v. 31, n. 6, p. 642–655, 2012.

ZANETTI, E. S.; MUNERATO, M. S.; CURSINO, M. S.; DUARTE, J. M. B. Comparing two different superovulation protocols on ovarian activity and fecal glucocorticoid levels in the brown brocket deer (*Mazama gouazoubira*). **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 12, n. 1, p. 24, 2014.

ZHOU, Q.; WANG, M.; YUAN, Y.; WANG, X.; FU, R.; WAN, H.; XIE, M.; LIU, M.; GUO, X.; ZHENG, Y.; FENG, G.; SHI, Q.; ZHAO, X.-Y.; SHA, J.; ZHOU, Q. Complete Meiosis from Embryonic Stem Cell-Derived Germ Cells In Vitro. **Cell Stem Cell**, v. 18, n. 3, p. 330–340, 2016.

CAPÍTULO 2 - Isolamento, expansão e caracterização de três tipos de células-tronco multipotentes de cervo-do-pantanal (*Blastocerus dichotomus*)

RESUMO – O cervo-do-pantanal é uma espécie que corre risco de extinção e uma das principais ferramentas para a manutenção das populações selvagens ameaçadas é a criação de bancos genômicos representativos da população remanescente. Nesse sentido, as células-tronco multipotentes oferecem uma grande possibilidade de obtenção de germoplasma destes indivíduos, uma vez que são de fácil acesso e possuem características desejáveis. Esse trabalho propôs a utilização de três tipos de células-tronco multipotentes, proveniente de chifres, gordura e pele. Estas células foram avaliadas com relação ao seu potencial de diferenciação, tempo de duplicação celular, expressão de marcadores de pluripotência via RT-qPCR (OCT4, SOX2, Nanog, Rex1, Lin28) bem como por imunocitoquímica (OCT4, SOX2, Nanog, Rex1). As três linhagens de células mostraram ter potencial de diferenciação para adipócitos, osteócitos e condrócitos, possuem rápido tempo de duplicação celular, e apresentam expressão de marcadores de pluripotência, demonstrando ter características interessantes para seu uso em biotécnicas reprodutivas.

Palavras-chave: Chifres, cervídeo, germoplasma, gordura, pele.

CHAPTER 2 - Isolation, expansion and characterization of multipotent stem cells from different tissues in marsh deer (*Blastocerus dichotomus*)

ABSTRACT - The marsh deer is a species that is in danger of extinction and a major tool for the maintenance of threatened wild populations is the creation of representative genomic banks of the remaining population. In this sense, multipotent stem cells offer a great opportunity to obtain germplasm of these individuals, once they are easily accessible and have desirable characteristics. This study proposed obtaining and characterizing stem cells from three types of tissues: antlers, fat and skin. These cells were evaluated regarding their potential of differentiation, doubling time and expression of pluripotency markers by RT-qPCR (OCT4, SOX2, Nanog, Rex1, Lin28) and immunocytochemistry (OCT4, SOX2, Nanog, Rex1). These three cell lines show potential to differentiate into adipocytes, chondrocytes and osteocytes; have a high rate of proliferation; and express pluripotency markers, which are desirable characteristics for the application in reproductive biotechnologies.

Keywords: Antler, fat, Marsh deer, multipotent stem cells, skin.

CAPÍTULO 2 - Isolamento, expansão e caracterização de três tipos de células-tronco multipotentes de cervo-do-pantanal (*Blastocerus dichotomus*)

1. INTRODUÇÃO

O cervo-do-pantanal é uma espécie de cervídeo classificada pela lista vermelha da “International Union for Conservation of Nature” como vulnerável (VU) (DUARTE et al., 2008). Devido às dificuldades em se preservar os ambientes naturais dessas populações, uma das principais estratégias para sua conservação inclui a manutenção da variabilidade genética da população por meio da criação de bancos de reserva genômica associada às biotécnicas de reprodução assistida. Entretanto, devido à dificuldade em se obter gametas e embriões de espécies selvagens, a utilização das células-tronco adultas multipotentes, como as células mesenquimais (MSC) se mostra interessante.

As MSC são células-tronco que podem ser obtidas a partir de tecidos adultos, podendo ser adquiridos de forma simples e pouco invasiva, e possuem características interessantes como alta taxa de proliferação e potencial para se diferenciar em vários tipos de tecidos (YEW et al., 2011). Estas células respondem a sinais morfogênicos e tem capacidade de se diferenciarem em tipos celulares que vão desde aqueles de sua própria linhagem celular (como os adipócitos, condrócitos e osteoblastos) até a diferenciação em células correspondentes à linhagem endotelial, neural e hepática (PITTINGER et al., 1999; ZVAIFLER et al., 2000; ZUK et al., 2002; ORCIANI et al., 2011), o que em teoria, seria propriedade restrita as células-tronco embrionárias (ESC).

As MSC podem ser consideradas boas candidatas para a produção de células de pluripotência induzida (iPSC), pois a eficiência de reprogramação das iPSC varia conforme os diferentes tipos celulares utilizados, sendo mais baixa em células terminalmente diferenciadas e mais rápida e eficiente em células adultas menos diferenciadas ou indiferenciadas (LEE et al., 2009). A produção de iPSC seria especialmente interessante pensando no potencial de diferenciação destas células em gametas. Por meio da diferenciação de células pluripotentes (ESC e iPSC) de

camundongo, Hayashi et al. (2011) e Hayashi et al. (2012) induziram a formação de oócitos e células espermáticas funcionais, que possibilitaram gerar filhotes saudáveis que cresceram até a vida adulta. Em humanos, também foi possível a obtenção de células semelhantes às espermáticas a partir de iPSC (EASLEY et al., 2012).

Ainda, outros trabalhos tem explorado a capacidade das células multipotentes em se diferenciarem diretamente em células germinativas (NAYERNIA et al., 2006; HUA et al., 2009a, 2009b, 2011; MAKOOLATI; MOVAHEDIN; FOROUZANDEH-MOGHADAM, 2011; MAZAHERI et al., 2011; JOUNI et al., 2014; LI et al., 2014), semelhantes a oócitos (DANNER et al., 2006; SONG et al., 2011; QIU et al., 2013; YU et al., 2014), ou no transplante de células MSC para restaurar a produção de gametas e espermatozoides em animais estéreis (JOHNSON et al., 2005; WANG et al., 2013).

Por último, as MSC também podem se mostrar interessantes para melhorar as taxas da clonagem por transferência nuclear (SCNT), pois pesquisadores sugerem que a eficiência desta técnica é inversamente proporcional ao status de diferenciação da célula doadora (LIU, 2001; HOCHEDLINGER; JAENISCH, 2002; OBACK; WELLS, 2002). O uso de MSC como células doadoras mostrou efeito benéfico para a eficiência da SCTN quando comparado ao uso de outros tipos de células somáticas (Faast et al., 2006) e ainda possibilitaram aumento nas taxas de desenvolvimento embrionário (COLLEONI et al., 2005; LEE et al., 2010).

A facilidade em se obter e congelar células multipotentes em comparação aos gametas e embriões em conjunto com as possibilidades de utilizá-las nas técnicas reprodutivas torna essa fonte de material biológico muito promissora para animais selvagens. Entretanto, é de extrema importância a padronização relacionada a obtenção, isolamento, cultivo *in vitro*, bem como caracterização destas células a fim de utilizá-las. Este trabalho propõe realizar essas etapas a partir de células obtidas de gordura, chifre e pele da espécie *B. dichotomus* para avaliação da potencial utilização dessa fonte de material na conservação desta espécie ameaçada.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Obtenção das biópsias

As biópsias foram obtidas de animais pertencentes ao Centro de Conservação do Cervo-do-Pantanal (CCCP) de Promissão – SP, Brasil e Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos (NUPECCE) do Departamento de Zootecnia da FCAV - UNESP, Jaboticabal – SP, Brasil. Para a obtenção das amostras, os animais foram anestesiados pela via intramuscular com a associação de 7,0 mg/Kg de cloridrato de quetamina (Vetaset® - Fort Dodge - Brasil), 1 mg/Kg de cloridrato de xilazina (Rompum® - Bayer - Brasil) aplicados por dardos disparados por arma anestésica.

As biópsias do chifre foram obtidas de três machos que apresentaram troca de chifres durante o período experimental, sendo as amostras colhidas de 45-60 dias após o início de seu crescimento. Foi realizada a dissecação de tecido, utilizando bisturi, pinça e punch estéreis. Biópsias do tecido adiposo foram obtidas de três fêmeas a partir da região retroauricular, abaixo da cartilagem, utilizando-se bisturi, pinças e tesoura estéreis. Para a obtenção da pele, foram utilizadas duas fêmeas e um macho, e o tecido foi dissecado da região proximal do membro pélvico (previamente tricotomizada e desinfetada com álcool 70%), com tesoura e pinça estéreis (Figura 1).

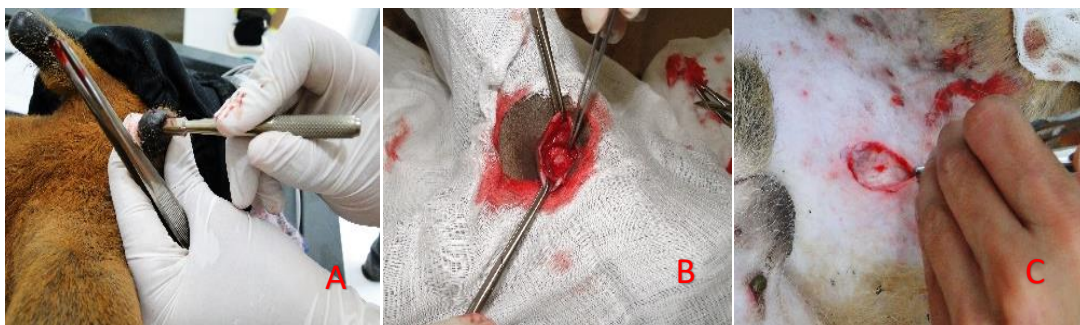


Figura 1 – Biópsias para obtenção dos tecidos de *B. dichotomus*. (A) Colheita de tecido do chifre utilizando punch e bisturi. (B) Obtenção de gordura da região retroauricular, abaixo da cartilagem. (C) Colheita de pele da região proximal do membro pélvico.

2.2. Isolamento das células-tronco multipotentes

Após a realização das biópsias, o material foi armazenado em criotubo contendo solução McCoy's (Sigma, M4892) e mantido sob refrigeração em isopor. Ao chegar no laboratório, os tecidos foram lavados quatro vezes em PBS, e foi realizado o isolamento das células pela desagregação mecânica do tecido em pedaços de cerca de 2 mm utilizando lamina de bisturi, seguido de digestão enzimática com colagenase I (200 U/ml – Sigma) a 37°C em estufa de CO₂ por um período de 3 horas para a pele e chifre e de 30 minutos para gordura. Após a digestão enzimática as células foram centrifugadas por 5 min a 200 G, foi retirado todo o sobrenadante e adicionado 10 mL de meio de cultivo completo (Dulbecco's modified Eagle's minimal essential medium - DMEM) com altas taxas de glicose (4,5 g/l), glutamina (0,6 g/l), 1% de aminoácidos essenciais, soro fetal bovino (SFB) na proporção de 10% v/v, 50 mg L⁻¹ de Sulfato de Gentamicina e 2 mg L⁻¹ de Anfotericina B). A amostra foi novamente centrifugada por 5 min a 200 G, e o sobrenadante foi descartado. O pellet foi ressuspensão em 5 mL de meio de cultivo completo contendo 50% de SFB.

2.3. Cultivo e criopreservação de células-tronco multipotentes

As amostras foram acondicionadas em garrafas de cultivo (25 cm² de área de superfície) e mantidas em estufa à 5% de CO₂ a 37°C. A troca de meio foi realizada 48 horas após o plaqueamento inicial para a remoção de células não aderentes ao frasco e para a manutenção do cultivo, o meio foi trocado duas vezes por semana utilizando o meio de cultivo completo com 10% de SFB. As garrafas de cultivo foram subcultivadas até alcançarem cerca de 80% de confluência, e as células foram então destacadas utilizando 0,25% tripsina/EDTA. A cada passagem foi realizada a contagem e avaliação das células com Azul de Tripán (diluição de 1:1) em câmara de Neubauer para avaliar a viabilidade celular, semeando as garrafas com 3x10⁶ células viáveis por garrafa (25 cm²).

As células (segunda ou terceira passagem) foram criopreservadas em meio composto de 80% de SFB, 10% de dimetilsulfóxido (DMSO), 10% de DMEM, 100 unidades/ml de penicilina e 100 µg/ml estreptomicina, e criopreservadas pelo método de resfriamento lento (4 horas a 4°C; 30 minutos em vapor de nitrogênio e

posteriormente imersas em nitrogênio líquido) sendo armazenadas em botijões criogênicos. No momento de realizar as análises, as células foram descongeladas em banho-maria a 37°C e cultivadas, sendo utilizadas células de quarta e quinta passagem.

2.4. Capacidade de diferenciação

A fim de avaliar a plasticidade destas células, foi testada sua diferenciação em adipócitos, condrócitos e osteócitos. As células foram semeadas em placas de 96 poços (2×10^3 células por poço) em meio completo (DMEM e 10% de SFB) e esperou-se até que os poços chegassem próximos à confluência para colocar o meio de diferenciação. As análises foram feitas em triplicatas para cada amostra, adotando o seguinte protocolo para cada tipo de diferenciação:

-Diferenciação adipogênica: Foi utilizado meio composto por DMEM (Gibco™ #11960), 15% de soro de coelho, 10^{-6} M de dexametasona, 200 μ M de indometacina, 10 μ g/ml de insulina, 0,5 mM de 3-isobutil-1-metilxantina, piruvato (100X), antibiótico/antifúngico (100X), realizando as trocas do meio de dois em dois dias por 12 dias. Após este período, a diferenciação adipogênica foi avaliada pela coloração Oil red O. Para tanto, as células foram lavadas em DPBS, fixadas em paraformaldeído 4% por 20 minutos, lavadas duas vezes com água Mili Q e colocadas em isopropanol 60% por 2 minutos. Finalmente, as células foram coradas com Oil Red O 5% por 30 minutos e lavadas quatro vezes com água Mili Q para que fossem analisadas em microscópio de luz.

-Diferenciação condrogênica: Foi utilizado o meio StemPro® Chondrogenesis Differentiation Kit (Gibco™ #A10071-01) realizando as trocas de meio de dois em dois dias por 16 dias. Após este período, a diferenciação condrogênica foi avaliada pela coloração Toluidine blue. Para tanto, as células foram lavadas em DPBS, expostas ao tampão fosfato 20 mM (pH 4.0) por um minuto, incubadas por 4 minutos em corante Toluidine blue 0,01%, lavadas três vezes com tampão fosfato e analisadas em microscópio de luz.

-Diferenciação osteogênica: Foi utilizado o meio StemPro® Osteogenesis Differentiation Kit (Gibco™ #A10072-01) realizando as trocas de meio de quatro em quatro dias por 23 dias. Após este período, a diferenciação osteogênica foi avaliada

pela coloração Alizarin Red S. Para tanto, as células foram lavadas com DPBS, fixadas por 30 minutos em paraformaldeído 4%, lavadas duas vezes com água destilada e coradas com a solução de Alizarin Red S 2% (pH 4.2) por 3 minutos, sendo lavadas outras três vezes em água destilada antes de serem analisadas em microscópio de luz.

2.5. Tempo de duplicação da população celular

As células foram plaqueadas em triplicatas para cada um dos tempos das nove amostras numa concentração inicial de 2×10^4 células viáveis por placa (30mm). A partir de 48 horas após o plaqueamento foi mensurada a quantidade de células por três vezes para cada amostra no aparelho Countess™ Automated Cell Counter (Invitrogen) considerando apenas os valores de células viáveis, sendo as contagens realizadas em intervalos de 24 horas até atingir 144 horas. Foi utilizado o método dos quadrados mínimos para ajuste da curva exponencial de crescimento celular. Este ajuste pode ser descrito pelo modelo:

$$y = \alpha e^{bx}$$

em que y são as observações (número de células), α é o intercepto e b é o coeficiente de regressão para as x horas avaliadas. O tempo de duplicação da população celular foi calculado por $\ln(2)/b$. O coeficiente de determinação (R^2) foi obtido para avaliar a adequação do ajuste do modelo em relação aos valores observados.

2.6. RT-qPCR para genes marcadores de pluripotência

Essa análise foi conduzida para verificar a presença e quantificar os transcritos de genes relacionados à pluripotência. O RNA foi extraído utilizando o kit RNeasy Mini Kit (Qiagen) de acordo com os protocolos do fabricante e tratado com DNase I (Qiagen). O cDNA foi produzido utilizando o kit Quanti Tect Reverse Transcription Kit (Qiagen) e um RT negativo, que consiste em uma amostra sem a presença de transcriptase reversa, sendo utilizado como controle negativo. Foram avaliados os marcadores OCT4, Nanog, REX1, LIN28 e SOX2. Os primers utilizados para este trabalho foram desenhados especificamente para cervo-do-pantanal. Para isso, sequências de outras espécies disponíveis no NCBI dos genes de interesse foram

alinhas e, por homologia entre espécies, primers foram elaborados e testados em amostras de DNA de cervo-do-pantanal por PCR. O produto obtido foi corrido em gel de agarose 1% e as bandas do gel foram individualizadas, digeridas e purificadas, sendo então sequenciadas. Os produtos de sequenciamento foram inseridos no Blast (NCBI) para confirmação de que se tratavam do gene de interesse. Uma vez determinada a sequência do gene de interesse, elas foram clonadas, sequenciadas e alinhadas. A partir das sequências obtidas foram construídos os primers específicos para nossa espécie com auxílio do programa Oligo6 (Tabela 1).

Os genes GAPDH, RPL13 e HPRT foram testados no programa BestKeeper para nos assegurar sua eficiência como genes “*housekeeping*”. O momento em que a aquisição do sinal de fluorescência foi realizada pelo termociclador dependeu da temperatura do início da amplificação do produto de interesse, visando eliminar a chance de captar fluorescência de possíveis produtos anteriormente amplificados (dímeros).

Tabela 1 - Primers utilizados para análise de RT-qPCR.

Gene	Sequência dos Primers	Aquisição (C°)
GAPDH	Forward: GGCACAGTCAAGGCCGAGAG Reverse: GGTGGTGCAGGAGGCATTG	80
RPL13	Forward: GGGCTTCAGCCTGGAGGAGC Reverse: CTTGGAGCGGTATTCCTTGAGC	80
HPRT	Forward: CCAGTCAACAGGCGAGATAAA Reverse: CTTCGAGGGGTCCTTTTCACC	78
OCT4	Forward: GTCCGAGTGTGGTTCTGCAAC Reverse: GGCGCCAGAGGAGAGGATACG	82
SOX2	Forward: ATGGGCTCGGTGGTCAAGTC Reverse: CCGCTCTGGTAGTGCTGGGA	85
Nanog	Forward: AAGCTTGGAACAGCCAGCTC Reverse: AGGGA CTCAAATCGCTGAC	82
REX1	Forward: ATGGACCAGCAACTGAAGAAA Reverse: GGAAGCGAGTCTCATAGCACA	82
LIN28	Forward: TAAGCTGCACATGGAGGGCT Reverse: GTCTCCCTTTGATCTGCGCT	81

2.7. Imunocitoquímica (ICC)

Para confirmar a expressão de alguns genes de pluripotência a ICC foi realizada. Foi feito o cultivo das células sobre lamínulas de vidro. Estas células foram

fixadas em paraformaldeído 4% por 15 minutos, sendo posteriormente lavadas três vezes em DPBS, permeabilizadas com Triton X 0,1% por 10 minutos e lavadas outras três vezes em DPBS. Em seguida, foram bloqueadas por uma hora em DPBS contendo 5% de soro caprino. As lâminas foram incubadas overnight sob refrigeração (4°C) nos anticorpos primários para os marcadores de pluripotência: NANOG (1:150 - ab80892), OCT4 (1:200 – ab19857), SOX2 (1:1000 - ab97959), REX1 (1:100 - Millipore #MAB4316). Os controles negativos não foram expostos aos anticorpos primários e foram mantidos em DPBS com 5% de soro caprino. No dia seguinte as lâminas foram lavadas três vezes em DPBS e incubadas por uma hora no anticorpo secundário (Cy3 1:100 - Stemgent #09-0036), sendo posteriormente coradas com DAPI (Life Technologies) para possibilitar a visualização do núcleo, sendo então analisadas em microscópio confocal.

2.8. Análise estatística

A análise de forma descritiva ou análise de variância para comparar os grupos, foram utilizadas quando apropriado. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o Microsoft Excel. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

3. RESULTADOS

3.1. Derivação das linhagens multipotentes

Para a viabilidade celular das amostras, mensurada utilizando o corante azul de tripan, foram encontrados valores de 95% de células viáveis de chifre, 97,5% para as amostras de pele e 98,4% para as amostras de gordura para células da primeira passagem até o momento da criopreservação. O meio utilizado para a criopreservação celular também se mostrou adequado, uma vez que após o descongelamento das amostras foi possível obter adesão celular a superfície plástica e crescimento de todos os tipos celulares. Após três horas de digestão enzimática em colagenase I, as células de chifre e pele aderiram normalmente à superfície plástica. No caso da pele, o tempo para o início da adesão foi de cerca de 3 dias e para o chifre foi de 2 dias.

Para a gordura, as três primeiras amostras coletadas também sofreram digestão enzimática por 3 horas e apenas uma delas mostrou adesão mais rápida, com cerca de 4 dias, sendo que as demais iniciaram seu crescimento somente com 10 dias de cultivo, e por isso, estas últimas foram descartadas. Para as outras duas amostras obtidas, optou-se por alterar o protocolo de digestão enzimática da gordura para 30 minutos, e assim, o início da adesão celular foi obtido com cerca de 6 dias. O meio utilizado neste trabalho (DMEM) se mostrou adequado ao cultivo dos três tipos celulares propostos. A morfologia dos três tipos celulares (chifre, pele e gordura) é fusiforme e muito semelhante entre si.

3.2. Capacidade de diferenciação

A diferenciação das células de chifre, gordura e pele em adipócitos (Figura 2), condrócitos (Figura 3) e osteócitos (Figura 4), pode ser verificada a seguir.

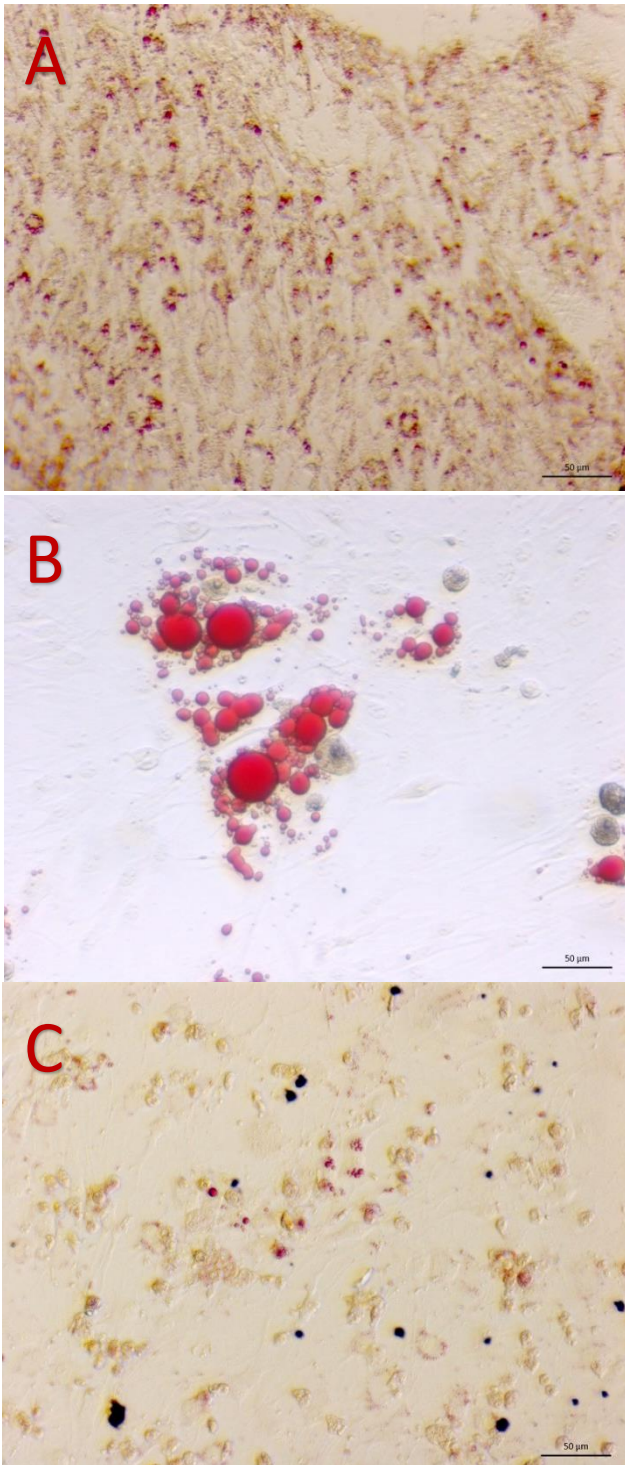


Figura 2 – Fotomicrografia da diferenciação das células de *B. dichotomus* em adipócitos a partir de células do chifre (A), gordura (B) e pele (C). Bar = 50 µM.

-*Diferenciação adipogênica:* A diferenciação adipogênica se mostrou possível nos três tipos de tecido. Entretanto, visualmente é possível constatar que entre os três tecidos avaliados, o tecido adiposo apresentou células com gotículas lipídicas maiores e, portanto, demonstrou ser mais responsivo a esse tipo de diferenciação. É importante comentar o fato de que estes tecidos falharam em se diferenciar em adipócitos quando foi utilizado o StemPro® Adipogenesis Differentiation Kit (Gibco™ #A10070-01).

-Diferenciação condrogênica: A diferenciação condrogênica se mostrou possível nos três tipos de tecido, sendo detectadas matrizes ricas em glucosaminoglicanos pelo azul de toluidina.

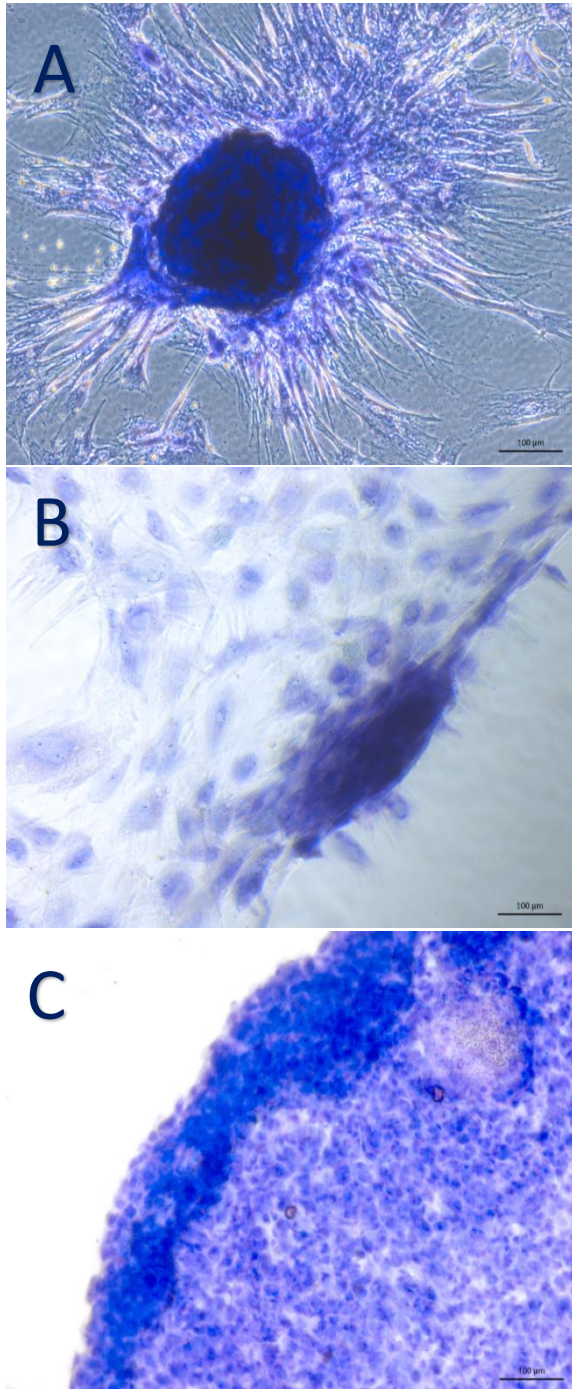


Figura 3 - Fotomicrografia da diferenciação das células de *B. dichotomus* em condrocitos a partir de células do chifre (A), gordura (B) e pele (C). Bar = 100 µM.

-Diferenciação osteogênica: A diferenciação osteogênica se mostrou possível nos três tipos de tecido, sendo detectada a deposição de cálcio na matriz extracelular utilizando o Alizarin Red S.

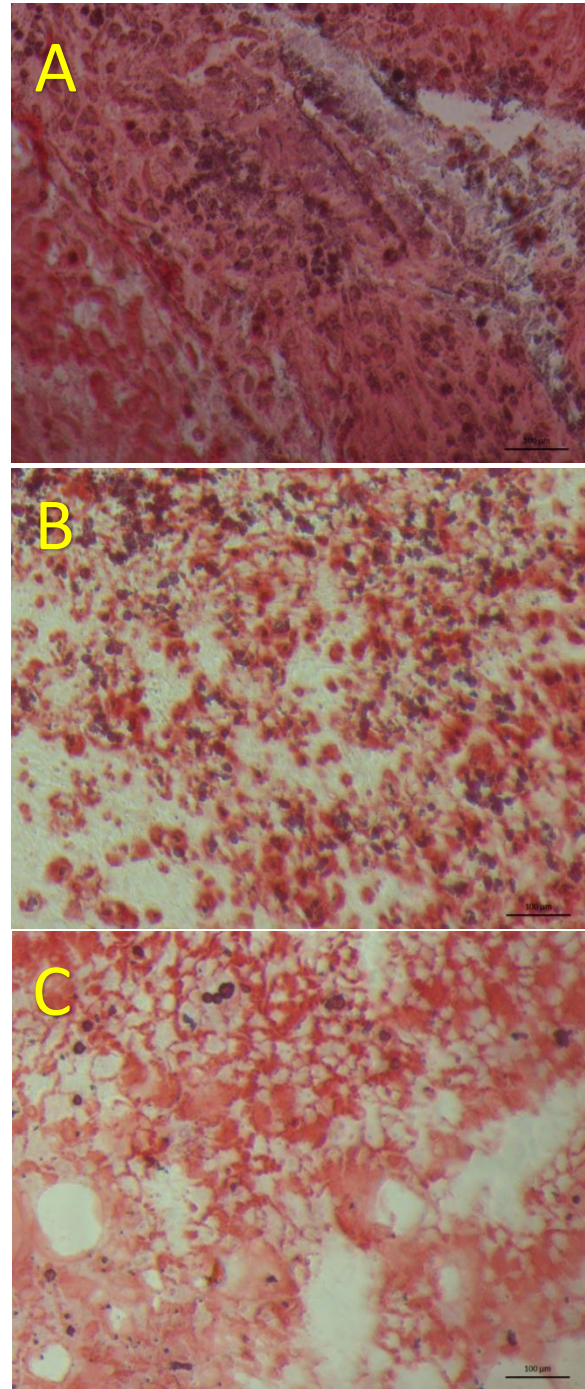


Figura 4 – Fotomicrografia da diferenciação das células de *B. dichotomus* em osteócitos a partir de células do chifre (A), gordura (B) e pele (C). Bar = 100 µM.

3.3. Tempo de duplicação da população celular

O tempo de duplicação celular foi de 25,96 horas para os chifres, 32,24 horas para a gordura e de 33,32 horas para a pele. A Figura 5 mostra os resultados da regressão exponencial.

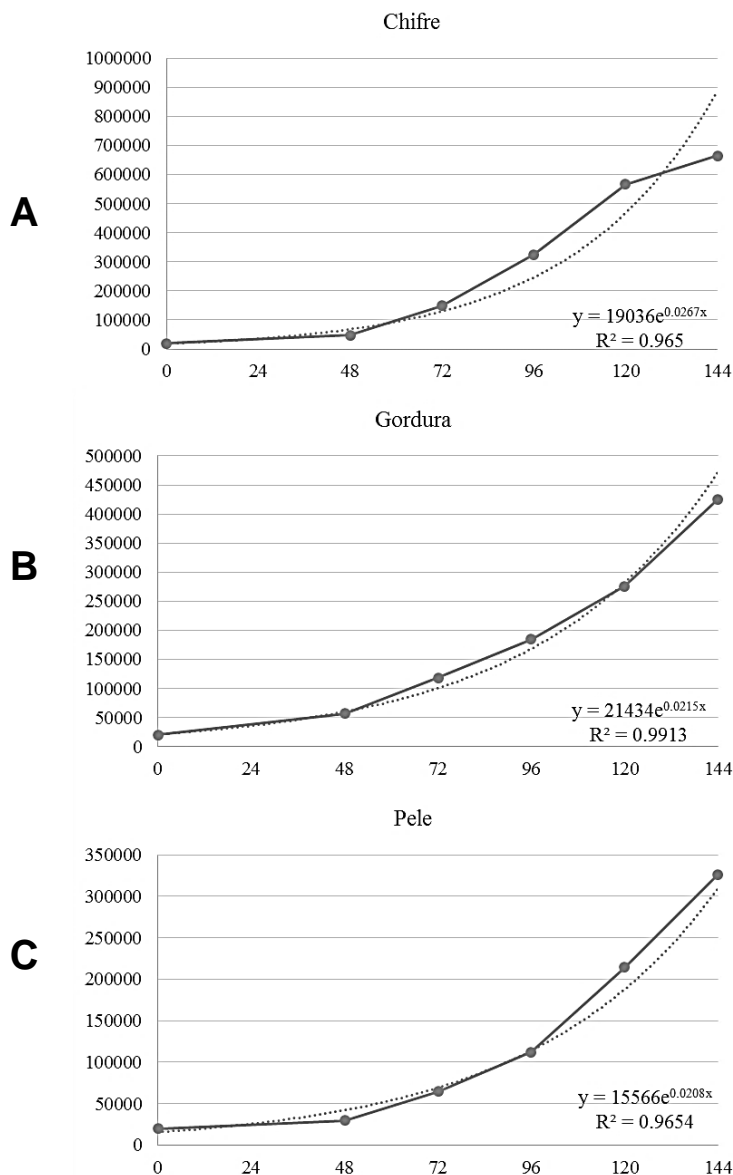


Figura 5 – Curva exponencial de duplicação celular de (A) chifre, (B) gordura e (C) pele de *B. dichotomus*.

3.4. RT-qPCR para genes marcadores de pluripotência

A Figura 7 mostra a expressão dos transcritos para cada um dos tipos celulares.

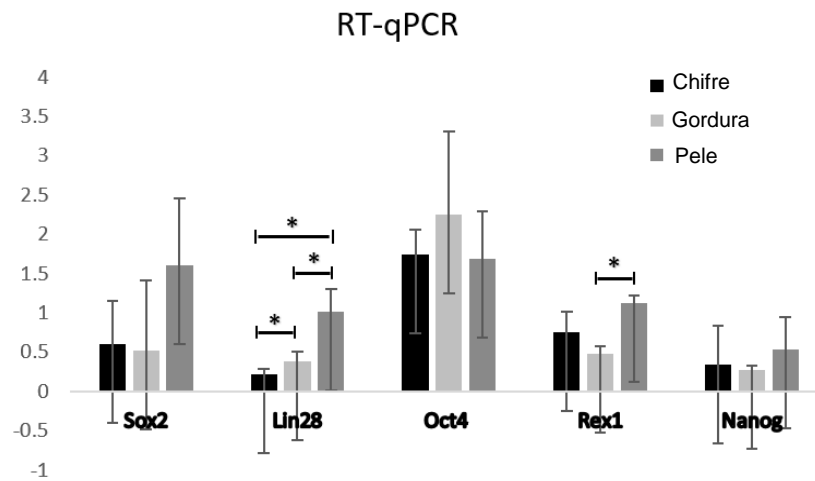


Figura 7 – Expressão relativa dos genes de pluripotência nas células de *B. dichotomus*. Linhas horizontais com asterisco correlacionam amostras que possuem diferença estatisticamente significativa entre si ($p < 0,05$).

3.5. Imunocitoquímica (ICC)

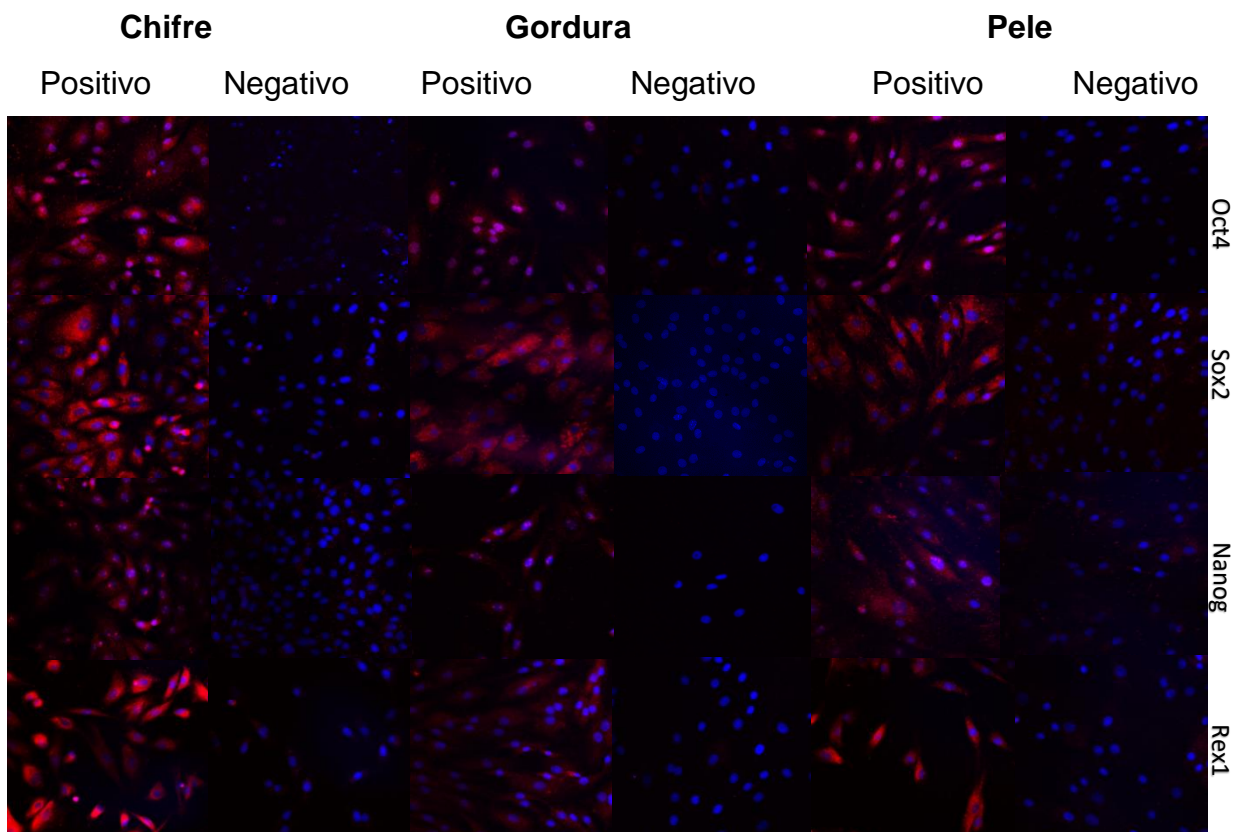


Figura 8 – Fotomicrografia da ICC realizadas em chifre, gordura e pele de *B. dichotomus* para os seguintes genes avaliados: Oct4, Sox2, Nanog e Rex1.

As análises de ICC confirmaram os resultados obtidos por RT-qPCR, demonstrando que as células exibem marcadores de pluripotência (Figura 8).

4. DISCUSSÃO

Para a escolha de células somáticas a serem utilizadas nas biotécnicas reprodutivas, algumas das considerações importantes são a facilidade de acesso ao tecido, derivar e manter as linhagens *in vitro*, e ainda, a habilidade destas células em se reprogramarem/diferenciarem (TAT et al., 2010). A obtenção dos três tipos de tecido mostrou-se possível. Muitos trabalhos relatam a facilidade em se obter gordura subcutânea a partir da região abdominal (LU et al., 2014), pescoço (MAMBELLI et al., 2009) ou região caudal (MAMBELLI et al., 2009; BRAVO et al., 2012) em outras espécies. Entretanto, no caso do cervo-do-pantanal, não foi possível obter gordura destas regiões, e após necropsias detalhadas em alguns animais, foi observado o acúmulo de gordura subcutânea na parte medial da coxa e na área retroauricular, abaixo da cartilagem. Optou-se neste estudo pela área retroauricular, uma vez que a área medial da coxa possui importantes vasos sanguíneos. Até onde se sabe, esse é o único trabalho que investigou a gordura obtida a partir dessa região, o que é uma questão importante, uma vez que a localização anatômica original do tecido adiposo pode influenciar tanto a taxa de proliferação quanto a capacidade de diferenciação das células (PEPTAN; HONG; MAO, 2006; LEVI et al., 2010).

Quanto à derivação das linhagens, o tempo de digestão na colagenase utilizado foi menor para a gordura em relação aos demais tecidos. Quando feito o uso de um tempo prolongado (3 horas), algumas amostras tiveram crescimento lento e com poucas células aderentes (dados não publicados). Outros trabalhos também utilizaram a digestão enzimática da gordura pelo período de 30-60 minutos (MAMBELLI et al., 2009; BRAVO et al., 2012; ARAÑA et al., 2013).

O DMEM foi o meio utilizado para o cultivo de fibroblastos de cervo-do-pantanal e tem sido utilizado em muitas outras espécies de cervídeos em nosso laboratório, mostrando-se adequado para o crescimento de outros tipos de tecido, como o chifre e a gordura. Foi demonstrado por Seo et al. (2014) que para o cultivo de chifre, o meio DMEM mostrou proliferação celular mais vigorosa em comparação aos demais meios testados (EMEM, D-Media e DMEM/F-12). Seo et al. (2014) também relatam

que embora os trabalhos com cultivo de células do chifre utilizem 10% de SFB, não houve diferença na curva de crescimento celular e na morfologia quando se utilizou 5% de SFB.

Células multipotentes em suas primeiras passagens, apresentam alta taxa de proliferação e grande potencial de diferenciação (YEW et al., 2011). As linhagens aqui estudadas mostraram bom crescimento e baixo tempo de duplicação celular, o que são fatores desejáveis. Em estudo realizado com células mesenquimais de equino, (PESSÔA, 2016) relatou que o tecido adiposo (retirado da cauda) tinha o tempo de duplicação mais rápido em comparação aos demais (18,2±4,5 horas), seguido pelos fibroblastos (27±2 horas) e por último a medula óssea (61,3±15 horas). Foi possível constatar que este fator afetava diretamente a reprogramação das células em iPSC, uma vez que as células com maior tempo de duplicação celular (medula óssea) se mostraram ineficientes na produção de colônias, e aquelas que apresentavam menor tempo de duplicação (tecido adiposo) foram muito melhores em se reprogramar.

Os três tipos celulares foram capazes de se diferenciar em adipócitos, condrócitos e osteócitos, demonstrando a plasticidade destes tecidos. Devido à memória epigenética existente nos diferentes tipos de tecido, algumas células podem ter maior potencial em se diferenciarem em certos tipos celulares em relação a outras. Isso foi claramente demonstrado pelas células de gordura que se diferenciaram em adipócitos maduros. Devido à essa facilidade em se diferenciarem em adipócitos maduros, foram realizados 12 dias para a diferenciação, tempo menor do que o indicado na maioria dos protocolos (de 14 a 21 dias). Isso pode ter prejudicado a visualização da diferenciação de chifres e pele, mas foi importante reduzir o tempo de exposição ao meio de diferenciação a fim de evitar que as células provenientes da gordura formassem gotas de lipídio muito grandes. Neste caso, haveria grandes chances das células se destacarem e flutuarem no meio, o que inviabilizaria a análise.

Por outro lado, a gordura demonstrou maior dificuldade em se diferenciar em condrócitos. Além da questão da memória epigenética que cada célula possui, o fato das células de gordura mostrarem maiores dificuldades em responder à diferenciação condrogênica pode estar relacionada ao meio celular utilizado para o plaqueamento. A grande maioria dos meios de cultivo celular possui em sua formulação o vermelho fenol, substância utilizada como indicador de pH. Em células mesenquimais de

humanos há relatos demonstrando que o vermelho fenol inibe a diferenciação condrogênica e afeta a osteogênica. A inibição da diferenciação condrogênica se dá pela diminuição da expressão de genes como o *sox9*, colágeno tipo 2, aggrecan, colágeno tipo 10, bem como pela diminuição de proteoglicanos (LYSDAHL et al., 2013).

Os genes associados à pluripotência são reconhecidamente expressos por células embrionárias. No entanto, estes genes também se encontram presentes nas células tronco-adultas (RIEKSTINA et al., 2009; BAER et al., 2010) e são relacionados com a manutenção da autorenovação celular e a supressão de genes associados à diferenciação, mantendo as células com alta plasticidade (BOYER et al., 2005; TSAI et al., 2012). Quando há queda na expressão destes genes, isso pode resultar na perda do potencial de diferenciação destas células (PARK; PATEL, 2010) e, assim, a avaliação destes genes pode nos auxiliar a encontrar um tipo celular que seja mais interessante em relação a outros devido sua possível flexibilidade em diferenciar-se em vários tipos celulares.

Todos os tipos celulares aqui estudados expressaram os genes de pluripotência explorados por RT-qPCR (*OCT4*, *Nanog*, *SOX2*, *LIN28* e *REX1*). Esses genes, com exceção do *LIN28*, foram também acessados pela ICC para confirmar a sua expressão. A expressão quantitativa dos transcritos demonstrou diferença significativa ($P < 0,05$) apenas para *LIN28* e *REX1*. Para *LIN28*, a expressão foi maior para a pele, seguida pela gordura e depois pelo chifre. Já para o *REX1* houve diferença estatística apenas entre a pele e a gordura, sendo mais expressa pela pele.

Apesar da expressão de genes relacionados à pluripotência ser detectada em uma variedade de tipos celulares em diversos estágios de diferenciação (LIEDTKE et al., 2007) para genes como *OCT4* e *Nanog* por exemplo, é importante ressaltar a possibilidade de que a detecção possa ser parcialmente ou totalmente advinda de transcritos de pseudogenes, que podem levar a artefatos na amplificação dos produtos de RT-qPCR. Para *OCT4* são conhecidos pelo menos 6 pseudogenes com homologia variando entre 76 e 97%, sendo que quatro deles transcrevem mRNA (BOOTH; HOLLAND, 2004; PAIN et al., 2005; SUO et al., 2005; CAUFFMAN et al., 2006; KALTZ et al., 2008) e ainda uma isoforma com 96% de homologia (PAIN et al., 2005; DE JONG; LOOIJENGA, 2006). Já para *Nanog* e seus dez pseudogenes, há

homologia de mais de 90% para sete deles, sendo que NanogP8 compartilha de 99,5% de homologia. Apesar de alguns autores ressaltarem a importância do design preciso de primers específicos para a obtenção de análises de PCR acuradas (LIEDTKE et al., 2007), essa é uma tarefa complexa para espécies selvagens, nas quais há desconhecimento do genoma completo dos animais.

Igualmente, a similaridade entre os produtos de RNA resulta em proteínas com diferenças mínimas na sequência de aminoácidos, fazendo com que anticorpos produzidos para ensaios de imunofluorescência não consigam distinguir entre o produto desejado e aquele produzido por pseudogenes (AMBADY et al., 2010).

Embora a presença desses pseudogenes seja incerta, argumentos que indiquem que eles estão ausentes, ou ainda o fato de que eles também possuem papel importante na manutenção da pluripotência, podem ser levantados. Apesar da alta similaridade que há entre Nanog e NanogP8, alguns estudos afirmam que a presença do Nanog verdadeiro está presente em células de rápida divisão celular (entre elas as MSC, fibroblastos neonatais e ESC) e já aquelas que tem divisão relativamente lenta (como fibroblastos adultos, células do coração, etc.) expressam tanto Nanog quanto NanogP8 (AMBADY et al., 2010). Quanto ao Oct4, um estudo em camundongos indicou que alguns desses pseudogenes podem mediar a função regulatória das células tronco (LIN et al., 2007) e que sua variante Oct4B é um marcador de pluripotência fortemente expresso em linhagens de células-tronco embrionárias, apresentando significativa correlação com a expressão de Nanog, e correlação negativa com genes que são expressos durante a diferenciação celular (PAPAMICHOS et al., 2009).

Apesar da tentativa em caracterizar as células como mesenquimais (MSC), a ausência de anticorpos específicos para a espécie em questão implica em grande dificuldade para a sua caracterização imunofenotípica. Os marcadores de superfície típicos de linhagens MSC como CD34, CD90, CD44 e CD45 (desenvolvidos para cães) e ainda o CD105 (humano) e CD45 (rato) foram testados neste trabalho tanto para a citometria de fluxo quanto para a ICC (dados não publicados), porém, não funcionaram, possivelmente devido a inespecificidade para o cervo-do-pantanal. Entretanto, as células aqui estudadas apresentam características de MSC, tais quais a adesão em cultivo, morfologia fibroblastoide e plasticidade comprovada por sua

capacidade de diferenciação *in vitro*. A literatura suporta a tese de que células de gordura (BAER; GEIGER, 2012) e chifres (ROLF et al., 2008; HAORAN et al., 2010; SEO et al., 2014) são consideradas como MSC em outras espécies. Quanto a pele, existe extensa discussão científica a respeito de seu potencial e semelhança com as células MSC, compartilhando de tantas características entre si que se tornam indistinguíveis (YOUNG et al., 2001; HANIFFA et al., 2009). Entretanto, devido à falta de marcadores que comprovassem que as células de cervo-do-pantanal são MSC, preferiu-se mantê-las cautelosamente com o status de células multipotentes.

Até onde se sabe, a única linhagem de MSC que foi explorada até o momento em cervídeos foi a dos chifres, sendo estudada em espécies como *Cervus elaphus*, *Dama dama* e *Cervus nippon* (ROLF et al., 2008; HAORAN et al., 2010; SEO et al., 2014). Os chifres são um modelo único de regeneração em mamíferos e são utilizados nos estudos de redução da formação de cicatrizes, resistência à formação de tumores e abordagens terapêuticas para o estímulo da regeneração de membros e órgãos (KIERDORF; KIERDORF, 2011). Entretanto, com exceção da Rena (*Rangifer tarandus*), somente machos possuem essas estruturas, o que impede a obtenção de germoplasma dessa fonte em fêmeas, fazendo da gordura e pele fontes mais promissoras sob esse ponto de vista.

Os trabalhos realizados por outros grupos com a linhagem celular de chifres corroboram com os resultados deste estudo, demonstrando a habilidade de se diferenciar em adipócitos, condrócitos e osteócitos (BERG et al., 2007; SEO et al., 2014). Seo et al. (2014) puderam verificar por meio da ICC que há expressão de OCT4 e SOX2 e, ainda, conseguiram identificar a expressão de c-MYC, outro marcador relacionado à pluripotência. Entretanto, diferentemente dos resultados aqui apresentados, estes autores não encontraram expressão de Nanog, o que pode dever-se à inespecificidade dos anticorpos utilizados. Além dos marcadores de pluripotência, células de chifre expressam os marcadores típicos de MSC como CD105, CD9 e Stro-1 e estão ausentes marcadores como CD 45, CD31 e CD133 (ROLF et al., 2008; SEO et al., 2014).

5. CONCLUSÃO

Foi possível obter linhagens de células-tronco adultas multipotentes em cervo-do-pantanal. Pode-se dizer que o chifre, a pele e a gordura são fontes promissoras para auxiliar na construção de bancos genômicos devido à sua plasticidade e alta taxa de proliferação, bem como a facilidade em sua obtenção. A pele pode ser considerada a fonte de maior facilidade de obtenção, porém, é importante considerar que os tecidos possuem memórias epigenéticas diferentes, o que interfere na facilidade de diferenciação *in vitro*. Assim, seria interessante que vários tipos de células sejam armazenados na intenção de que outros estudos desvendem qual dessas linhagens é mais propensa à diferenciação em células germinativas, ou ainda na reprogramação em iPSC.

6. REFERÊNCIAS

- AMBADY, S.; MALCUIT, C.; KASHPUR, O.; KOLE, D.; HOLMES, W. F.; HEDBLUM, E.; PAGE, R. L.; DOMINKO, T. Expression of NANOG and NANOGP8 in a variety of undifferentiated and differentiated human cells. **The International Journal of Developmental Biology**, v. 54, n. 11–12, p. 1743–1754, 2010.
- ARAÑA, M.; MAZO, M.; ARANDA, P.; PELACHO, B.; PROSPER, F. Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells: Isolation, Expansion, and Characterization. In: CLIFTON, N. J. (Ed.). **Methods in Molecular Biology**. [s.l.] Springer, 2013. p. 47–61.
- BAER, P. C.; GEIGER, H. Adipose-Derived Mesenchymal Stromal/Stem Cells: Tissue Localization, Characterization, and Heterogeneity. **Stem Cells International**, v. 2012, p. 1–11, 2012.
- BAER, P. C.; GRIESCHE, N.; LUTTMANN, W.; SCHUBERT, R.; LUTTMANN, A.; GEIGER, H. Human adipose-derived mesenchymal stem cells in vitro: evaluation of an optimal expansion medium preserving stemness. **Cytotherapy**, v. 12, n. 1, p. 96–106, 2010.
- BERG, D. K.; LI, C.; ASHER, G.; WELLS, D. N.; OBACK, B. Red Deer Cloned from Antler Stem Cells and Their Differentiated Progeny. **Biology of Reproduction**, v. 77,

n. 3, p. 384–394, 2007.

BOOTH, H. A.; HOLLAND, P. W. Eleven daughters of NANOG. **Genomics**, v. 84, n. 2, p. 229–238, 2004.

BOYER, L. A.; LEE, T. I.; COLE, M. F.; JOHNSTONE, S. E.; LEVINE, S. S.; ZUCKER, J. P.; GUENTHER, M. G.; KUMAR, R. M.; MURRAY, H. L.; JENNER, R. G.; GIFFORD, D. K.; MELTON, D. A.; JAENISCH, R.; YOUNG, R. A. Core Transcriptional Regulatory Circuitry in Human Embryonic Stem Cells. **Cell**, v. 122, n. 6, p. 947–956, 2005.

BRAVO, M. O.; MORAES, J. M.; DUMMONT, C. B. S.; FILGUEIRAS, R. R.; HASHIMOTO, H. H.; GODOY, R. Isolation, expansion and characterization of equine adipose tissue derived stem cells. **Ars Veterinaria**, v. 28, n. 2, p. 66–74, 2012.

CAUFFMAN, G.; LIEBAERS, I.; VAN STEIRTEGHEM, A.; VAN DE VELDE, H. POU5F1 Isoforms Show Different Expression Patterns in Human Embryonic Stem Cells and Preimplantation Embryos. **Stem Cells**, v. 24, n. 12, p. 2685–2691, 2006.

COLLEONI, S.; DONOFRIO, G.; LAGUTINA, I.; DUCHI, R.; GALLI, C.; LAZZARI, G. Establishment, Differentiation, Electroporation, Viral Transduction, and Nuclear Transfer of Bovine and Porcine Mesenchymal Stem Cells. **Cloning and Stem Cells**, v. 7, n. 3, p. 154–166, 2005.

DANNER, S.; KAJAHN, J.; GEISMANN, C.; KLINK, E.; KRUSE, C. Derivation of oocyte-like cells from a clonal pancreatic stem cell line. **Molecular Human Reproduction**, v. 13, n. 1, p. 11–20, 2006.

DE JONG, J.; LOOIJENGA, L. H. J. Stem Cell Marker OCT3/4 in Tumor Biology and Germ Cell Tumor Diagnostics: History and Future. **Critical Reviews™ in Oncogenesis**, v. 12, n. 3–4, p. 171–203, 2006.

DUARTE, J. M. B.; VARELA, D.; PIOVEZAN, U.; BECCACECI, M. D.; GARCIA, J. E. **Blastocerus dichotomus - The IUCN Red List of Threatened Species**. . Acesso em: 1 out. 2015.

EASLEY, C. A.; PHILLIPS, B. T.; MCGUIRE, M. M.; BARRINGER, J. M.; VALLI, H.; HERMANN, B. P.; SIMERLY, C. R.; RAJKOVIC, A.; MIKI, T.; ORWIG, K. E.; SCHATTEEN, G. P. Direct Differentiation of Human Pluripotent Stem Cells into Haploid Spermatogenic Cells. **Cell Reports**, v. 2, n. 3, p. 440–446, 2012.

HANIFFA, M. A.; COLLIN, M. P.; BUCKLEY, C. D.; DAZZI, F. Mesenchymal stem cells: the fibroblasts' new clothes? **Haematologica**, v. 94, n. 2, p. 258–263, 2009.

HAORAN, S.; WEI, Z.; SHANLI, W.; CHUNYAN, W.; MEIZHU, Z.; DAN, T.; QIANKUN, Z.; YUJING, Z. Detection of telomerase activity and expression of TERT gene in antler of sika deer. **Animal Husbandry and Feed Science**, v. 2, n. 8–9, p. 12–14, 2010.

HAYASHI, K.; OGUSHI, S.; KURIMOTO, K.; SHIMAMOTO, S.; OHTA, H.; SAITOU, M. Offspring from Oocytes Derived from in Vitro Primordial Germ Cell-like Cells in Mice. **Science**, v. 338, n. 6109, p. 971–975, 2012.

HAYASHI, K.; OHTA, H.; KURIMOTO, K.; ARAMAKI, S.; SAITOU, M. Reconstitution of the Mouse Germ Cell Specification Pathway in Culture by Pluripotent Stem Cells. **Cell**, v. 146, n. 4, p. 519–532, 2011.

HOCHEDLINGER, K.; JAENISCH, R. Nuclear transplantation: lessons from frogs and mice. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 14, n. 6, p. 741–748, 2002.

HUA, J.; PAN, S.; YANG, C.; DONG, W.; DOU, Z.; SIDHU, K. S. Derivation of male germ cell-like lineage from human fetal bone marrow stem cells. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 19, n. 1, p. 99–105, 2009a.

HUA, J.; QIU, P.; ZHU, H.; CAO, H.; WANG, F.; LI, W. Multipotent mesenchymal stem cells (MSCs) from human umbilical cord: Potential differentiation of germ cells. **African Journal of Biochemistry Research**, v. 5, n. 4, p. 113–123, 2011.

HUA, J.; YU, H.; DONG, W.; YANG, C.; GAO, Z.; LEI, A.; SUN, Y.; PAN, S.; WU, Y.; DOU, Z. Characterization of mesenchymal stem cells (MSCs) from human fetal lung: Potential differentiation of germ cells. **Tissue and Cell**, v. 41, n. 6, p. 448–455, 2009b.

JOHNSON, J.; BAGLEY, J.; SKAZNIK-WIKIEL, M.; LEE, H.-J.; ADAMS, G. B.; NIIKURA, Y.; TSCHUDY, K. S.; TILLY, J. C.; CORTES, M. L.; FORKERT, R.; SPITZER, T.; IACOMINI, J.; SCADDEN, D. T.; TILLY, J. L. Oocyte Generation in Adult Mammalian Ovaries by Putative Germ Cells in Bone Marrow and Peripheral Blood. **Cell**, v. 122, n. 2, p. 303–315, 2005.

JOUNI, F. J.; ABDOLMALEKI, P.; BEHMANESH, M.; MOVAHEDIN, M. An in vitro study of the impact of 4mT static magnetic field to modify the differentiation rate of rat bone marrow stem cells into primordial germ cells. **Differentiation**, v. 87, n. 5, p. 230–

237, 2014.

KALTZ, N.; FUNARI, A.; HIPPAUF, S.; DELORME, B.; NOËL, D.; RIMINUCCI, M.; JACOBS, V. R.; HÄUPL, T.; JORGENSEN, C.; CHARBORD, P.; PESCHEL, C.; BIANCO, P.; OOSTENDORP, R. A. J. In Vivo Osteoprogenitor Potency of Human Stromal Cells from Different Tissues Does Not Correlate with Expression of POU5F1 or Its Pseudogenes. **Stem Cells**, v. 26, n. 9, p. 2419–2424, 2008.

KIERDORF, U.; KIERDORF, H. Deer Antlers – A Model of Mammalian Appendage Regeneration: An Extensive Review. **Gerontology**, v. 57, n. 1, p. 53–65, 2011.

LEE, G.; PAPAPETROU, E. P.; KIM, H.; CHAMBERS, S. M.; TOMISHIMA, M. J.; FASANO, C. A.; GANAT, Y. M.; MENON, J.; SHIMIZU, F.; VIALE, A.; TABAR, V.; SADELAIN, M.; STUDER, L. Modelling pathogenesis and treatment of familial dysautonomia using patient-specific iPSCs. **Nature**, v. 461, n. 7262, p. 402–406, 2009.

LEE, S.-L.; KANG, E.-J.; MAENG, G.-H.; KIM, M.-J.; PARK, J.-K.; KIM, T.-S.; HYUN, S.-H.; LEE, E.-S.; RHO, G.-J. Developmental Ability of Miniature Pig Embryos Cloned with Mesenchymal Stem Cells. **Journal of Reproduction and Development**, v. 56, n. 2, p. 256–262, 2010.

LEVI, B.; JAMES, A. W.; GLOTZBACH, J. P.; WAN, D. C.; COMMONS, G. W.; LONGAKER, M. T. Depot-Specific Variation in the Osteogenic and Adipogenic Potential of Human Adipose-Derived Stromal Cells. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 126, n. 3, p. 822–834, 2010.

LI, N.; PAN, S.; ZHU, H.; MU, H.; LIU, W.; HUA, J. BMP4 promotes SSEA-1 + hUC-MS C differentiation into male germ-like cells in vitro. **Cell Proliferation**, v. 47, n. 4, p. 299–309, 2014.

LIEDTKE, S.; ENGZMANN, J.; WACLAWCZYK, S.; WERNET, P.; KÖGLER, G. Oct4 and Its Pseudogenes Confuse Stem Cell Research. **Cell Stem Cell**, v. 1, n. 4, p. 364–366, 2007.

LIN, H.; SHABBIR, A.; MOLNAR, M.; LEE, T. Stem cell regulatory function mediated by expression of a novel mouse Oct4 pseudogene. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 355, n. 1, p. 111–116, 2007.

LIU, L. Cloning efficiency and differentiation. **Nature Biotechnology**, v. 19, n. 5, p.

406–406, 2001.

LU, T.; XIONG, H.; WANG, K.; WANG, S.; MA, Y.; GUAN, W. Isolation and Characterization of Adipose-derived Mesenchymal Stem Cells (ADSCs) from Cattle.

Applied Biochemistry and Biotechnology, v. 174, n. 2, p. 719–728, 2014.

LYSDAHL, H.; BAATRUP, A.; NIELSEN, A. B.; FOLDAGER, C. B.; BÜNGER, C. Phenol Red Inhibits Chondrogenic Differentiation and Affects Osteogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells in Vitro.

Stem Cell Reviews and Reports, v. 9, n. 2, p. 132–139, 2013.

MAKOOLATI, Z.; MOVAHEDIN, M.; FOROUZANDEH-MOGHADAM, M. Bone morphogenetic protein 4 is an efficient inducer for mouse embryonic stem cell differentiation into primordial germ cell.

In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal, v. 47, n. 5–6, p. 391–398, 2011.

MAMBELLI, L. I.; SANTOS, E. J. C.; FRAZÃO, P. J. R.; CHAPARRO, M. B.; KERKIS, A.; ZOPPA, A. L. V.; KERKIS, I. Characterization of Equine Adipose Tissue–Derived Progenitor Cells Before and After Cryopreservation.

Tissue Engineering Part C: Methods, v. 15, n. 1, p. 87–94, 2009.

MAZAHARI, Z.; MOVAHEDIN, M.; RAHBARIZADEH, F.; AMANPOUR, S. Different doses of bone morphogenetic protein 4 promote the expression of early germ cell-specific gene in bone marrow mesenchymal stem cells.

In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal, v. 47, n. 8, p. 521–525, 2011.

NAYERNIA, K.; LEE, J. H.; DRUSENHEIMER, N.; NOLTE, J.; WULF, G.; DRESSEL, R.; GROMOLL, J.; ENGEL, W. Derivation of male germ cells from bone marrow stem cells.

Laboratory Investigation, v. 86, n. 7, p. 654–663, 2006.

OBACK, B.; WELLS, D. Donor Cells for Nuclear Cloning: Many Are Called, but Few Are Chosen.

Cloning and Stem Cells, v. 4, n. 2, p. 147–168, 2002.

ORCIANI, M.; MORABITO, C.; EMANUELLI, M.; GUARNIERI, S.; SARTINI, D.; GIANNUBILO, S. R.; DI PRIMIO, R.; TRANQUILLI, A. L.; MARIGGIÒ, M. A. Neurogenic potential of mesenchymal-like stem cells from human amniotic fluid: the influence of extracellular growth factors.

Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents, v. 25, n. 1, p. 115–130, 2011.

PAIN, D.; CHIRN, G.-W.; STRASSEL, C.; KEMP, D. M. Multiple Retropseudogenes from Pluripotent Cell-specific Gene Expression Indicates a Potential Signature for Novel Gene Identification. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 8, p. 6265–6268, 2005.

PAPAMICHOS, S. I.; KOTOULA, V.; TARLATZIS, B. C.; AGORASTOS, T.; PAPAISIS, K.; LAMBROPOULOS, A. F. OCT4B1 isoform: the novel OCT4 alternative spliced variant as a putative marker of stemness. **Molecular Human Reproduction**, v. 15, n. 5, p. 269–270, 2009.

PARK, E.; PATEL, A. N. Changes in the expression pattern of mesenchymal and pluripotent markers in human adipose-derived stem cells. **Cell Biology International**, v. 34, n. 10, p. 979–984, 2010.

PEPTAN, I. A.; HONG, L.; MAO, J. J. Comparison of Osteogenic Potentials of Visceral and Subcutaneous Adipose-Derived Cells of Rabbits. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 117, n. 5, p. 1462–1470, 2006.

PESSÔA, L. V. F. **Estudo do potencial de pluripotência de células-tronco equinas derivadas de tecido adulto e cordão umbilical submetidas à reprogramação induzida geneticamente (células ips)**. 2016. Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Pirassununga, 2016.

PITTENGER, M. F.; MACKAY, A. M.; BECK, S. C.; JAISWAL, R. K.; DOUGLAS, R.; MOSCA, J. D.; MOORMAN, M. A.; SIMONETTI, D. W.; CRAIG, S.; MARSHAK, D. R. Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells. **Science**, v. 284, n. 5411, p. 143–147, 1999.

QIU, P.; BAI, Y.; PAN, S.; LI, W.; LIU, W.; HUA, J. Gender depended potentiality of differentiation of human umbilical cord mesenchymal stem cells into oocyte-Like cells in vitro. **Cell Biochemistry and Function**, v. 31, n. 5, p. 365–373, 2013.

RIEKSTINA, U.; ČAKSTINA, I.; PARFEJEVS, V.; HOOGDUIJN, M.; JANKOVSKIS, G.; MUIZNIEKS, I.; MUCENIECE, R.; ANCANS, J. Embryonic Stem Cell Marker Expression Pattern in Human Mesenchymal Stem Cells Derived from Bone Marrow, Adipose Tissue, Heart and Dermis. **Stem Cell Reviews and Reports**, v. 5, n. 4, p. 378–386, 2009.

ROLF, H. J.; KIERDORF, U.; KIERDORF, H.; SCHULZ, J.; SEYMOUR, N.; SCHLIEPHAKE, H.; NAPP, J.; NIEBERT, S.; WÖLFEL, H.; WIESE, K. G. Localization and Characterization of STRO-1+ Cells in the Deer Pedicle and Regenerating Antler. **PLoS ONE**, v. 3, n. 4, p. e2064, 2008.

SEO, M.-S.; PARK, S.-B.; CHOI, S.-W.; KIM, J.-J.; KIM, H.-S.; KANG, K.-S. Isolation and Characterization of Antler-Derived Multipotent Stem Cells. **Cell Transplantation**, v. 23, n. 7, p. 831–843, 2014.

SONG, S.-H.; KUMAR, B. M.; KANG, E.-J.; LEE, Y.-M.; KIM, T.-H.; OCK, S.-A.; LEE, S.-L.; JEON, B.-G.; RHO, G.-J. Characterization of Porcine Multipotent Stem/Stromal Cells Derived from Skin, Adipose, and Ovarian Tissues and Their Differentiation In Vitro into Putative Oocyte-Like Cells. **Stem Cells and Development**, v. 20, n. 8, p. 1359–1370, 2011.

SUO, G.; HAN, J.; WANG, X.; ZHANG, J.; ZHAO, Y.; ZHAO, Y.; DAI, J. Oct4 pseudogenes are transcribed in cancers. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 337, n. 4, p. 1047–1051, 2005.

TAT, P. A.; SUMER, H.; JONES, K. L.; UPTON, K.; VERMA, P. J. The Efficient Generation of Induced Pluripotent Stem (iPS) Cells From Adult Mouse Adipose Tissue-Derived and Neural Stem Cells. **Cell Transplantation**, v. 19, n. 5, p. 525–536, 2010.

TSAI, C.-C.; SU, P.-F.; HUANG, Y.-F.; YEW, T.-L.; HUNG, S.-C. Oct4 and Nanog Directly Regulate Dnmt1 to Maintain Self-Renewal and Undifferentiated State in Mesenchymal Stem Cells. **Molecular Cell**, v. 47, n. 2, p. 169–182, 2012.

WANG, F.; LIU, C.; ZHANG, S.; LIU, W.; HUA, J. Transplantation of Goat Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells (gMSCs) Help Restore Spermatogenesis in Endogenous Germ Cells-Depleted Mouse Models. **Journal of Integrative Agriculture**, v. 12, n. 3, p. 483–494, 2013.

YEW, T.-L.; CHIU, F.-Y.; TSAI, C.-C.; CHEN, H.-L.; LEE, W.-P.; CHEN, Y.-J.; CHANG, M.-C.; HUNG, S.-C. Knockdown of p21Cip1/Waf1 enhances proliferation, the expression of stemness markers, and osteogenic potential in human mesenchymal stem cells. **Ageing Cell**, v. 10, n. 2, p. 349–361, 2011.

YOUNG, H. E.; STEELE, T. A.; BRAY, R. A.; HUDSON, J.; FLOYD, J. A.; HAWKINS,

K.; THOMAS, K.; AUSTIN, T.; EDWARDS, C.; CUZZOURT, J.; DUENZL, M.; LUCAS, P. A.; BLACK, A. C. Human reserve pluripotent mesenchymal stem cells are present in the connective tissues of skeletal muscle and dermis derived from fetal, adult, and geriatric donors. **The Anatomical Record**, v. 264, n. 1, p. 51–62, 2001.

YU, X.; WANG, N.; QIANG, R.; WAN, Q.; QIN, M.; CHEN, S.; WANG, H. Human Amniotic Fluid Stem Cells Possess the Potential to Differentiate into Primordial Follicle Oocytes In Vitro. **Biology of Reproduction**, v. 90, n. 4, p. 1–11, 2014.

ZUK, P. A.; ZHU, M.; ASHJIAN, P.; UGARTE, D. A.; HUANG, J. I.; MIZUNO, H.; ALFONSO, Z. C.; FRASER, J. K.; BENHAIM, P.; HEDRICK, M. H. Human Adipose Tissue Is a Source of Multipotent Stem Cells. **Molecular Biology of the Cell**, v. 13, n. 12, p. 4279–4295, 2002.

ZVAIFLER, N. J.; MARINOVA-MUTAFCHIEVA, L.; ADAMS, G.; EDWARDS, C. J.; MOSS, J.; BURGER, J. A.; MAINI, R. N. Mesenchymal precursor cells in the blood of normal individuals. **Arthritis Research**, v. 2, n. 6, p. 477–488, 2000.

CAPÍTULO 3 – Tentativa de indução de pluripotência em células-tronco adultas de cervo-do-pantanal

RESUMO – A criopreservação de gametas e embriões é de extrema importância para a manutenção de diversidade genética em pequenas populações selvagens, porém estes materiais são de difícil obtenção. Estudos realizados com células-tronco pluripotentes induzidas (iPSC) humanas e de camundongo mostraram-se capazes de se diferenciar em células germinativas primordiais, espermatozoides e oócitos. Estudos sobre iPSC em cervídeos são inéditos, logo, o enfoque neste trabalho foi estabelecer protocolos para a obtenção de linhagens iPSC estáveis por meio da expressão de fatores exógenos (c-Myc, Klf4, Oct4 e Sox2) na espécie *Blastocerus dichotomus* para produzir gametas viáveis no futuro. No primeiro experimento, a tentativa de derivação de células iPSC a partir das linhagens celulares multipotentes de chifre, gordura e pele, foi conduzida por meio de transfecção de plasmídeos transposons (PiggyBac) via nucleofecção. Já o segundo experimento foi realizado por meio de transfecção de plasmídeos (PiggyBac) via lipofecção. No terceiro experimento, fatores lentivirais (STEMCCA) foram transduzidos nas células de interesse. Somente pelo método de nucleofecção foi possível obter colônias, entretanto, após selecionadas, as colônias não expandiram, impossibilitando a formação de linhagens iPSC.

Palavras-chave: Células-tronco pluripotentes induzidas, lentivirus, lipofecção, nucleofecção, PiggyBac.

CHAPTER 3 - Attempt to induce pluripotency in adult stem cells of marsh deer (*Blastocerus dichotomus*)

ABSTRACT - The cryopreservation of gametes and embryos is extremely important for maintaining genetic diversity in small wild populations, but these materials are difficult to obtain. Studies with induced pluripotent stem cells (iPSC) in human and mouse proved to be able to differentiate into germ cells, sperm and oocytes. Studies with iPSC in cervids are inedited; therefore, the aim of this study was to establish protocols to obtain stable iPSC lines by means of gene transfection of exogenous factors (c-Myc, Klf4, Oct4 e Sox2) in the species *Blastocerus dichotomus* to produce viable gametes in the future. In the first experiment, the attempt of derivation of iPSC from multipotent cell lines of antler, fat and skin was conducted using the system of transposons (PiggyBac) by nucleofection. In the second experiment, the transposon system (PiggyBac) was used by lipofection. The third experimen was conducted using lentiviral method (STEMCCA) for transduce the cells. Only with nucleofection method iPSC-like colonies were produced. However, no colonies continued growing after cloning, making it impossible to obtain stable iPSC lines.

Keywords: induced pluripotent stem cells, lentivirus, lipofection, nucleofection, PiggyBac.

CAPÍTULO 3 – Tentativa de indução de pluripotência em células-tronco adultas de cervo-do-pantanal

1. INTRODUÇÃO

O cervo-do-pantanal (*B. dichotomus*), uma espécie classificada como vulnerável (VU) pela lista vermelha da IUCN (DUARTE et al., 2008), teve sua distribuição geográfica original drasticamente reduzida (aproximadamente 65% das áreas ocupadas foram perdidas em apenas quatro décadas) (WEBER; GONZALEZ, 2003). Para auxiliar a manutenção de diversidade genética dessas populações a longo prazo, os bancos genômicos (sêmen, oócitos, embriões, fibroblastos, etc) e as biotécnicas de reprodução assistida são ferramentas essenciais (WILDT, 1989; HOLT; PICKARD, 1999). Entretanto, a obtenção e criopreservação de gametas e embriões em espécies selvagens e aplicação das biotécnicas reprodutivas é uma tarefa complexa e de difícil execução.

A maior facilidade em se obter e congelar tecidos de animais selvagens torna esta uma fonte de material biológico muito promissora. Avanços recentes na tecnologia de reprogramação celular têm proporcionado abordagens alternativas, onde células somática são induzidas ao estado de pluripotência (iPSC) e são capazes de recriar a meiose por completo, se diferenciando em gametas funcionais e propiciando o nascimento de indivíduos férteis (HAYASHI et al., 2011, 2012; HIKABE et al., 2016; ZHOU et al., 2016). Assim, a partir da obtenção de um único fragmento de tecido haveria possibilidade de uma produção ilimitada de gametas, mesmo após a morte do animal. Ainda, facilitaria imensamente a obtenção de material de indivíduos, sejam eles pré-puberes ou senis, de cativeiro ou vida livre, sem que para isso tenham que passar por vários procedimentos ou necessitassem do desenvolvimento de protocolos hormonais ou de colheita específicos para a obtenção de gametas e embriões. Por último, as células somáticas são muito mais fáceis de serem criopreservadas em relação aos gametas e embriões, principalmente quando em situações a campo.

Para gerar as iPSC, a eficiência da reprogramação varia de acordo com o tipo celular utilizado sendo, geralmente, menor quando são usadas células terminalmente diferenciadas e mais rápida e eficiente em células menos diferenciadas ou

indiferenciadas. Assim, questões como a eficiência de reprogramação, a facilidade de acesso ao tecido e a facilidade de manter as células *in vitro* são fatores chave para o sucesso da técnica e merecem ser estudados.

No caso dos cervídeos, existe a possibilidade singular de se trabalhar com células-tronco de chifres. Chifres são substituídos periodicamente devido à proliferação de células-tronco e se projetam a partir do osso frontal de veados machos, com exceção das renas *Rangifer tarandus* onde há ocorrência de chifres em ambos os sexos (KIERDORF; KIERDORF, 2011), o que restringe a obtenção desse tipo de material em fêmeas de outras espécies. Em estudos prévios com *Cervus elaphus* e *Dama dama*, foi possível identificar que células do perióstio do pedículo expressam marcadores de células-tronco tais como CD9, OCT-4, Nanog e STRO-1 (ROLF et al., 2008; LI; YANG; SHEPPARD, 2009). Entretanto, não há relatos de criação de linhagens de iPSC a partir dessa fonte de tecido.

As células-tronco derivadas de tecido adiposo são consideradas por alguns autores como a fonte ideal de células somáticas para a obtenção de iPSC devido a sua rápida proliferação e o fato de gerar linhagens de iPSC de maneira mais eficiente do que outros tipos de tecido (por exemplo, fibroblastos embrionários e células-tronco neurais adultas de camundongo (TAT et al., 2010). A pele é outra fonte interessante, principalmente devido a sua facilidade de obtenção, e assim como o tecido adiposo, pode ser obtido de ambos os sexos.

As iPSC já foram derivadas a partir de células somáticas de muitas espécies domésticas e selvagens, mas não há relatos de células iPSC de quaisquer espécies de cervídeos. O desenvolvimento de iPSC visando sua diferenciação em gametas no futuro seria importante para auxiliar na conservação destes indivíduos. Os estudos com *B. dichotomus* beneficiariam a própria espécie e serviriam como modelo para a obtenção de iPSC em outros cervídeos, uma vez que um terço das espécies deste táxon são classificadas como ameaçadas ou se encontram sob risco de extinção (IUCN, 2015). Considerando as vantagens em se desenvolver as linhagens de iPSC para cervídeos, foi proposta a reprogramação de células provenientes do chifre, tecido adiposo e pele em iPSC para *B. dichotomus*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Obtenção das biópsias

As biópsias foram obtidas de animais pertencentes ao Centro de Conservação do Cervo do Pantanal (CCCP) de Promissão – SP, Brasil e Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos (NUPECCE) do Departamento de Zootecnia da FCAV - UNESP, Jaboticabal – SP, Brasil. Para a obtenção das amostras, os animais foram anestesiados com a associação de 7,0 mg/Kg de cloridrato de quetamina (Vetaset® - Fort Dodge - Brasil) e 1,0 mg/Kg de cloridrato de xilazina (Rompum® - Bayer - Brasil) utilizando dardos disparados por arma anestésica (aplicação IM).

As biópsias de chifre foram obtidas de três machos que durante o período experimental apresentaram a troca de chifres e as amostras foram colhidas 45-60 dias após o início do crescimento dos chifres, sendo o tecido obtido da área 0,5 cm abaixo do ápice dos chifres. A pele foi obtida de duas fêmeas e um macho da parte medial da coxa e amostras do tecido adiposo foram obtidas de quatro fêmeas a partir da região retroauricular, abaixo da cartilagem. A obtenção de gordura deste local inédito se deveu à impossibilidade de obtenção do tecido a partir de regiões de acesso fácil e seguro como próxima à região caudal ou abdominal, comumente encontradas em outras espécies.

2.2. Isolamento das células-tronco multipotentes

Após a realização das biópsias, o material foi armazenado em criotubo com solução McCoy's (Sigma, M4892) e mantido sob refrigeração em isopor. Ao chegar no laboratório, os tecidos foram lavados quatro vezes em PBS e foi realizado o isolamento das células pela desagregação mecânica do tecido em pedaços com cerca de 2mm utilizando lâmina de bisturi, seguido de digestão enzimática com colagenase I (200 U/ml – Sigma) a 37°C em estufa de CO₂ a 5% por período de 3 horas para a pele e chifre e de 30 a 60 minutos para gordura. Após a digestão enzimática as células foram plaqueadas em meio de cultivo “*Dulbecco's modified Eagle's minimal essential medium*” (DMEM) com altas taxas de glicose (4,5 g/l), glutamina (0,6 g/l), 1% de aminoácidos essenciais, soro fetal bovino (SFB) na proporção de 50% v/v, 50 mg L⁻¹

de Sulfato de Gentamicina e 2 mg L⁻¹ de Anfotericina B). A troca de meio foi realizada 48 horas após o plaqueamento inicial para a remoção de células não aderentes ao frasco, e para a manutenção do cultivo o meio foi trocado duas vezes por semana (DMEM com altas taxas de glicose (4,5 g/l), glutamina (0,6 g/l), 1% de aminoácidos essenciais, soro fetal bovino (SFB) na proporção de 10% v/v, 50 mg L⁻¹ de Sulfato de Gentamicina e 2 mg L⁻¹ de Anfotericina B). Células da segunda ou terceira passagem foram criopreservadas em meio composto de 80% de SFB, 10% de dimetilsulfóxido (DMSO), 10% de DMEM, 100 unidades/mL de penicilina e 100 µg/mL estreptomicina, e criopreservadas pelo método de resfriamento lento (4 horas a 4°C; 30 minutos em vapor de nitrogênio e posteriormente imersas em nitrogênio líquido) sendo mantidas em nitrogênio líquido até o momento de realizar o experimento. Estas células foram posteriormente descongeladas em banho-maria a 37°C e cultivadas, sendo utilizadas nos experimentos células da quarta e quinta passagem.

2.3. Indução da pluripotência

2.3.1. Eletroporação pelo sistema PiggyBac em presença de células “feeder”

O protocolo de eletroporação utilizado para derivação das iPSC foi semelhante ao anteriormente utilizado para derivação de iPSC equinas por NAGY et al. (2011). Portanto, para gerar iPSC de *Blastocerus dichotomus*, usamos o sistema baseado em transfecções com transposons PiggyBac. Os plasmídeos PBCAG-rtTA (“reverse tetracycline transactivator”), pCyL43 PBase, PB-GFP e o PB-TET-MKOS (vetor policistrônico excisável com sequência de genes de murinos) doxíciclina induzido, foram construídos conforme previamente descrito por Wang et al. (2008) e Nagy et al. (2011).

As células foram transfectadas em cubas utilizando o equipamento eletroporador Neon (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante. Para cada eletroporação de 5x10⁴ células, foi utilizada uma combinação de 1µg de DNA composto por iguais proporções dos quatro plasmídeos (0,25 µg cada), em placas de 6 poços. Essas placas foram previamente gelatinizadas (0,1% gelatina) e semeadas com fibroblastos embrionárias de murino (MEF) inativados em mitomicina C por 3 horas, para servirem como “feeder” das células transfectadas.

O meio onde as células foram depositadas após a transfecção foi composto por DMEM (Invitrogen, 11960-044), 2mM glutamax (Invitrogen), 0,1mM β -mercaptoethanol, 0,1mM de aminoácidos não essenciais, 1mM de piruvato de sódio, 50U/mL de penicilina/estreptomicina, 1000U/mL de LIF, 10ng/mL de bFGF, 5 μ g/mL de insulina, 1,5 μ g/mL de doxiciclina, 3 μ M de inibidor de GSK (Stemgent #CHIR99021), 0,5M de inibidor de MEK (Stemgent #PD0325901), 2,5 μ M de inibidor de ALK/TGF (Stemgent #A83-01), 1mM de tiazovivina e ainda continham 10% de SFB ou 15% de substituto de soro Knockout (KOSR), dependendo do grupo testado. Também foram testados dois programas de eletroporação, sendo utilizados o protocolo 1 que consiste em voltagem de pulso 1400, amplitude de pulso 20, número de pulsos 1, e o protocolo 2 que consiste em voltagem de pulso 1400, amplitude de pulso 30 e número de pulsos 2.

Uma vez que o plasmídeo PB-GFP que transcreve a proteína fluorescente verde ("*green fluorescent protein*" - GFP) foi utilizado, a quantidade de células que integraram esses plasmídeos pode ser monitorada, e assim pode ser avaliado o protocolo de eletroporação para integração destes plasmídeos pelas células. O protocolo 1 foi utilizado anteriormente para a derivação de iPSC de equinos (Nagy *et al.*, 2011) enquanto que o protocolo 2 foi otimizado para as células em questão, a partir da realização de testes com os 24 programas pré-existent na máquina Neon e transfectando as células somente com o plasmídeo contendo GFP, para avaliar a taxa de células transfectadas. Realizou-se a análise em quatro linhagens diferentes (2 de chifre, 1 de gordura e 1 de pele), e correlacionou-se os parâmetros da máquina (voltagem do pulso, amplitude de pulso e número de pulsos) com o número de células transfectadas, para obter um programa que melhor se adequasse a estas células.

Portanto, as células foram testadas segundo os seguintes grupos:

- Grupo usando o protocolo de eletroporação 1 em meio contendo SFB
- Grupo usando o protocolo de eletroporação 1 em meio contendo KOSR
- Grupo usando o protocolo de eletroporação 2 em meio contendo SFB
- Grupo usando o protocolo de eletroporação 2 em meio contendo KOSR

2.3.2. Lipofecção pelo sistema PiggyBac na ausencia de células “feeder”

Para a metodologia de lipofecção foi utilizada a Lipofectamina® 3000. Primeiramente semeamos 1×10^5 células viáveis por poço (placa de 6 poços) em placas cobertas por matrigel. No dia seguinte ao plaqueamento a Lipofectamina® 3000 foi diluída em duas diferentes concentrações (3,75 e 7,5 μ L) em 125 μ L de meio Opti-MEM. O master mix de DNA foi preparado, diluindo o DNA (1,25 μ g de cada um dos plasmídeos usados anteriormente - PB-TET-MKOS, PBCAG-rtTA, pCyL43 PBase e PB-GFP (para monitorar a quantidade de células que integraram os plasmídeos), totalizando 5 μ g de DNA em 250 μ L de meio Opti-MEM, e adicionando 10 μ L do reagente p3000. Este DNA foi adicionado à Lipofectamina® 3000 diluída em Opti-MEM, sendo incubado por 5 minutos em temperatura ambiente. Esse complexo DNA-lipídio foi adicionado as células (250 μ L por poço). Após 24 horas o meio foi trocado. O meio utilizado para manutenção das células foi o mesmo descrito anteriormente para células que passaram por eletroporação e, portanto, os seguintes grupos foram testados:

- Concentração de 3,75 μ L de Lipofectamina® 3000 em meio contendo SFB
- Concentração de 3,75 μ L de Lipofectamina® 3000 em meio contendo KOSR
- Concentração de 7,5 μ L de Lipofectamina® 3000 em meio contendo SFB
- Concentração de 7,5 μ L de Lipofectamina® 3000 em meio contendo KOSR

2.3.3. Lentivírus pelo sistema STEMCCA em presença de células “feeder”

A indução de reprogramação foi realizada conforme protocolo previamente descrito por Bressan (2013), para linhagens celulares de bovinos. Para a produção viral, foi utilizada a lipofecção (Lipofectamina 3000, Life Technologies), em que células 293FT foram plaqueadas em placas de cultivo de 100mm na concentração de 5×10^6 células, de modo que apresentassem 90% de confluência no momento da transfecção. Foram utilizados 12 μ g dos vetores lentivirais policistrônicos excisáveis STEMCCA (fatores murinos ou humanos) 2 μ g dos vetores auxiliares TAT, VER, Hgpm2 e 2,4 μ g de VSVG.

A lipofecção das células foi realizada por 12 a 16 horas (“*overnight*”), e após este período o meio foi trocado. Depois de 24, 48 e 72h o meio foi coletado e filtrado

para que fosse utilizado na transdução (meio fresco). As células de cervo-do-pantanal foram cultivadas (2×10^5 células por poço de placa de 6 poços) e transduzidas pelo mecanismo lentiviral com o vetor STEMCCA contendo os fatores OSKM humanos (hOSKM) ou murinos (mOSKM) na presença de $8\mu\text{g/ml}$ polibreno (brometo de hexadimetrina, Sigma). Cinco a seis dias após a transdução, as células foram repicadas enzimaticamente com Tryple (Life technologies) e $1,25 \times 10^4$ células foram transferidas para placas de 6 poços contendo MEFs mitoticamente inativados (Mitomicina C- Sigma). As células foram mantidas em meio de cultivo composto por DMEM/F12 (Invitrogen), 20% KOSR (Invitrogen), 2mM Glutamina (Invitrogen), 1% aminoácidos não essenciais (Invitrogen), 0,055mM beta-mercaptoetanol (Invitrogen), 10ng/mL bFGF (Sigma) e antibióticos, sendo trocado a cada dois dias. Portanto, os seguintes grupos foram testados:

- Grupo contendo fatores STEMCCA humanos
- Grupo contendo fatores STEMCCA murinos

Uma das linhagens de pele aqui testada foi transduzida apenas com o gene repórter GFP, para avaliação da capacidade do método lentiviral em entregar o material genético para o interior das células testadas. Após 48 horas, as células foram tripsinizadas com Tryple (Life technologies) e avaliadas por citometria de fluxo (BD FACSAria™ Cell Sorters)

Em todas as metodologias aqui testadas (eletroporação, lipofecção, lentivirus) para a produção das iPSC, as placas foram mantidas por, no mínimo, 35 dias aguardando o aparecimento de colônias.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As tentativas de indução à pluripotência pelo método de eletroporação nas placas de seis poços (5 transfectadas e um controle negativo) foram realizadas 12 vezes: cinco vezes no grupo de meio contendo SFB e utilizando protocolo 1 (três vezes em chifre, uma vez em gordura e uma vez em pele), três vezes no grupo de meio contendo SFB e utilizando protocolo 2 (duas vezes em chifre e uma em gordura), uma vez no grupo de meio contendo KOSR e utilizando protocolo 1 (chifre) e três

vezes no grupo de meio contendo KOSR e utilizando protocolo 2 (duas vezes em chifre e uma vez em gordura).

As tentativas de indução à pluripotência inicialmente foram realizadas com o protocolo 1 da máquina Neon, conforme descrito para equinos (NAGY et al., 2011), havendo cerca de 40% de células GFP positivas. Entretanto, devido à ausência de colônias que crescessem para formar linhagens, bem como ao menor número de células transfectadas (GFP positivas) em comparação ao observado em equinos (~90%), realizamos testes para otimizar a transfecção. Foi observada melhoria de cerca de 20% na quantidade de células GFP positivas (cerca de 60%) quando o programa de otimização foi utilizado.

Após as tentativas com o protocolo 2 e, ainda sem o aparecimento de colônias, o SFB foi substituído por KOSR, uma vez que estudos têm demonstrado que ele aumenta notavelmente a eficiência de indução à reprogramação podendo, inclusive, promover a conversão de iPSC parcialmente reprogramadas em completamente reprogramadas (CHEN et al., 2012; ZHAO, 2014). Além disso, o SFB utilizado durante o estágio de reprogramação pode ter efeitos deletérios, como alterações nas atividades da H3K9 metiltransferase e desmetilase, devido a presença de fatores de crescimento da família BMP na sua composição (CHEN et al., 2013). Já o KOSR tem componentes como a tiamina e vitamina C, que favorecem a reprogramação.

A vitamina C já foi amplamente estudada na reprogramação de iPSC e possui capacidade antioxidante (ESTEBAN et al., 2010), previne o silenciamento do *locus* Dlk1-Dio3 (que normalmente ocorre com o uso do SFB) que compromete a habilidade em gerar células inteiramente iPSC derivadas de células adultas (STADTFELD et al., 2012), tem ligação com a demetilação ativa do DNA (CHUNG et al., 2010) e influencia outros mecanismos epigenéticos (WANG et al., 2011a). Sua utilização promoveu melhoria na qualidade das iPSCs de camundongos com base no ensaio de complementação tetraploide e esta melhoria foi atribuída à redução nas aberrações de metilação do DNA (STADTFELD et al., 2012).

Apesar dos esforços e modificações realizadas nos protocolos, não foram obtidas linhagens de iPSC. Após cerca de 20 dias, foi possível verificar que algumas colônias começavam a aparecer nas placas (Figura 1), algumas de formato irregular (Figura 1 B), sendo a maioria delas GFP positivas. Após seleção, as colônias foram

cortadas em quatro partes com lâmina de bisturi e passadas para novas placas com auxílio de ponteiras. Entretanto, após a passagem não foi observado crescimento celular. É possível que estas células tenham se reprogramado parcialmente, ou se tornado refratárias a se reprogramarem por vários motivos que incluem a incapacidade de passar pela transição mesenquimal para epitelial (MET), ativação aberrante de genes associados à diferenciação e falha em manter a expressão de genes de pluripotência (POLO et al., 2012).

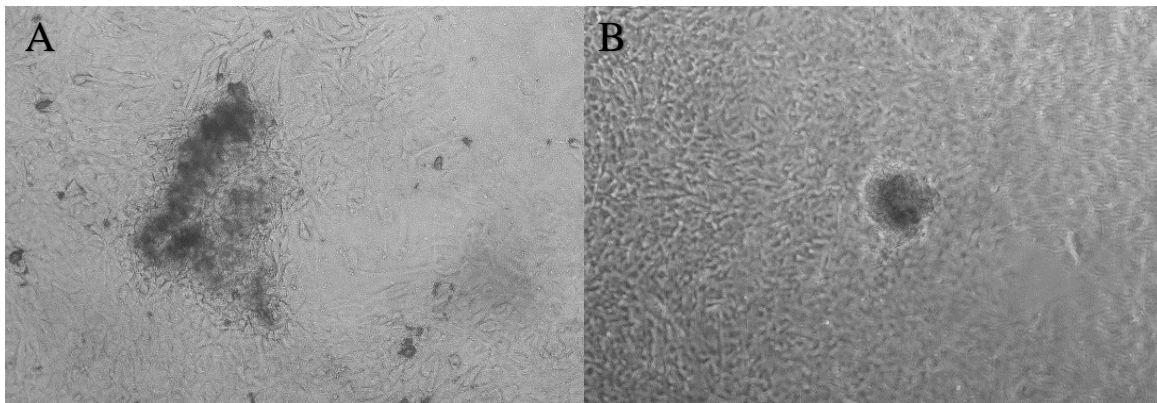


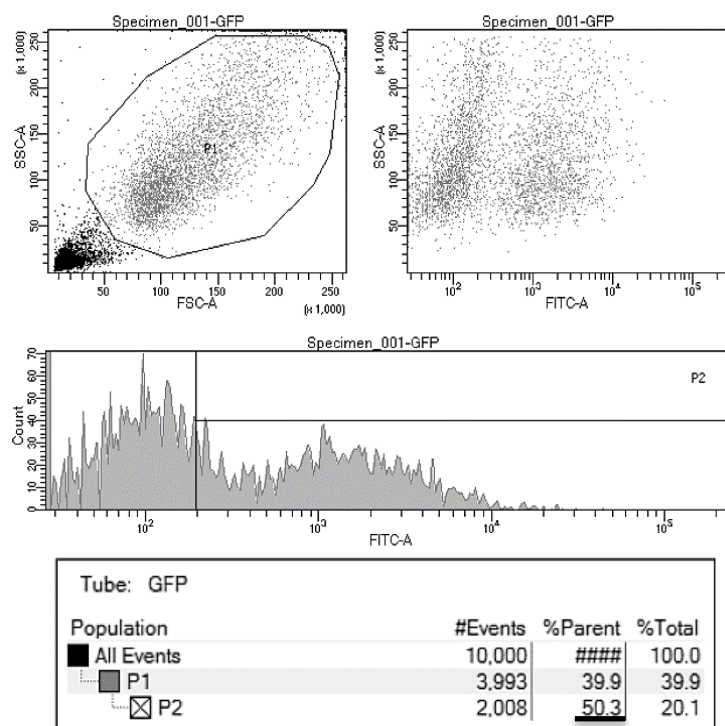
Figura 1 – Fotomicrografia ilustrando as colônias derivadas da linhagem de chifre utilizando a técnica de eletroporação. (A) Colônia irregular (aumento 100x) (B) Colônia regular (aumento 40x).

Vários relatos corroboram que a fonte do tecido influencia a eficiência e fidelidade da reprogramação em células pluripotentes (AOI et al., 2008; MAHERALI et al., 2008; MIURA et al., 2009; KIM et al., 2010). No entanto, independente da fonte de tecido utilizada, não foi possível estabelecer linhagens iPSC de cervo-do-pantanal nas condições testadas. O protocolo aqui utilizado de eletroporação é idêntico ao utilizado por Nagy et al. (2011) para a derivação de iPSC equinas, entretanto, os referidos autores tiveram sucesso na reprogramação apenas quando utilizaram fibroblastos fetais, uma vez que quando o mesmo protocolo foi aplicado em fibroblastos adultos, não foi possível produzir iPSC (L.C. Smith, comunicação pessoal). Todavia, a obtenção de fibroblastos fetais em cervo-do-pantanal é extremamente complexa e uma estratégia ineficaz quando considera-se sua utilização para a formação dos bancos de germoplasma.

Já as tentativas via lipofecção foram realizadas uma vez em pele em um poço (placa 6 poços) para cada um dos grupos. Após 24 horas, foi verificado que

praticamente não haviam células GFP positivas na placa, e após cerca de 30 dias, não havia qualquer formação de colônias. Possivelmente o problema aqui se refere à inserção dos plasmídeos para o interior das células.

Para as tentativas com o vetor STEMCCA utilizando o método lentiviral, os resultados obtidos pela citometria de fluxo para a observação do gene repórter GFP corroboram com o anteriormente encontrado na eletroporação, havendo cerca de 50% das células expressando a proteína (Figura 2). Nessa metodologia cada amostra (duas de pele, uma de chifres e uma de gordura) foi testada em uma placa de seis poços, sendo que três delas continham vetores STEMCCA humanos e três continham fatores murinos. Quando realizada em bovinos, esta metodologia resultou em boa reprogramação utilizando os fatores murinos com maior sucesso (BRESSAN, 2013), enquanto que para equinos, os fatores humanos são preferíveis (PESSÔA, 2016).



Entretanto, neste trabalho não foi possível a observação de colônias independentemente do vetor utilizado.

Figura 2 - Resultados obtidos pela citometria de fluxo, indicando que 50,3% das células expressavam o gene repórter GFP.

As barreiras em se obter as iPSC de cervídeos eram esperadas, tendo em vista que para ungulados domésticos as dificuldades em se obter linhagens de células

pluripotentes estão bem descritas. O progresso na criação de linhagens robustas de ESC tem tido sucesso limitado (BREVINI et al., 2007; TALBOT; BLOMBERG, 2008). Já para as iPSC, a maior parte dos estudos descreve problemas tais como falhas na inativação da expressão dos genes exógenos após a reprogramação, falhas na manutenção das células por períodos prolongados, e ainda na caracterização completa dessas linhagens para atender todos os critérios de pluripotência, especialmente os testes *in vivo*. Ao replicar as condições de cultura utilizadas de forma bem sucedidas para camundongos ou humanos, não se obteve o mesmo sucesso na produção de iPSC de ungulados domésticos, sendo a identificação do conjunto de fatores ideais para estas linhagens um dos maiores desafios (NANDAL; TELUGU, 2014).

Uma das grandes questões a serem discutidas trata dos genes exógenos utilizados para a reprogramação. As taxas aberrantes na metilação do DNA são maiores em células iPSC geradas pelos fatores de Yamanaka (c-Myc, Klf4, Oct4 e Sox2 - MKOS) em comparação as células obtidas por transferência nuclear (MA et al., 2014), o que sugere que os fatores MKOS isoladamente não são suficientes para indução da reprogramação. A geração de iPSCs de maneira eficiente e fidedigna as ESC poderia ser conseguida pela utilização de fatores de expressão adicionais ou alternativos. Wang et al. (2011b) demonstraram rápida reprogramação de fibroblastos murinos e humanos utilizando os fatores MKOS em conjunto com dois receptores nucleares de hormônios: Rarc e Lrh1. Com isso, eles encurtaram um processo de reprogramação que costuma levar de 3 a 4 semanas para 4 a 5 dias. Ao utilizar os fatores MKOS por meio do sistema PiggyBac em adipócitos maduros de murino, Nie et al. (2015) verificaram ausência de formação de colônias. Entretanto, após utilizar os mesmo seis fatores descritos por (WANG et al., 2011b), as colônias começaram a surgir a partir do 16º dia, sendo que 86% delas puderam ser expandidas e formaram linhagens. Os fatores adicionais Lrh1 e Rarc são reguladores do aumento da expressão de Oct4 e Nanog, alterando a cinética de reprogramação e melhorando a eficiência da reprogramação completa.

Ainda, em experimentos com bovinos (SUMER et al., 2011), leopardo das neves - *Panthera uncia* (VERMA et al., 2012), tigre de bengala - *Panthera tigris*, serval - *Leptailurus serval* e onça pintada - *Panthera onca* (VERMA et al., 2013), os fatores

de Yamanaka não foram suficientes para induzir a pluripotência, sendo necessária a adição de Nanog ao coquetel de indução retroviral. Assim como verificado em nosso experimento, os trabalhos anteriormente mencionados observaram a formação de colônias quando se utilizaram apenas os fatores MKOS, no entanto, não foi possível mantê-las em cultivo quando eram realizadas novas passagens. Após a inclusão de Nanog, foram produzidas colônias grandes e circulares que puderam ser expandidas por muitas passagens e deram origem a linhagens de iPSC, provando sua pluripotência *in vitro* e em alguns testes *in vivo*.

Em outro experimento realizado em bovinos, Talluri et al. (2015) utilizaram o método PiggyBac para fibroblastos fetais e não obtiveram linhagens de iPSC quando utilizaram apenas os fatores de MKOS, sendo necessária a adição tanto de NANOG quanto de Lin28 para reprogramar as células. West et al. (2010) também utilizaram este coquetel de fatores para produzirem iPSC em suínos e, interessante, as linhagens foram capazes de contribuir na produção de proles quiméricas. Entretanto, a necessidade da adição ou modificação dos fatores exógenos na reprogramação das células não pode ser identificado com um fator isolado, em vista de que esta necessidade varia de acordo com o tipo de tecido utilizado, método de reprogramação, composição do meio de cultivo, e muitos outros fatores. A exemplo, podemos citar o trabalho realizado por Kawaguchi et al. (2015) utilizando o sistema PiggyBac para células adiposas em bovinos, que criaram linhagens tão estáveis que possibilitaram contribuição na massa celular interna de blastocistos hospedeiros e fetos quiméricos sem a necessidade de Nanog exógeno.

Entretanto, quando utilizados fibroblastos embrionários transfectados sobre as mesmas condições, as colônias que apareceram não deram origem a nenhuma linhagem estável o suficiente para ser mantida. Outra questão muito peculiar é o fato de que parece haver mais eficiência na reprogramação quando são utilizados dois vetores, um contendo OKS e um segundo contendo apenas c-MYC, ao invés de um único vetor policistrônico MKOS (TSUKIYAMA; YASUHIDE, 2014). Neste mesmo experimento realizado em bovinos por Kawaguchi et al. (2015) foi reportado que a utilização de um único vetor MKOS não resultou no aparecimento de colônias das células adiposas, enquanto que os vetores OKS + c-Myc geraram linhagens com eficiência de cerca de 0,01%. Portanto, muitos detalhes compõem um cenário para

que haja a produção de linhagens estáveis e fidedignas e a grande quantidade de estudos realizados neste campo tem auxiliado a compreensão de como tornar possível a reprogramação em espécies de cervídeos.

4. CONCLUSÃO

Não foi possível obter linhagens de iPSC a partir de células multipotentes de *B. dichotomus*, independentemente da fonte de material utilizada (chifre, gordura, pele), componente usado no meio (SFB ou KOSR), vetores (transposon ou lentiviral) ou do método de entrega do material genético (eletroporação, lipofecção, lentiviral). Outras metodologias e principalmente outros fatores de transcrição exógenos devem ser testados visando à obtenção de iPSC em cervídeos. Entretanto, já se nota uma barreira adicional para a reprogramação nesta espécie devido à resistência em conseguir a entrada dos vetores nas células, observada por meio da expressão do gene repórter GFP.

5. REFERÊNCIAS

AOI, T.; YAE, K.; NAKAGAWA, M.; ICHISAKA, T.; OKITA, K.; TAKAHASHI, K.; CHIBA, T.; YAMANAKA, S. Generation of Pluripotent Stem Cells from Adult Mouse Liver and Stomach Cells. **Science**, v. 321, n. 5889, p. 699–702, 2008.

BRESSAN, F. F. **Geração de células pluripotentes através da indução gênica e transferência de núcleo: modelo bovino de aquisição de pluripotência**. 2013. 113 f. ,Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos – Universidade de São Paulo, 2013.

BREVINI, T. A. L.; ANTONINI, S.; CILLO, F.; CRESTAN, M.; GANDOLFI, F. Porcine embryonic stem cells: Facts, challenges and hopes. **Theriogenology**, v. 68, p. 206–213, 2007.

CHEN, J.; LIU, H.; LIU, J.; QI, J.; WEI, B.; YANG, J.; LIANG, H.; CHEN, Y.; CHEN, J.; WU, Y.; GUO, L.; ZHU, J.; ZHAO, X.; PENG, T.; ZHANG, Y.; CHEN, S.; LI, X.; LI, D.; WANG, T.; PEI, D. H3K9 methylation is a barrier during somatic cell reprogramming

into iPSCs. **Nature Genetics**, v. 45, n. 1, p. 34–42, 2013.

CHEN, Y. S.; PELEKANOS, R. A.; ELLIS, R. L.; HORNE, R.; WOLVETANG, E. J.; FISK, N. M. Small Molecule Mesengenic Induction of Human Induced Pluripotent Stem Cells to Generate Mesenchymal Stem/Stromal Cells. **Stem Cells Translational Medicine**, v. 1, n. 2, p. 83–95, 2012.

CHUNG, T.-L.; BRENA, R. M.; KOLLE, G.; GRIMMOND, S. M.; BERMAN, B. P.; LAIRD, P. W.; PERA, M. F.; WOLVETANG, E. J. Vitamin C Promotes Widespread Yet Specific DNA Demethylation of the Epigenome in Human Embryonic Stem Cells. **Stem Cells**, v. 28, n. 10, p. 1848–1855, 2010.

DUARTE, J. M. B.; VARELA, D.; PIOVEZAN, U.; BECCACECI, M. D.; GARCIA, J. E. **Blastocerus dichotomus - The IUCN Red List of Threatened Species**. . Acesso em: 1 out. 2015.

ESTEBAN, M. A.; WANG, T.; QIN, B.; YANG, J.; QIN, D.; CAI, J.; LI, W.; WENG, Z.; CHEN, J.; NI, S.; CHEN, K.; LI, Y.; LIU, X.; XU, J.; ZHANG, S.; LI, F.; HE, W.; LABUDA, K.; SONG, Y.; PETERBAUER, A.; WOLBANK, S.; REDL, H.; ZHONG, M.; CAI, D.; ZENG, L.; PEI, D. Vitamin C Enhances the Generation of Mouse and Human Induced Pluripotent Stem Cells. **Cell Stem Cell**, v. 6, n. 1, p. 71–79, 2010.

HAYASHI, K.; OGUSHI, S.; KURIMOTO, K.; SHIMAMOTO, S.; OHTA, H.; SAITOU, M. Offspring from Oocytes Derived from in Vitro Primordial Germ Cell-like Cells in Mice. **Science**, v. 338, n. 6109, p. 971–975, 2012.

HAYASHI, K.; OHTA, H.; KURIMOTO, K.; ARAMAKI, S.; SAITOU, M. Reconstitution of the Mouse Germ Cell Specification Pathway in Culture by Pluripotent Stem Cells. **Cell**, v. 146, n. 4, p. 519–532, 2011.

HIKABE, O.; HAMAZAKI, N.; NAGAMATSU, G.; OBATA, Y.; HIRAO, Y.; HAMADA, N.; SHIMAMOTO, S.; IMAMURA, T.; NAKASHIMA, K.; SAITOU, M.; HAYASHI, K. Reconstitution in vitro of the entire cycle of the mouse female germ line. **Nature**, v. 539, n. 7628, p. 299–303, 2016.

HOLT, W. V.; PICKARD, A. R. Role of reproductive technologies and genetic resource banks in animal conservation. **Reviews of Reproduction**, v. 4, p. 143–150, 1999.

IUCN. **The International Union for Conservation of Nature Red List of Threatened**

Species. Version 2015-4. . Acesso em: 1 jan. 2016.

KAWAGUCHI, T.; TSUKIYAMA, T.; KIMURA, K.; MATSUYAMA, S.; MINAMI, N.; YAMADA, M.; IMAI, H. Generation of Naïve Bovine Induced Pluripotent Stem Cells Using PiggyBac Transposition of Doxycycline-Inducible Transcription Factors. **PLOS ONE**, v. 10, n. 8, p. e0135403, 2015.

KIERDORF, U.; KIERDORF, H. Deer Antlers – A Model of Mammalian Appendage Regeneration: An Extensive Review. **Gerontology**, v. 57, n. 1, p. 53–65, 2011.

KIM, K.; DOI, A.; WEN, B.; NG, K.; ZHAO, R.; CAHAN, P.; KIM, J.; ARYEE, M. J.; JI, H.; EHRLICH, L. I. R.; YABUUCHI, A.; TAKEUCHI, A.; CUNNIFF, K. C.; HONGGUANG, H.; MCKINNEY-FREEMAN, S.; NAVEIRAS, O.; YOON, T. J.; IRIZARRY, R. A.; JUNG, N.; SEITA, J.; HANNA, J.; MURAKAMI, P.; JAENISCH, R.; WEISSLEDER, R.; ORKIN, S. H.; WEISSMAN, I. L.; FEINBERG, A. P.; DALEY, G. Q. Epigenetic memory in induced pluripotent stem cells. **Nature**, v. 467, n. 7313, p. 285–290, 2010.

LI, C.; YANG, F.; SHEPPARD, A. Adult Stem Cells and Mammalian Epimorphic Regeneration-Insights from Studying Annual Renewal of Deer Antlers. **Current Stem Cell Research & Therapy**, v. 4, n. 3, p. 237–251, 2009.

MA, H.; MOREY, R.; O'NEIL, R. C.; HE, Y.; DAUGHTRY, B.; SCHULTZ, M. D.; HARIHARAN, M.; NERY, J. R.; CASTANON, R.; SABATINI, K.; THIAGARAJAN, R. D.; TACHIBANA, M.; KANG, E.; TIPPNER-HEDGES, R.; AHMED, R.; GUTIERREZ, N. M.; VAN DYKEN, C.; POLAT, A.; SUGAWARA, A.; SPARMAN, M.; GOKHALE, S.; AMATO, P.; P.WOLF, D.; ECKER, J. R.; LAURENT, L. C.; MITALIPOV, S. Abnormalities in human pluripotent cells due to reprogramming mechanisms. **Nature**, v. 511, n. 7508, p. 177–183, 2014.

MAHERALI, N.; AHFELDT, T.; RIGAMONTI, A.; UTIKAL, J.; COWAN, C.; HOCHEDLINGER, K. A High-Efficiency System for the Generation and Study of Human Induced Pluripotent Stem Cells. **Cell Stem Cell**, v. 3, n. 3, p. 340–345, 2008.

MIURA, K.; OKADA, Y.; AOI, T.; OKADA, A.; TAKAHASHI, K.; OKITA, K.; NAKAGAWA, M.; KOYANAGI, M.; TANABE, K.; OHNUKI, M.; OGAWA, D.; IKEDA, E.; OKANO, H.; YAMANAKA, S. Variation in the safety of induced pluripotent stem cell

lines. **Nature Biotechnology**, v. 27, n. 8, p. 743–745, 2009.

NAGY, K.; SUNG, H.-K.; ZHANG, P.; LAFLAMME, S.; VINCENT, P.; AGHAMOHAMMADI, S.; WOLTJEN, K.; MONETTI, C.; MICHAEL, I. P.; SMITH, L. C.; NAGY, A. Induced Pluripotent Stem Cell Lines Derived from Equine Fibroblasts. **Stem Cell Reviews and Reports**, v. 7, n. 3, p. 693–702, 2011.

NANDAL, A.; TELUGU, B. P. V. L. **Large animal induced pluripotent stem cells as models of human diseases**. [s.l.] Springer, 2014.

NIE, T.; DENG, W.; GAO, X.; SUN, W.; HUI, X.; SONG, H.; QIN, D.; XU, A.; LI, P.; LIU, P.; LAI, L.; WU, D. Reprogramming mature terminally differentiated adipocytes to induced pluripotent stem cells. **Science Bulletin**, v. 60, n. 20, p. 1752–1758, 2015.

PESSÔA, L. V. F. **Estudo do potencial de pluripotência de células-tronco equinas derivadas de tecido adulto e cordão umbilical submetidas à reprogramação induzida geneticamente (células ips)**. 2016. Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Pirassununga, 2016.

POLO, J. M.; ANDERSSSEN, E.; WALSH, R. M.; SCHWARZ, B. A.; NEFZGER, C. M.; LIM, S. M.; BORKENT, M.; APOSTOLOU, E.; ALAEI, S.; CLOUTIER, J.; BAR-NUR, O.; CHELOUFI, S.; STADTFELD, M.; FIGUEROA, M. E.; ROBINSON, D.; NATESAN, S.; MELNICK, A.; ZHU, J.; RAMASWAMY, S.; HOCHEDLINGER, K. A Molecular Roadmap of Reprogramming Somatic Cells into iPS Cells. **Cell**, v. 151, n. 7, p. 1617–1632, 2012.

ROLF, H. J.; KIERDORF, U.; KIERDORF, H.; SCHULZ, J.; SEYMOUR, N.; SCHLIEPHAKE, H.; NAPP, J.; NIEBERT, S.; WÖLFEL, H.; WIESE, K. G. Localization and Characterization of STRO-1+ Cells in the Deer Pedicle and Regenerating Antler. **PLoS ONE**, v. 3, n. 4, p. e2064, 2008.

STADTFELD, M.; APOSTOLOU, E.; FERRARI, F.; CHOI, J.; WALSH, R. M.; CHEN, T.; OOI, S. S. K.; KIM, S. Y.; BESTOR, T. H.; SHIODA, T.; PARK, P. J.; HOCHEDLINGER, K. Ascorbic acid prevents loss of Dlk1-Dio3 imprinting and facilitates generation of all-iPS cell mice from terminally differentiated B cells. **Nature Genetics**, v. 44, n. 4, p. 398–405, 2012.

SUMER, H.; LIU, J.; MALAVER-ORTEGA, L. F.; LIM, M. L.; KHODADADI, K.; VERMA,

- P. J. NANOG is a key factor for induction of pluripotency in bovine adult fibroblasts. **Journal of Animal Science**, v. 89, n. 9, p. 2708–2716, 2011.
- TALBOT, N. C.; BLOMBERG, L. A. The Pursuit of ES Cell Lines of Domesticated Ungulates. **Stem Cell Reviews**, v. 4, n. 3, p. 235–254, 2008.
- TALLURI, T. R.; KUMAR, D.; GLAGE, S.; GARRELS, W.; IVICS, Z.; DEBOWSKI, K.; BEHR, R.; NIEMANN, H.; KUES, W. A. Derivation and Characterization of Bovine Induced Pluripotent Stem Cells by Transposon-Mediated Reprogramming. **Cellular Reprogramming**, v. 17, n. 2, p. 131–140, 2015.
- TAT, P. A.; SUMER, H.; JONES, K. L.; UPTON, K.; VERMA, P. J. The Efficient Generation of Induced Pluripotent Stem (iPS) Cells From Adult Mouse Adipose Tissue-Derived and Neural Stem Cells. **Cell Transplantation**, v. 19, n. 5, p. 525–536, 2010.
- TSUKIYAMA, T.; YASUHIDE, O. A Modified EpiSC Culture Condition Containing a GSK3 Inhibitor Can Support Germline-Competent Pluripotency in Mice. **PLoS ONE**, v. 9, n. 4, p. e95329, 2014.
- VERMA, R.; HOLLAND, M. K.; TEMPLE-SMITH, P.; VERMA, P. J. Inducing pluripotency in somatic cells from the snow leopard (*Panthera uncia*), an endangered felid. **Theriogenology**, v. 77, n. 1, p. 220–228, 2012.
- VERMA, R.; LIU, J.; HOLLAND, M. K.; TEMPLE-SMITH, P.; WILLIAMSON, M.; VERMA, P. J. Nanog Is an Essential Factor for Induction of Pluripotency in Somatic Cells from Endangered Felids. **BioResearch Open Access**, v. 2, n. 1, p. 72–76, 2013.
- WANG, T.; CHEN, K.; ZENG, X.; YANG, J.; WU, Y.; SHI, X.; QIN, B.; ZENG, L.; ESTEBAN, M. A.; PAN, G.; PEI, D. The Histone Demethylases Jhdm1a/1b Enhance Somatic Cell Reprogramming in a Vitamin-C-Dependent Manner. **Cell Stem Cell**, v. 9, n. 6, p. 575–587, 2011a.
- WANG, W.; YANG, J.; LIU, H.; LU, D.; CHEN, X.; ZENONOS, Z.; CAMPOS, L. S.; RAD, R.; GUO, G.; ZHANG, S.; BRADLEY, A.; LIU, P. Rapid and efficient reprogramming of somatic cells to induced pluripotent stem cells by retinoic acid receptor gamma and liver receptor homolog 1. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 45, p. 18283–18288, 2011b.
- WEBER, M.; GONZALEZ, S. Latin American deer diversity and conservation: A review

of status and distribution. **Écoscience**, v. 10, n. 4, p. 443–454, 2003.

WEST, F. D.; TERLOUW, S. L.; KWON, D. J.; MUMAW, J. L.; DHARA, S. K.; HASNEEN, K.; DOBRINSKY, J. R.; STICE, S. L. Porcine Induced Pluripotent Stem Cells Produce Chimeric Offspring. **Stem Cells and Development**, v. 19, n. 8, p. 1211–1220, 2010.

WILDT, D. E. Strategies for the practical application of reproductive technologies to endangered species. **Zoo Biology**, v. 8, n. S1, p. 17–20, 1989.

ZHAO, X. Establishment of Highly Efficient Somatic Cell Reprogramming System to Generate iPSC Lines. In: **Studies of Pluripotency in Embryonic Stem Cells and Induced Pluripotent Stem Cells**. [s.l.] Springer, 2014. p. 41–52.

ZHOU, Q.; WANG, M.; YUAN, Y.; WANG, X.; FU, R.; WAN, H.; XIE, M.; LIU, M.; GUO, X.; ZHENG, Y.; FENG, G.; SHI, Q.; ZHAO, X.-Y.; SHA, J.; ZHOU, Q. Complete Meiosis from Embryonic Stem Cell-Derived Germ Cells In Vitro. **Cell Stem Cell**, v. 18, n. 3, p. 330–340, 2016.

CAPÍTULO 4 – Uso de células multipotentes de cervo-do-pantanal para induzir a diferenciação em células semelhantes as germinativas primordiais – dados preliminares

RESUMO – O cervo-do-pantanal é uma espécie que se encontra sob risco de extinção. A criopreservação de gametas e embriões é de extrema importância para a manutenção de diversidade genética em pequenas populações selvagens, porém estes materiais são de difícil obtenção. As células-tronco adultas são de fácil obtenção, e devido a sua plasticidade são ótimas candidatas para realizar a diferenciação em outros tipos celulares. No experimento 1, foram conduzidos testes para diferenciar células-tronco adultas de chifre, gordura e pele em células semelhantes as germinativas primordiais (PGCLs) utilizando a metodologia conforme anteriormente descrita para células pluripotentes. No experimento 2, por meio da adição de ácido retinoico (RA), BMP4 ou ambos em sistemas de cultivo em adesão ou suspensão, procuramos identificar os fatores que favorecem a diferenciação destas células-tronco adultas em PGCLs. As células responderam a estímulos morfológicos, adquirindo formato semelhante ao das células germinativas primordiais verdadeiras, e no experimento 1 foi verificado aumento na expressão de genes relacionados a células germinativas para células obtidas de gordura e pele.

Palavras-chave: ácido retinoico, *Blastocerus dichotomus*, BMP4, cervídeos, cultivo em suspensão

CHAPTER 4 - Use of multipotent stem cells of marsh deer to induce differentiation into primordial germ cell-like cells (PGCLs) – preliminary data

ABSTRACT – The marsh deer is a species at risk of extinction. The cryopreservation of gametes and embryos is extremely important for the maintenance of genetic diversity in small wild populations, but these materials are difficult to obtain. Adult stem cells are easy to obtain, and due to their plasticity are great candidates to perform the differentiation into other cell types. In experiment 1, tests were conducted to differentiate adult stem cells of antler, fat and skin into PGCLs using the previously described methodology for pluripotent stem cells. In Experiment 2, by adding retinoic acid (RA), bone morphogenic protein-4 (BMP4) or both in adherent or suspension culture systems, we sought to identify the factors that favor the differentiation of these adult stem cells into PGCLs. The cells responded to morphogenic stimuli, acquiring cell forms similar to the true primordial germ cells. Moreover, an increase in the expression of genes related to germ cell for cells were obtained from fat and skin in experiment 1.

Keywords: *Blastocerus dichotomus*, BMP4, retinoic acid, suspension culture.

CAPÍTULO 4 – Uso de células multipotentes de cervo-do-pantanal para induzir a diferenciação em células semelhantes as germinativas primordiais – dados preliminares

1. INTRODUÇÃO

O cervo-do-pantanal (*Blastocerus dichotomus*) têm sofrido pressões sobre seu habitat, o que provoca segregação entre populações, diminuição de troca gênica e de diversidade genética, aumento da endogamia e, conseqüentemente, maior risco de extinção (DUARTE, 2005). Esta é uma espécie classificada como vulnerável (VU) pela lista vermelha da IUCN (DUARTE et al., 2008). A preservação da diversidade genética é um dos pilares para a conservação de espécies ameaçadas, e uma das formas de mantê-la é por meio da criação de populações em cativeiro. A propagação dos indivíduos em cativeiro é complexa e demanda conhecimento e recursos. Para um manejo genético correto, muitas vezes se faz necessária a transferência de indivíduos entre instituições, visando o acasalamento que retenha o máximo de variabilidade genética da população manejada. Entretanto, o transporte de indivíduos é bastante oneroso e também perigoso, podendo levar os animais a graves injúrias.

A fim de minimizar estes efeitos, a construção dos bancos de germoplasma (esperma, oócitos, embriões, fibroblastos, etc.) e as biotecnologias de reprodução assistida são ferramentas interessantes (WILDT, 1989; HOLT; PICKARD, 1999). Entretanto, a obtenção de gametas e embriões para compor estes bancos envolvem o desenvolvimento de protocolos hormonais e de colheita específicos, e que necessitam da contenção química dos animais sucessivas vezes. Devido a falta de conhecimento básico da fisiologia reprodutiva, a colheita de material destes indivíduos muitas vezes resulta em falha ou baixa obtenção. A aplicação de tecnologias que possibilitem propagar indivíduos a partir de materiais obtidos da forma menos invasiva possível e formem bancos de germoplasma representativos da diversidade genética da população, ou seja, com contribuição de material genético de muitos indivíduos, é bastante interessante para espécies ameaçadas.

Devido a facilidade na obtenção e criopreservação de tecidos e células, estas fontes de material biológico são consideradas muito promissoras. Além disso,

diferentemente do que ocorre utilizando-se células haplóides, com as células diploides é possível que todos os alelos do indivíduo sejam retidos, maximizando a manutenção da diversidade genética. As células-tronco multipotentes podem ser obtidas a partir de tecidos de indivíduos adultos, sendo adquiridas de forma simples e minimamente invasiva. Possuem características interessantes, tais como a elevada taxa de proliferação e potencial para se diferenciar em vários tipos de tecidos (YEW et al., 2011). Estudos tem mostrado que estas células são capazes de se diferenciarem não só em linhagens da mesoderme, mas também da ectoderme e endoderme (HUANG et al., 2010; ANTONUCCI et al., 2011; MAMIDI et al., 2011; DING et al., 2015).

Desta maneira, alguns trabalhos exploraram a capacidade das células multipotentes em se diferenciarem diretamente em células semelhantes às germinativas (NAYERNIA et al., 2006; HUA et al., 2009, 2011; HUANG et al., 2010; MAKOOLATI; MOVAHEDIN; FOROUZANDEH-MOGHADAM, 2011; MAZAHERI et al., 2011; SHIRAZI et al., 2012; HOSSEINZADEH SHIRZEILY et al., 2013; JOUNI et al., 2014; LI et al., 2014) ou ainda células semelhantes a oócitos (DANNER et al., 2006; SONG et al., 2011; QIU et al., 2013; YU et al., 2014). Ainda, alguns desses estudos realizaram o transplante das células semelhantes as germinativas para o testículo de receptores, possibilitando a colonização dos túbulos seminíferos por estas células em ovinos (GHASEMZADEH-HASANKOLAEI; ESLAMINEJAD; SEDIGHI-GILANI, 2016) e até mesmo produzindo espermatogônias em camundongos (NAYERNIA et al., 2006). Para realizar essa diferenciação, a maioria destes trabalhos utilizaram ácido retinóico (RA), proteína morfogênica de osso 4 (“bone morphogenic protein 4” - BMP4) ou TGF β 1 e, dentre as linhagens testadas para a diferenciação, encontram-se células provenientes da gordura, medula óssea, pele, tecido ovariano, pulmão, fígado, cordão umbilical e pâncreas.

Comparado ao cultivo convencional das células mesenquimais (MSC) que é realizado pela monocamada de células aderidas, o cultivo de células em suspensão tridimensional oferece um nicho celular que é considerado mais parecido ao microambiente *in vivo* (MARX, 2013). Estudos prévios demonstraram que o cultivo de MSC em suspensão formam agregados celulares que auxiliam as células a manter sua plasticidade e leva a sua diferenciação a um estado mais primitivo. Isso confere às células aumento na expressão dos marcadores de pluripotência, bem como

aumenta o potencial de diferenciação destas células (ALIMPERTI et al., 2014; GUO et al., 2014; MURPHY; FANG; LEACH, 2014; LI et al., 2015; ZHANG et al., 2015). Assim, seria interessante avaliar se o cultivo em suspensão poderia auxiliar na diferenciação de células-tronco multipotentes em células semelhantes as germinativas primordiais (PGCLs), quando comparado ao uso do cultivo em aderência.

Outra questão importante é que, uma vez que foi determinada a alta plasticidade destas células-tronco adultas, seria interessante testar metodologias que foram anteriormente descritas para diferenciarem células pluripotentes (células-tronco embrionárias e de pluripotência induzida) em PGCLs. Nestes trabalhos foi possível gerar PGCLs que após serem transplantadas para receptores, completaram a meiose *in vivo*, e possibilitaram o nascimento de indivíduos saudáveis (HAYASHI et al., 2011, 2012), ou ainda gerar indivíduos saudáveis após etapas adicionais em cultivo que permitiram realizar a meiose e diferenciação inteiramente *in vitro* (HIKABE et al., 2016; ZHOU et al., 2016).

Assim, o objetivo deste trabalho foi procurar identificar fatores que favoreçam a diferenciação de células multipotentes de cervo-do-pantanal em células semelhantes às germinativas primordiais (PGCLs) e desenvolver técnicas eficientes para sua produção.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Obtenção das biópsias

As biópsias foram obtidas de animais pertencentes ao Centro de Conservação do Cervo-do-Pantanal (CCCP) de Promissão – SP, Brasil e Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos (NUPECCE) do Departamento de Zootecnia da FCAV - UNESP, Jaboticabal – SP, Brasil. Para a obtenção das amostras, os animais foram anestesiados pela via intramuscular com a associação de 7,0 mg/Kg de cloridrato de quetamina (Vetaset® - Fort Dodge - Brasil) e 1 mg/Kg de cloridrato de xilazina (Rompum® - Bayer - Brasil) aplicados por dardos disparados por arma anestésica.

A biópsia de chifre foi obtida de três machos que durante o período experimental apresentaram a troca de chifres, sendo colhida da área 0,5 cm abaixo

do topo dos chifres após cerca de 45-60 dias do início de seu crescimento. A pele foi obtida de dois animais (1 macho e 1 fêmea) da parte interna da coxa, e as amostras do tecido adiposo foram obtida de duas fêmeas da região lateral a orelha, abaixo da cartilagem. A obtenção de gordura deste local inédito se deveu à impossibilidade de obtenção do tecido a partir de outras regiões de acesso fácil e seguro como, por exemplo, próximo à região caudal ou abdominal, comumente encontradas em outras espécies.

2.2. Isolamento das células-tronco multipotentes

Após a realização das biópsias, o material foi armazenado em criotubo contendo solução McCoy's (Sigma, M4892) e mantido sob refrigeração em isopor. Ao chegar no laboratório, os tecidos foram lavados quatro vezes em PBS, e foi realizado o isolamento das células pela desagregação mecânica do tecido em pedaços de cerca de 2 mm utilizando lâmina de bisturi, seguido de digestão enzimática com colagenase I (200 U/ml – Sigma) a 37°C por um período de 3 horas para a pele e chifre e de 30 minutos para gordura. Após a digestão enzimática as células foram centrifugadas por 5 min a 200 G, foi retirado todo o sobrenadante e adicionado 10 mL de meio de cultivo completo (Dulbecco's modified Eagle's minimal essential medium (DMEM) com altas taxas de glicose (4,5 g/l), glutamina (0,6 g/l), 1% de aminoácidos essenciais, soro fetal bovino (SFB) na proporção de 10% v/v, 50 mg L⁻¹ de Sulfato de Gentamicina e 2 mg L⁻¹ de Anfotericina B). A amostra foi novamente centrifugada por 5 min a 200 G, e o sobrenadante foi descartado. O pellet foi ressuspenso em 5 mL de meio de cultivo completo contendo 50% de SFB.

2.3. Cultivo de células-tronco multipotentes

Para selecionar células multipotentes foi utilizado o método de adesão celular. As amostras foram acondicionadas em garrafas de cultivo (25 cm² de área de superfície) e mantidas em estufa à 5% de CO₂ a 37°C. A troca de meio foi realizada 48 horas após o plaqueamento inicial para a remoção de células não aderentes ao frasco e para a manutenção do cultivo, o meio foi trocado duas vezes por semana utilizando o meio de cultivo completo com 10% de SFB. As garrafas de cultivo foram

subcultivadas até alcançarem cerca de 80% de confluência, sendo então destacadas utilizando 0,25% tripsina/EDTA. As células (segunda ou terceira passagem) foram criopreservadas em meio composto de 80% de SFB, 10% de dimetilsulfóxido (DMSO), 10% de DMEM, 100 unidades/ml de penicilina e 100 µg/ml estreptomicina, e criopreservadas pelo método de resfriamento lento (4 horas a 4°C; 30 minutos em vapor de nitrogênio e posteriormente imersas em nitrogênio líquido) sendo mantidas em nitrogênio líquido até o momento de realizar os experimentos. Estas células foram descongeladas em banho-maria a 37°C e cultivadas, sendo utilizadas células da quarta e quinta passagem nos experimentos a seguir.

2.4. Experimento 1

Para este experimento foram utilizadas uma linhagem de células do chifre, uma de células de gordura e duas de células da pele. O protocolo de diferenciação de células multipotentes em células similares a células germinativas primordiais (PGCLs) foi realizado em etapas, seguindo o protocolo inicialmente proposto para células pluripotentes por Hayashi et al. (2011) e Hayashi, Saitou e Yamanaka (2012). Primeiramente, as células multipotentes passaram por uma pré-indução a um estado similar ao de epiblasto (EpiLCs) e num segundo passo, diferenciadas em PGCLs.

2.4.1. Indução das células multipotentes em EpiLCs

Foi realizado o plaqueamento de 1×10^5 células em uma placa de fibronectina (16,7ug/ml) em meio de cultivo N2B27 suplementado com activina A (20 ng/ml), fator de crescimento de fibroblastos (bFGF -12ng/ml) e substituto de soro knockout (KOSR - 1%), sendo o meio trocado uma vez por dia por dois dias.

2.4.2. Indução das EpiLCs em PGCLs em sistema de cultivo em suspensão

As EpiLCs da fase anterior foram destacadas das placas utilizando Tryple (Gibco, Life Technologies), e foram induzidas ao estado de PGCLs utilizando o cultivo em suspensão em placas Agreewell 400 (Stem Cell Technologies), específicas para a geração de corpos embrioides e esferas neuronais. Estas células foram mantidas

em meio de cultivo composto por GMEM suplementado com 15% KOSR, 0,1mM NEAA, 1mM de piruvato de sódio, 0,1mM 2-mercaptoetanol, 2mM L-glutamina e 1% penicilina-estreptomicina na presença das citocinas BMP4 (500ng/ml), SCF (100 ng/ml), BMP8b (500ng/ml) e EGF (50ng/ml) por 4 dias.

Após este período, as PGCLs foram coletadas e metade delas foi fixada em paraformaldeído 4% durante 15 minutos, sendo mantidos sob refrigeração (4°C) em PBS para posteriormente realizar a imunocitoquímica, e a outra metade foi lavada em PBS e coletadas para serem mantidas a -80°C até o momento da extração de RNA das amostras.

2.4.3. Imunofluorescência

Para análise das supostas PGCLs foram testados os anticorpos DDX4 (ab13840) e DAZL (Sc27333). Com o auxílio de um estereomicroscópio as PGCLs foram transferidas para um poço contendo solução de lavagem (PBS, Tween 0,1%, BSA 0,01%) por 10 minutos sendo, em seguida, permeabilizadas (PBS e Triton X 1%) por 10 minutos. Foram novamente lavadas para então serem incubadas em solução de bloqueio (PBS e BSA 10%) por 1 hora. Após este período, foram lavadas e submetidas à incubação com o anticorpo primário na diluição de 1:100 “*overnight*” a 4°C.

O anticorpo secundário (AlexaFluor 488 anti-rabbit (a11034) ou anti-goat (A11078)) foi incubado na concentração de 1:1000 por 2 horas em temperatura ambiente sob proteção da luz. Na sequência, mais uma lavagem foi realizada, e o corante Hoescht para visualização nuclear foi adicionado na concentração de 1:1000 e incubado por 5 minutos em temperatura ambiente. As PGCLs foram transferidas para solução de PBS e analisadas por microscopia de fluorescência. Foram também produzidos controles negativos onde as PGCLs foram incubadas nos anticorpos secundários, mas não nos primários.

2.4.4. Extração de RNA total e RT-qPCR

O RNA das PGCLs e de suas linhagens controle (células de chifre, gordura e pele que não passaram pelo tratamento) foi extraído utilizando o kit RNeasy Mini Kit

(Qiagen) de acordo com o protocolo do fabricante, e tratado com DNase I (Qiagen) e RNase OUT (Qiagen). O cDNA foi produzido utilizando o kit High Capacity cDNA RT (AppliedBiosystems), e uma amostra sem cDNA para cada um dos genes estudados foi utilizada como controle negativo. As análises de RT-qPCR foram realizadas utilizando Power SYBR Green (AppliedBiosystems) e os genes HPRT e RPL13 foram utilizados como “*housekeeping*”. Os primers utilizados para este trabalho foram desenhados especificamente para cervo-do-pantanal. Para isso, sequencias disponíveis no NCBI de outras espécies dos genes de interesse foram alinhadas e por homologia entre espécies, primers foram elaborados e testados em amostras de DNA de cervo-do-pantanal por PCR. O produto obtido foi corrido em gel de agarose 1% e as bandas do gel foram individualizadas, digeridas e purificadas, sendo então sequenciadas. Os produtos de sequenciamento foram inseridos no Blast (NCBI) para confirmação de que se tratavam do gene de interesse. Uma vez determinada a sequência do gene de interesse, elas foram clonadas, sequenciadas e alinhadas. A partir das sequencias obtidas foram construídos os primers específicos para nossa espécie com auxílio do programa Oligo6 (Tabela 1).

Tabela 1 - Primers utilizados para análise de RT-qPCR.

Gene	Primer	Hibridização
RPL13	Forward: GGGCTTCAGCCTGGAGGAGC	60°C
	Reverse: CTTGGAGCGGTATTCCTTGAGC	
HPRT	Forward: CCAGTCAACAGGCGAGATAAA	60°C
	Reverse: CTTCGAGGGGTCCTTTTCACC	
Oct4	Forward: GTCCGAGTGTGGTTCTGCAAC	60°C
	Reverse: GGCGCCAGAGGAGAGGATACG	
Stella	Forward: ATCTCTGCTCACTCAACACCGTT	60°C
	Reverse: TCTCAACCCTAGTATCAAGTTGCC	
Stra8	Forward: ATATGTGGCAGATCCTCTCGGAG	60°C
	Reverse: GGGATAGGACCCCATGAGGC	
Ddx4	Forward: GAGCAAGCTCTTGGAGATTTCC	60°C
	Reverse: CTCCAAGCATCCCCAAACT	
Fragilis	Forward: CTGCGATGACCAACCACAT	60°C
	Reverse: CCCTAGACTTCACGGAGCG	

2.5. Experimento 2

Para este experimento o intuito foi verificar influência dos tipos de cultivo (adesão ou suspensão) e a ação das substâncias BMP4 e RA sob as células multipotentes e sua possível diferenciação em PGCLs.

2.5.1. Grupos de tratamento para a diferenciação de células multipotentes

Células das passagens 4-5 foram utilizadas. Para o tratamento de células em adesão cerca de 1×10^6 células viáveis foram utilizadas para cada grupo e depositadas em garrafas de 75 cm². Para as células do tratamento em suspensão utilizamos a técnica de “*hanging drop*”, e foram utilizadas $2,5 \times 10^6$ células por grupo, sendo elas distribuídas em 15 gotas de 25ul/gota em placas de 60mm.

O meio controle corresponde ao que é usualmente utilizado para o cultivo de células aderentes (DMEM, 10% SFB, 50U/mL pen/strep). Já o meio base é composto por DMEM com altas taxas de glicose (#12800-017 Gibco), 15% KOSR (Gibco), 0,1mM β -mercaptoethanol, 0,1mM aminoácidos não-essenciais, 1mM piruvato de sódio, 50U/ml penicilina/streptomina. Os demais grupos são compostos pelo meio base em adição ao RA, BMP4 ou ambos. Estes cinco meios foram testados tanto nas células aderentes quanto do sistema de cultivo em suspensão, como descrito na Tabela 2.

Tabela 2 – Grupos de tratamento a que foram submetidas as células multipotentes de cervo-do-pantanal

Grupo	Tipo de cultivo	Meio
Controle Ade	Adesão	DMEM, 10% SFB, 50U/mL Pen/Strep
MB Ade	Adesão	Meio Base*
RA Ade	Adesão	Meio Base* e 10^{-5} M RA
BMP4 Ade	Adesão	Meio Base* e 12,5 ng de BMP4
RA+BMP4 Ade	Adesão	Meio Base* 10^{-5} M RA e 12,5 ng de BMP4
Controle S	Suspensão	DMEM (#), 10% SFB, 100x Anti-anti
MB S	Suspensão	Meio Base*
RA S	Suspensão	Meio Base* e 10^{-5} M RA
BMP4 S	Suspensão	Meio Base* e 12,5 ng de BMP4
RA+BMP4 S	Suspensão	Meio Base* 10^{-5} M RA e 12,5 ng de BMP4

*Meio base: DMEM com altas taxas de glicose (#12800-017 Gibco), 15% KOSR (Gibco), 0,1mM β -mercaptoethanol, 0,1mM NEAA, 1mM piruvato de sódio, 50U/ml penicilina/streptomina.

O tratamento foi realizado por 7 dias, sendo que no 3° e no 5° dia o meio foi trocado. No caso do sistema por adesão, no 5° dia foram adicionados mais 3 mL de meio ao invés de realizar a troca, uma vez que parte das células começaram a se destacar das garrafas em alguns dos grupos de cultivo. Após o tratamento, foi utilizado o Tryple (Gibco) para destacar as células das garrafas no caso das células em adesão e para tentar desagregar as esferas formadas no caso das células em suspensão, utilizando o vortex em conjunto. Posteriormente, as células foram lavadas com PBS, centrifugadas e congeladas em nitrogênio líquido (-196°C), sendo mantidas até o momento da extração de RNA.

2.5.2. RT-qPCR para genes marcadores de células germinativas

Para as células em adesão o RNA foi extraído utilizando o RNeasy Mini Kit (Qiagen) de acordo com o protocolo do fabricante, e tratado com DNase I (Qiagen) e RNase OUT (Qiagen). Entretanto, para as células em suspensão não foi possível realizar a extração. Inicialmente tentou-se o mesmo protocolo utilizado para as células em adesão, utilizando o RNeasy Mini Kit e, posteriormente, outro protocolo descrito a seguir: foi adicionado a cada uma das amostras o mix contendo 900 µL de trizol, 10 µL de acrilamida e 90 µL de água MiliQ por 5 minutos em temperatura ambiente. Posteriormente 200 µL de clorofórmio foram adicionados e deixados por 3 minutos.

As amostras foram centrifugadas (12000 G por 15 minutos á 4°C) e a parte aquosa contendo o RNA foi passada para um novo tubo. Foram acrescentados 500 µL de álcool isopropílico 100% (4°C), aguardando por 10 minutos em temperatura ambiente e, posteriormente, incubando por 2 horas a -80°C. Após esse período as amostras foram descongeladas em temperatura ambiente e centrifugadas (12000 G por 10 min á 4°C). O sobrenadante foi removido, deixando o pellet contendo RNA. Foi acrescentando a ele 1mL de etanol 75%, homogeneizando a amostra com o vortex sendo, posteriormente, centrifugado (7500 G por 5 minutos á 4°C). O sobrenadante foi retirado e aguardou-se a evaporação de todo álcool. O RNA foi ressuspenso em 20 µL de água livre de RNase, e incubado a 55-60°C por 10 minutos.

3. RESULTADOS

3.1. Experimento 1

3.1.1. Morfologia

Foi possível a obtenção de PGCLs para os três tipos de tecido de cervo-do-pantanal por meio da técnica testada (Figura 1). Morfologicamente, as PGCLs obtidas das linhagens de gordura e pele foram mais estruturadas em relação as obtidas a partir dos chifres, onde foi notado que houve uma parte das células aderidas a placa. O chifre também foi a linhagem onde as PGCLs foram, em geral, visualmente menores, e para gordura encontramos as maiores estruturas.

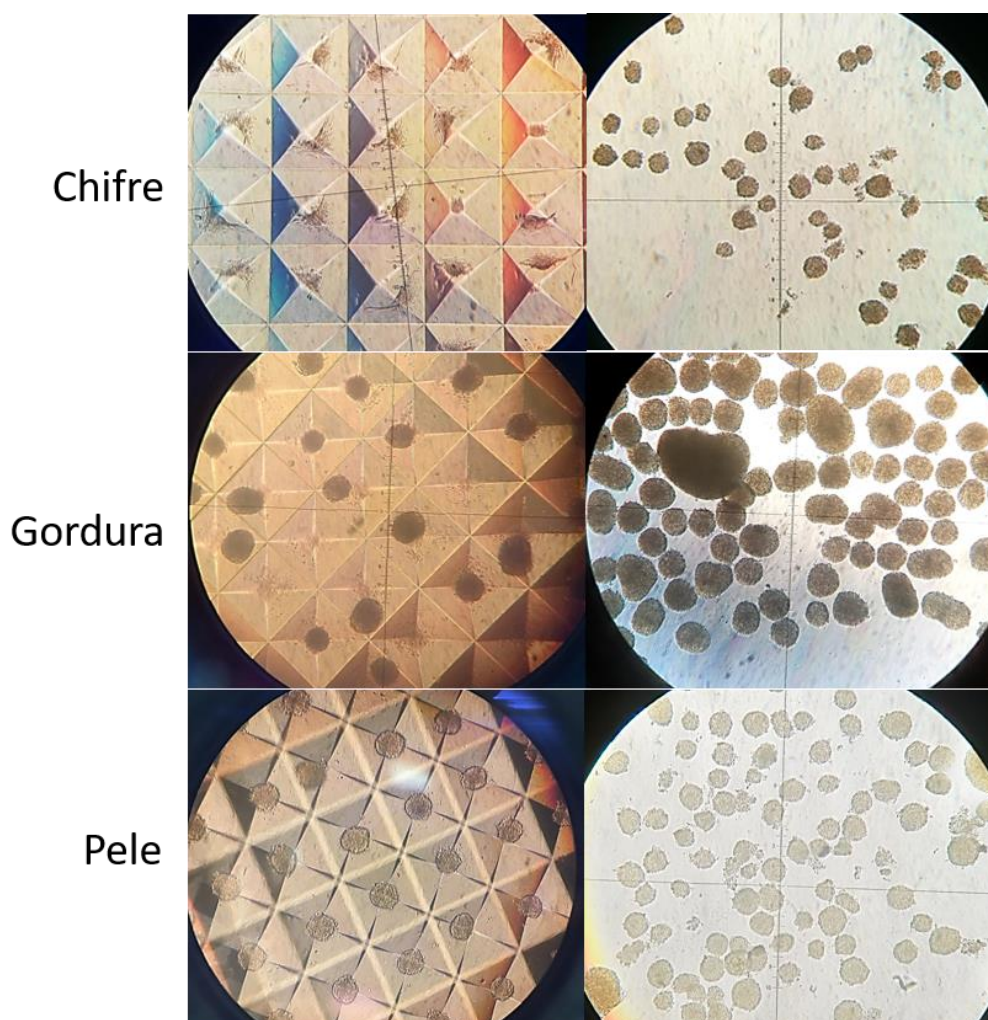


Figura 1 – Fotomicrografia das linhagens celulares de cervo-do-pantanal após diferenciação em PGCLs. A esquerda as PGCLs encontram-se nas placas de cultivo 3D e a direita são vistas após sua retirada.

3.1.2. Imunocitoquímica

As PGCLs foram fortemente marcadas para a proteína de Ddx4 para os três tipos celulares testados. Já para Dazl, somente uma das duas linhagens de pele testadas obteve fraca marcação nas bordas (Figura 2).

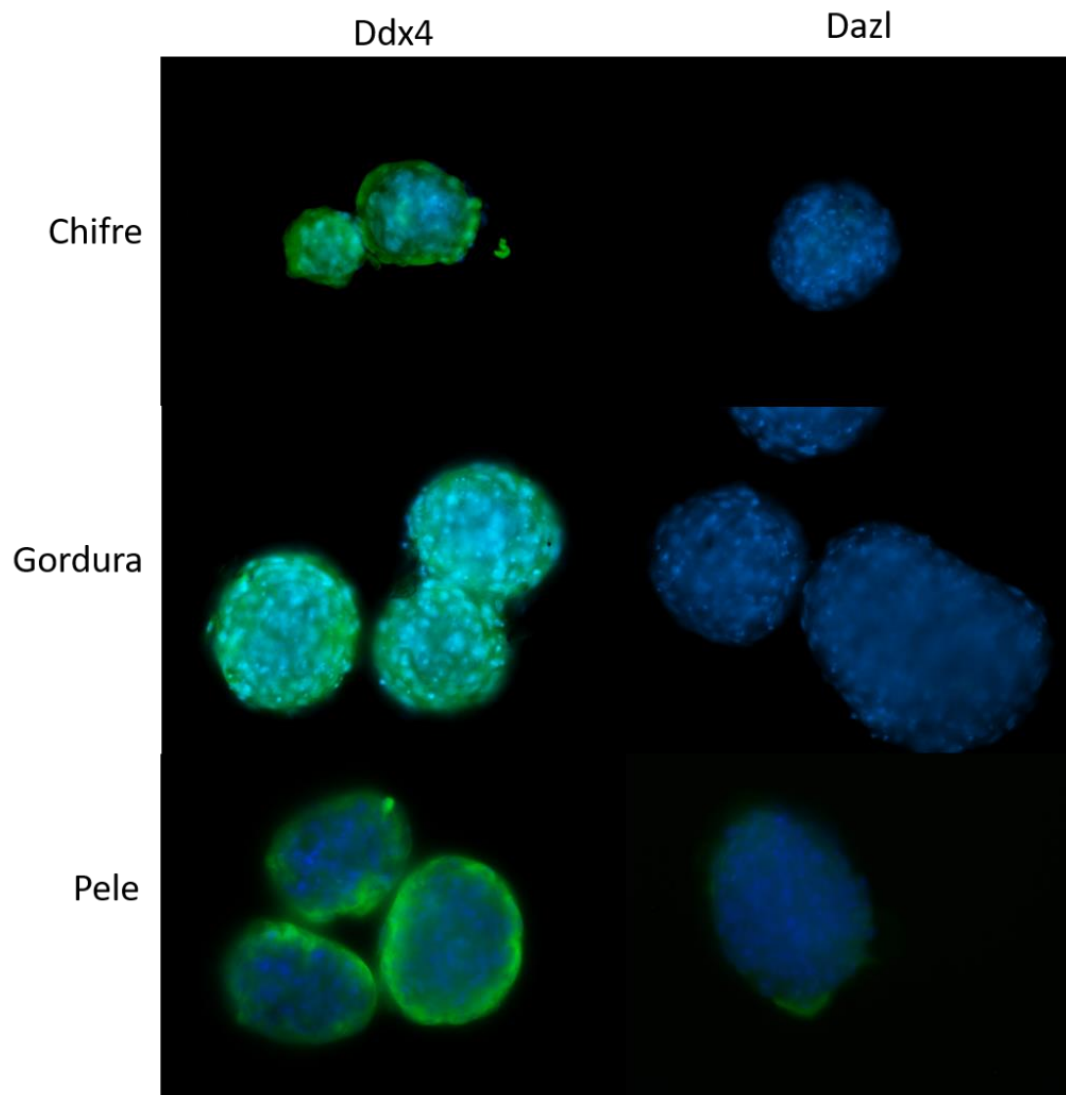


Figura 2 – Fotomicrografia da imunocitoquímica realizada para as proteínas de Ddx4 e Dazl nas PGCLs de linhagens multipotentes de cervo-do-pantanal.

3.1.3. RT-qPCR para expressão de marcadores de células germinativas

Houve a identificação da expressão de alguns genes relacionados as células germinativas nas amostras controle (Figura 3). Após diferenciação em PGCLs, a maioria das linhagens obteve aumento na expressão destes genes. O chifre foi o tipo celular que apresentou pior desempenho, tendo um aumento apenas para o gene Stella, havendo queda ou ausência de expressão para todos os demais transcritos testados. Células provenientes da gordura mostraram altos níveis de transcrição para Fragilis e Stella em comparação aos demais grupos. Já as células de pele, apresentaram melhores níveis de expressão para os transcritos Ddx4 e Stra8 em relação aos demais.

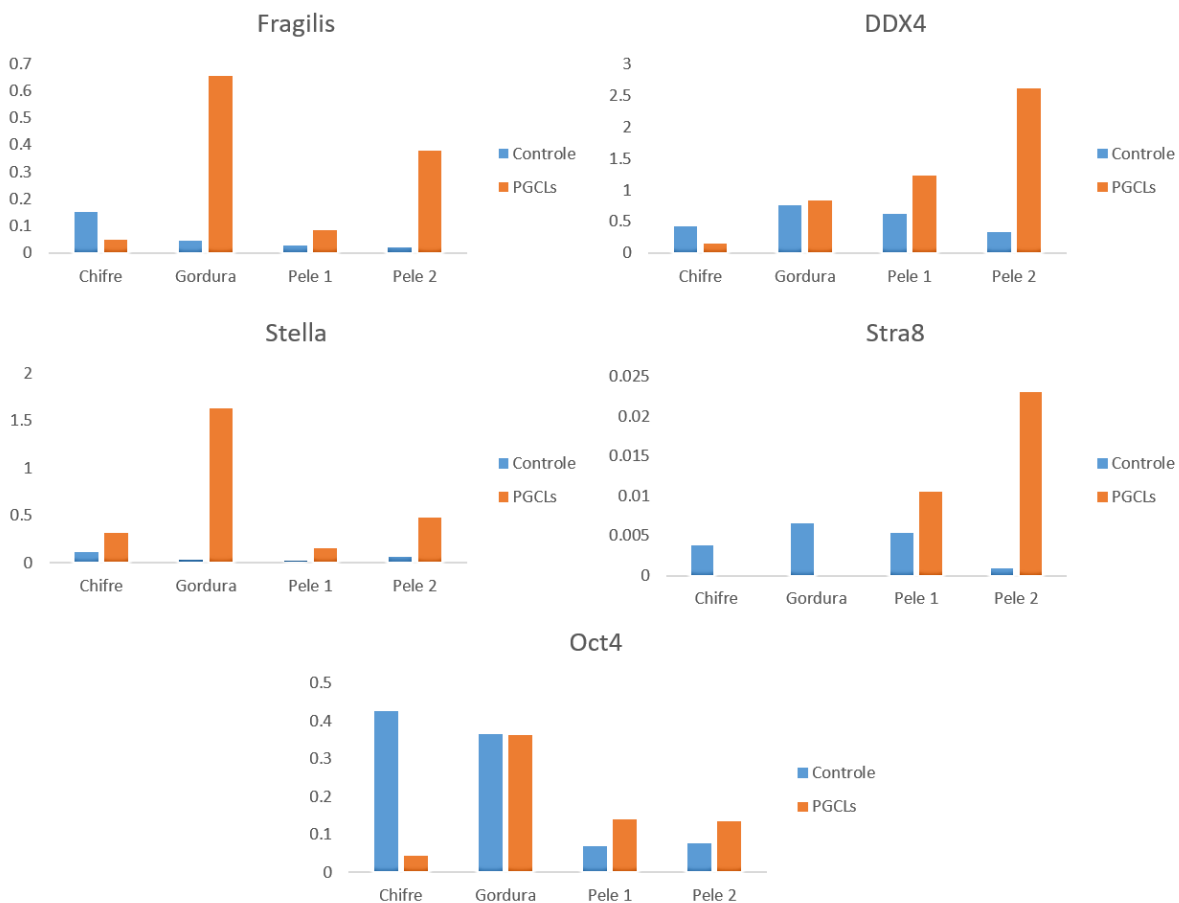


Figura 3 – Análise da expressão gênica por RT-qPCR para genes relacionados a células germinativas realizado no grupo controle e nas células diferenciadas em PGCLs.

3.2. Experimento 2

3.2.1. Morfologia

Interessantemente, as células multipotentes de cervo-do-pantanal têm potencial para formar estruturas semelhantes a PGCLs sem a necessidade de realizar o cultivo em suspensão. As células do cultivo em aderência do meio controle continuaram até o fim do tratamento com a morfologia padrão da linhagem celular original, ou seja, fusiforme e aderente. Já as células dos demais grupos tiveram uma tendência a se agruparem (Figura 4) sendo que muitas delas formaram estruturas ovais que se destacaram da placa. A morfologia dessas células agregadas se alterou completamente, e de fusiformes e aderentes, tornaram-se redondas e com pequena proporção entre núcleo e citoplasma, morfologia esta compartilhada também pelas células germinativas verdadeiras.

Certamente, para o cultivo em aderência o chifre foi a linhagem que menos modificou sua morfologia (Figura 5). Apesar da agregação e modificação da morfologia de algumas células, a maioria delas permaneceu aderente e fusiforme nos grupos testados. Já para pele e gordura, grandes alterações foram notadas, e ao final do tratamento (7 dias) a maioria das células já se encontrava agregada de forma semelhante a PGCLs. Notou-se que os grupos que continham RA na composição do meio foram mais resistentes a formação dessas estruturas. Nas placas de pele foram notados maior número PGCLs, enquanto que nas de gordura, visualmente, foram encontrados os maiores agregados (Figura 6).

No caso do cultivo em suspensão, todos os grupos formaram P (Figura 7) e não foram notadas diferenças morfológicas entre os tipos celulares ou entre os diferentes tratamentos utilizados.

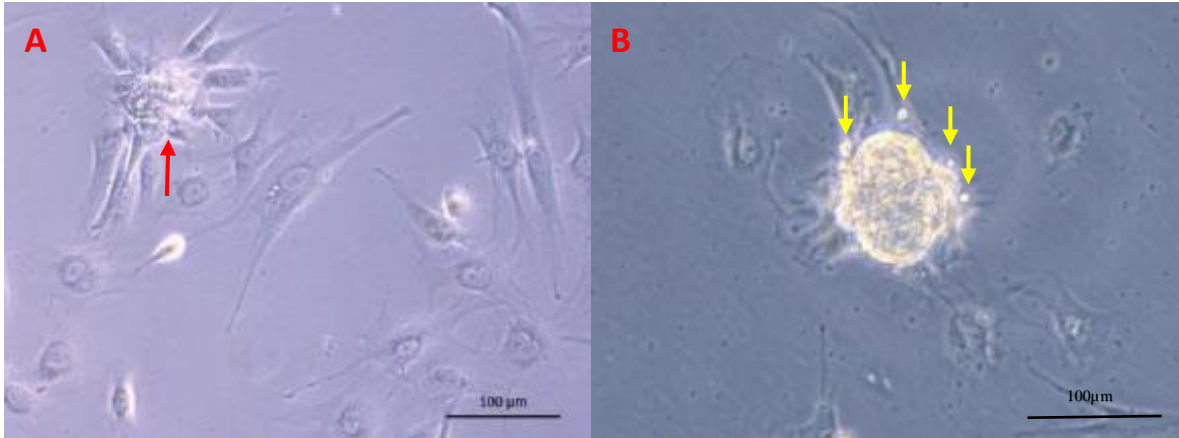


Figura 4 – Fotomicrografia das células em diferenciação: (A) As células começaram a se agregare alterar a sua morfologia (seta vermelha); (B) Agregado de células, podemos ver algumas células (setas amarelas) isoladas e que tem morfologia semelhante a de células germinativas.

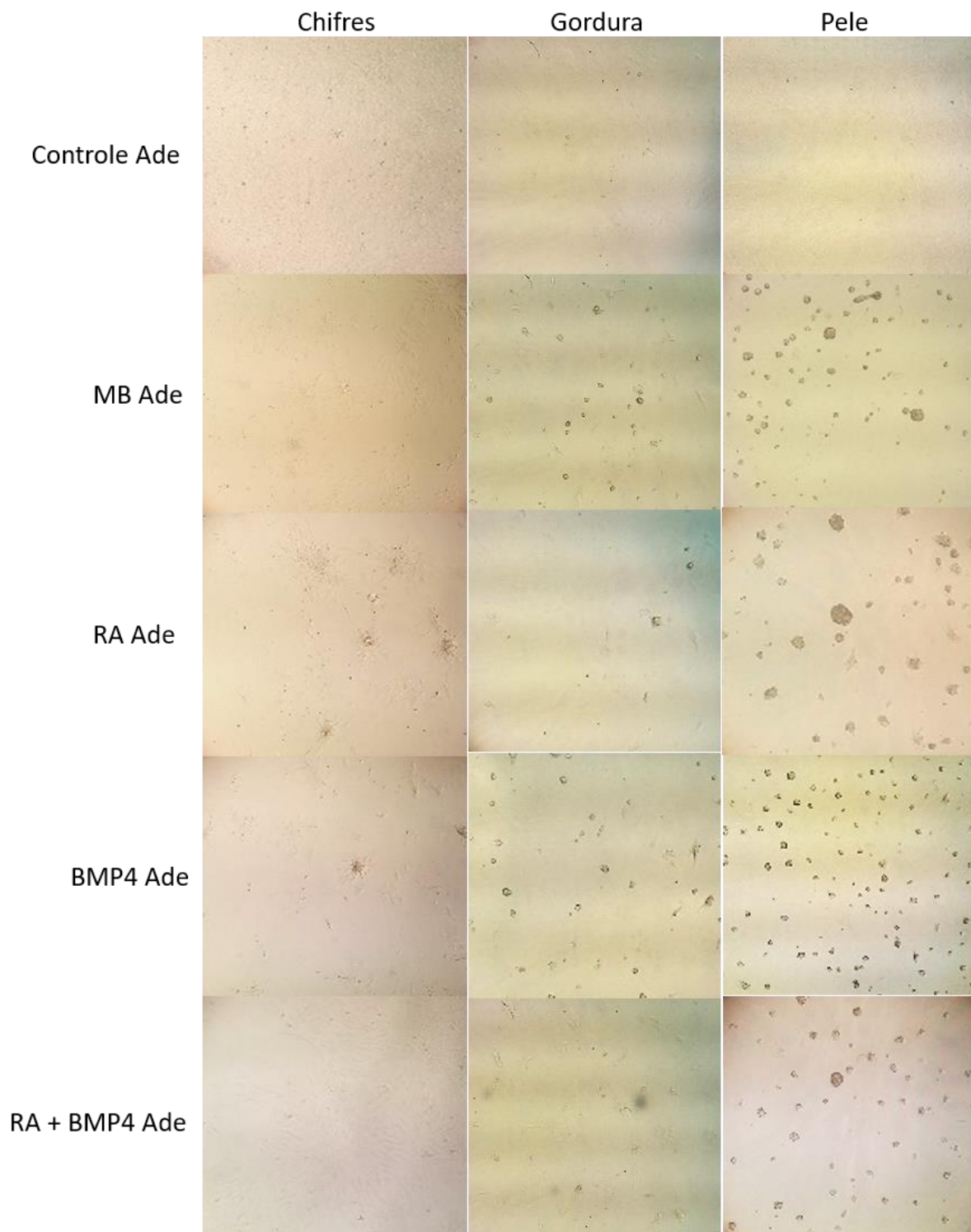


Figura 5 – Fotomicrografia das linhagens celulares após tratamento em diferentes meios de cultivo. Podemos observar grande variação na morfologia das células de acordo com a linhagem celular ou grupo de tratamento.

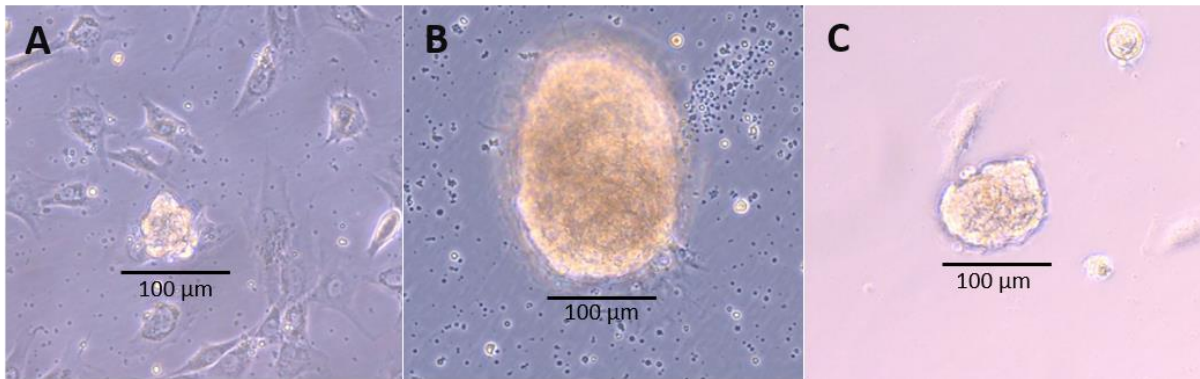


Figura 6 – Fotomicrografia comparando PGCLs formadas pelas linhagens de (A) chifres, (B) gordura e (C) pele do grupo BMP4 Ade.

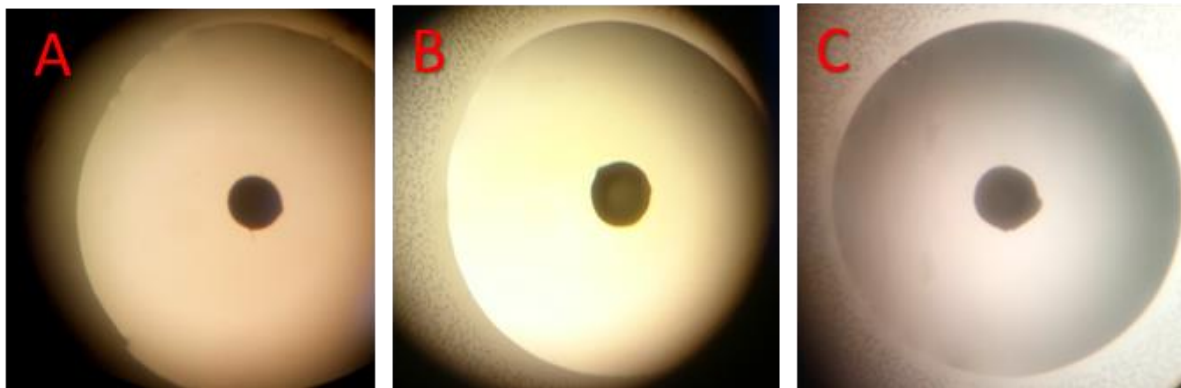


Figura 7 – Fotomicrografia comparando PGCLs formados pelas linhagens de (A) chifres, (B) gordura e (C) pele nos grupos de cultivo em suspensão.

4. DISCUSSÃO

De forma semelhante ao que foi obtido a partir de iPSC nos experimentos de Hayashi et al. (2011) e Hayashi, Saitou e Yamanaka (2012) para camundongos, bem como o que foi obtido para bovinos por Bressan (2013) Bressan (2016, comunicação pessoal), as células multipotentes do experimento 1 puderam formar PGCLs e assemelham-se as PGCLs obtidas nos demais trabalhos. Morfologicamente, os corpos embrióides obtidos das linhagens de gordura e pele foram mais estruturados em relação ao obtidos a partir dos chifres, onde ainda houve aderência a placa. A imunocitoquímica demonstrou que estas PGCLs expressam Ddx4, porém, a expressão de Dazl foi fracamente identificada em apenas uma das duas linhagens de pele testadas. Seria interessante avaliar a transcrição de Dazl por RT-qPCR, a fim de

verificar se há ausência de transcritos, e assim descartar qualquer problema relacionado a técnica de imunocitoquímica.

Quanto aos transcritos avaliados por RT-qPCR, foi possível identificar sua expressão nas células multipotentes não tratadas (grupo controle). Outros trabalhos relatam a presença destes marcadores em células MSC sem qualquer tratamento. Na medula óssea, por exemplo, Oct4, Fragilis, Stella, Ddx4, c-kit e Piwil2 já foram identificados em humanos (DRUSENHEIMER et al., 2007) e estes mesmos marcadores em conjunto ao Stra 8 foram relatados em ratos (GHASEMZADEH-HASANKOLAEI; ESLAMINEJAD; SEDIGHI-GILANI, 2016). Este último trabalho, verificou a presença de Piwil2 em diversos tecidos, e demonstrou que intestino, pulmão e rim tinham níveis de expressão que não diferiam dos encontrados no ovários e testículo, e ainda, que órgãos como cérebro, rins e músculo também expressam este gene. Já em ovinos, foram identificados que OCT4, VASA, ITGb1 e PIWIL2 eram altamente expressos nas células de medula óssea (GHASEMZADEH-HASANKOLAEI et al., 2014).

Dentre os genes aqui avaliados, Fragilis é expresso *in vivo* nas PGGs pré-migratórias e migratórias e parece desempenhar função na adesão celular entre as PGCs (DE FELICI et al., 2004; SAGA, 2008), formando um cluster de células distintas durante a gastrulação. A expressão de Stella é iniciada no momento em que o gene Fragilis está altamente regulado nas PGCs, sendo expresso também em células migratórias. Foi possível observar em nosso trabalho que a expressão de Fragilis e Stella seguem um mesmo padrão, corroborando com o que está descrito na literatura. Oct4, um gene sabidamente ligado na manutenção da pluripotência, também possui função importante nas linhagens de células germinativas, e sua expressão é temporariamente silenciada no início da prófase I (SAGA, 2008). O DDX4 (também conhecido como Vasa) é expresso em PGCs migratórias tardias e também está presente em células germinativas gonadais de fetos, bem como adultas masculina e feminina, sendo mais abundantemente expressa em espermátócitos e ovócitos maduros (NOCE, OKAMOTO-ITO; TSUNEKAWA, 2001). Já o Stra8, tem função na regulação do início da meiose, tanto na espermatogênese quanto na oogênese (ANDERSON et al., 2008).

Uma vez que os níveis de *Fragilis* e *Stella* se encontram elevados no tipo celular proveniente da gordura, podemos supor que estas PGCLs se diferenciaram até o estágio que seria correspondente aos iniciais da diferenciação (células pré-migratórias e migratórias). As células de pele parecem estar em um estágio mais avançado da diferenciação das PGCLs, uma vez que tem maior expressão de *DDX4* e *Stra8*, o que corresponderia a células migratórias tardias e início da entrada das células na meiose. Ainda que as células de chifre apresentassem valores de expressão semelhantes aos demais tipos celulares no grupo controle, após a diferenciação, elas responderam mal ao tratamento e, com exceção do gene *Stella*, todos os demais transcritos tiveram diminuição na sua expressão. Portanto, células de gordura e pele são tipos celulares que merecem nossa atenção em experimentos futuros.

Há necessidade de que sejam realizadas ao menos triplicatas de cada um dos tipos de tecidos aqui estudadas para que o experimento seja estatisticamente mais robusto e, portanto, estes são resultados preliminares. Futuramente mais repetições serão realizadas para complementar este estudo e confirmar sua repetibilidade.

No experimento 2, submetemos as células a 10 diferentes grupos de cultivo para tentar identificar quais condições eram favoráveis a diferenciação em PGCLs. Para tanto, fatores comumente utilizados para diferenciação de MSC em PGCLs foram utilizados (*RA* e *BMP4*), e os sistemas de cultivo de adesão e suspensão foram testados.

Devido as dificuldades encontradas para a extração de RNA das células que permaneceram no cultivo em suspensão, não foram realizadas até o momento as análises de RT-qPCR para avaliar os transcritos do experimento 2. A observação apenas da morfologia não nos permite tirar grandes conclusões. Porém, é possível identificar que existe certa resistência para que as células da linhagem de chifre sofram alterações morfológicas e assumam a forma semelhante à das células germinativas primordiais verdadeiras, como ocorreu para pele e gordura. Estas células são tipicamente caracterizadas por morfologia arredondada e pequena proporção entre núcleo e citoplasma (KEE et al., 2009). Após o segundo dia de tratamento, as células dos grupos de adesão do meio base e *BMP4* já formavam agregados e a partir do quarto dia era possível identificar estruturas que se destacavam das garrafas de cultivo. Os grupos que continham *RA* (*RA Ade* e *RA + BMP4 Ade*) também formavam

agregados a partir do segundo dia de cultivo, porém, a formação, bem como descolamento desses agregados das garrafas, se deu de forma mais lenta. Para o grupo das células cultivadas em sistema em suspensão por hanging drop, as PGCLs foram observadas já no segundo dia de cultivo e não foram notadas diferenças morfológicas significativas entre os grupos.

Experimentos realizados em células de medula óssea de ovinos mostraram aumento nos níveis de Ddx4 e ITG b1 e diminuição na expressão de Oct4 e Piwil2 após realizarem cultivo destas células na presença do RA em relação as células não tratadas. Este trabalho relata que após o tratamento com RA houve alteração morfológica das células, formando longas cadeias celulares (GHASEMZADEH-HASANKOLAEI et al., 2014) que não se assemelham a morfologia das células de cervo-do-pantanal tratadas com RA. Este mesmo grupo de pesquisa submeteu, posteriormente, as células de medula óssea de ovinos ao tratamento com BMP4, BMP8 e TGFb1 e, interessantemente, nenhuma alteração morfológica foi observada nos grupos tratados com BMP4 ou BMP8. Já no grupo tratado com TGFb1, as células se tornaram arredondadas e formaram aglomerados celulares muito semelhantes aos encontrados nos grupos do nosso experimento para células tratadas com o meio base ou com adição de RA, BMP4 ou ambos (GHASEMZADEH-HASANKOLAEI; SEDIGHI-GILANI; ESLAMINEJAD, 2014). Em outro experimento, Ghasemzadeh-Hasankolaei; Eslaminejad; Sedighi-Gilani (2016), injetaram as células de medula óssea de ovinos nos testículos de receptores para avaliar a colonização destas células *in loco*. Após dois meses do transplante, os autores relataram que as células tratadas com RA por 14 dias resultaram na formação de 5 colônias visualizadas nos testículos, as tratadas com RA por 21 dias resultaram em 18 colônias, as tratadas com TGFb1 resultaram em 28 colônias, e quando foram transplantadas células que não passaram por qualquer tratamento, nenhuma colônia foi encontrada. Uma vez que as células tratadas com TGFb1 obtiveram maior sucesso na colonização testicular após transplante e sua morfologia apresentou semelhança ao encontrado nas células de cervo-do-pantanal em alguns grupos de tratamento, pode-se levantar a hipótese que estas células são boas candidatas para serem transplantadas para testículos, e quem sabe, retomar a meiose *in vivo*.

Este estudo consiste em resultados preliminares, e para sua publicação serão realizadas futuramente outras repetições e análises para melhor caracterizar as células induzidas.

5. CONCLUSÃO

Este estudo preliminar demonstrou que as células multipotentes de cervo-do-pantanal das linhagens de gordura e pele tem potencial para se diferenciarem em PGCLs. Estas células foram capazes de alterar sua morfologia, bem como a aumentar a expressão dos transcritos relacionados as células germinativas, sendo que as células de gordura parecem ter se diferenciado em estádios iniciais de PGCLs e as células de pele em estágio pré-meiótico de PGCLs. A linhagem de chifres apresentou alteração morfológica mais discreta e não apresentou mudanças favoráveis quanto a expressão de genes relacionados as células germinativas e, portanto, parece não ser uma fonte adequada para aplicação em estudos futuros.

6. REFERÊNCIAS

ALIMPERTI, S.; LEI, P.; WEN, Y.; TIAN, J.; CAMPBELL, A. M.; ANDREADIS, S. T. Serum-free spheroid suspension culture maintains mesenchymal stem cell proliferation and differentiation potential. **Biotechnology Progress**, v. 30, n. 4, p. 974–983, 2014.

ANDERSON, E. L.; BALTUS, A. E.; ROEPERS-GAJADIEN, H. L.; HASSOLD, T. J.; DE ROOIJ, D. G.; VAN PELT, A. M. M.; PAGE, D. C. Stra8 and its inducer, retinoic acid, regulate meiotic initiation in both spermatogenesis and oogenesis in mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 39, p. 14976–14980, 2008.

ANTONUCCI, I.; STUPPIA, L.; KANEKO, Y.; YU, S.; TAJIRI, N.; BAE, E. C.; CHHEDA, S. H.; WEINBREN, N. L.; BORLONGAN, C. V. Amniotic Fluid as a Rich Source of Mesenchymal Stromal Cells for Transplantation Therapy. **Cell Transplantation**, v. 20, n. 6, p. 789–795, 2011.

BRESSAN, F. F. **Geração de células pluripotentes através da indução gênica e transferência de núcleo: modelo bovino de aquisição de pluripotência**. 2013. 113 f. ,Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos – Universidade de São Paulo, 2013.

DANNER, S.; KAJAHN, J.; GEISMANN, C.; KLINK, E.; KRUSE, C. Derivation of oocyte-like cells from a clonal pancreatic stem cell line. **Molecular Human Reproduction**, v. 13, n. 1, p. 11–20, 2006.

DE FELICI, M.; SCALDAFERRI, M.; LOBASCIO, M.; IONA, S.; NAZZICONE, V.; KLINGER, F.; FARINI, D. Experimental approaches to the study of primordial germ cell lineage and proliferation. **Human Reproduction Update**, v. 10, n. 3, p. 197–206, 2004.

DING, D.-C.; CHANG, Y.-H.; SHYU, W.-C.; LIN, S.-Z. Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells: A New Era for Stem Cell Therapy. **Cell Transplantation**, v. 24, n. 3, p. 339–347, 2015.

DRUSENHEIMER, N.; WULF, G.; NOLTE, J.; LEE, J. H.; DEV, A.; DRESSEL, R.; GROMOL, I J.; SCHMIDTKE, J.; ENGEL, W.; NAYERNIA, K. Putative human male germ cells from bone marrow stem cells. **Society of Reproduction and Fertility supplement**, v. 63, p. 69–76, 2007.

DUARTE, J. M. B. Coleta, conservação e multiplicação de recursos genéticos em animais silvestres: o exemplo dos cervídeos. **Agrociencia**, v. 9, n. 1–2, p. 541–544, 2005.

DUARTE, J. M. B.; VARELA, D.; PIOVEZAN, U.; BECCACECI, M. D.; GARCIA, J. E. **Blastocerus dichotomus - The IUCN Red List of Threatened Species**. . Acesso em: 1 out. 2015.

GHASEMZADEH-HASANKOLAEI, M.; ESLAMINEJAD, M. B.; BATAVANI, R.; SEDIGHI-GILANI, M. Comparison of the efficacy of three concentrations of retinoic acid for transdifferentiation induction in sheep marrow-derived mesenchymal stem cells into male germ cells. **Andrologia**, v. 46, n. 1, p. 24–35, 2014.

GHASEMZADEH-HASANKOLAEI, M.; ESLAMINEJAD, M. B.; SEDIGHI-GILANI, M. Derivation of male germ cells from ram bone marrow mesenchymal stem cells by three

different methods and evaluation of their fate after transplantation into the testis. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal**, v. 52, n. 1, p. 49–61, 2016.

GHASEMZADEH-HASANKOLAEI, M.; SEDIGHI-GILANI, M.; ESLAMINEJAD, M. Induction of Ram Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells into Germ Cell Lineage using Transforming Growth Factor- β Superfamily Growth Factors. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 49, n. 4, p. 588–598, 2014.

GUO, L.; ZHOU, Y.; WANG, S.; WU, Y. Epigenetic changes of mesenchymal stem cells in three-dimensional (3D) spheroids. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 18, n. 10, p. 2009–2019, 2014.

HAYASHI, K.; OGUSHI, S.; KURIMOTO, K.; SHIMAMOTO, S.; OHTA, H.; SAITOU, M. Offspring from Oocytes Derived from in Vitro Primordial Germ Cell-like Cells in Mice. **Science**, v. 338, n. 6109, p. 971–975, 2012.

HAYASHI, K.; OHTA, H.; KURIMOTO, K.; ARAMAKI, S.; SAITOU, M. Reconstitution of the Mouse Germ Cell Specification Pathway in Culture by Pluripotent Stem Cells. **Cell**, v. 146, n. 4, p. 519–532, 2011.

HAYASHI, Y.; SAITOU, M.; YAMANAKA, S. Germline development from human pluripotent stem cells toward disease modeling of infertility. **Fertility and Sterility**, v. 97, n. 6, p. 1250–1259, 2012.

HIKABE, O.; HAMAZAKI, N.; NAGAMATSU, G.; OBATA, Y.; HIRAO, Y.; HAMADA, N.; SHIMAMOTO, S.; IMAMURA, T.; NAKASHIMA, K.; SAITOU, M.; HAYASHI, K. Reconstitution in vitro of the entire cycle of the mouse female germ line. **Nature**, v. 539, n. 7628, p. 299–303, 2016.

HOLT, W. V.; PICKARD, A. R. Role of reproductive technologies and genetic resource banks in animal conservation. **Reviews of Reproduction**, v. 4, p. 143–150, 1999.

HOSSEINZADEH SHIRZEILY, M.; PASBAKHS, P.; AMIDI, F.; MEHRANNIA, K.; SOBHANI, A. Comparison of differentiation potential of male mouse adipose tissue and bone marrow derived-mesenchymal stem cells into germ cells. **Iranian Journal of Reproductive Medicine**, v. 11, n. 2, p. 965–976, 2013.

HUA, J.; PAN, S.; YANG, C.; DONG, W.; DOU, Z.; SIDHU, K. S. Derivation of male germ cell-like lineage from human fetal bone marrow stem cells. **Reproductive**

BioMedicine Online, v. 19, n. 1, p. 99–105, 2009.

HUA, J.; QIU, P.; ZHU, H.; CAO, H.; WANG, F.; LI, W. Multipotent mesenchymal stem cells (MSCs) from human umbilical cord: Potential differentiation of germ cells. **African Journal of Biochemistry Research**, v. 5, n. 4, p. 113–123, 2011.

HUANG, Y.-Z.; ZHANG, E.-P.; CHEN, H.; WANG, J.; LI, Z.-J.; HUAI, Y.-T.; MA, L.; LAN, X.-Y.; REN, G.; LEI, C.-Z.; FANG, X.-T.; WANG, J.-Q. Novel 12-bp deletion in the coding region of the bovine NPM1 gene affects growth traits. **Journal of applied genetics**, v. 51, n. 2, p. 199–202, 2010.

JOUNI, F. J.; ABDOLMALEKI, P.; BEHMANESH, M.; MOVAHEDIN, M. An in vitro study of the impact of 4mT static magnetic field to modify the differentiation rate of rat bone marrow stem cells into primordial germ cells. **Differentiation**, v. 87, n. 5, p. 230–237, 2014.

KEE, K.; ANGELES, V. T.; FLORES, M.; NGUYEN, H. N.; REIJO PERA, R. A. Human DAZL, DAZ and BOULE genes modulate primordial germ-cell and haploid gamete formation. **Nature**, v. 462, n. 7270, p. 222–225, 2009.

LI, N.; PAN, S.; ZHU, H.; MU, H.; LIU, W.; HUA, J. BMP4 promotes SSEA-1 + hUC-MSC differentiation into male germ-like cells in vitro. **Cell Proliferation**, v. 47, n. 4, p. 299–309, 2014.

LI, Y.; GUO, G.; LI, L.; CHEN, F.; BAO, J.; SHI, Y.; BU, H. Three-dimensional spheroid culture of human umbilical cord mesenchymal stem cells promotes cell yield and stemness maintenance. **Cell and Tissue Research**, v. 360, n. 2, p. 297–307, 2015.

MAKOOLATI, Z.; MOVAHEDIN, M.; FOROUZANDEH-MOGHADAM, M. Bone morphogenetic protein 4 is an efficient inducer for mouse embryonic stem cell differentiation into primordial germ cell. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal**, v. 47, n. 5–6, p. 391–398, 2011.

MAMIDI, M. K.; PAL, R.; MORI, N. A. B.; ARUMUGAM, G.; THRICHELVAM, S. T.; NOOR, P. J.; ABDULLAH, H. M. F.; GUPTA, P. K.; DAS, A. K.; ZAKARIA, Z.; BHONDE, R. Co-culture of mesenchymal-like stromal cells derived from human foreskin permits long term propagation and differentiation of human embryonic stem cells. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 112, n. 5, p. 1353–1363, 2011.

- MARX, V. Cell culture: A better brew. **Nature**, v. 496, n. 7444, p. 253–258, 2013.
- MAZAHERI, Z.; MOVAHEDIN, M.; RAHBARIZADEH, F.; AMANPOUR, S. Different doses of bone morphogenetic protein 4 promote the expression of early germ cell-specific gene in bone marrow mesenchymal stem cells. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal**, v. 47, n. 8, p. 521–525, 2011.
- MURPHY, K. C.; FANG, S. Y.; LEACH, J. K. Human mesenchymal stem cell spheroids in fibrin hydrogels exhibit improved cell survival and potential for bone healing. **Cell and Tissue Research**, v. 357, n. 1, p. 91–99, 2014.
- NAYERNIA, K.; LEE, J. H.; DRUSENHEIMER, N.; NOLTE, J.; WULF, G.; DRESSEL, R.; GROMOLL, J.; ENGEL, W. Derivation of male germ cells from bone marrow stem cells. **Laboratory Investigation**, v. 86, n. 7, p. 654–663, 2006.
- NOCE, T.; OKAMOTO-ITO, S.; TSUNEKAWA, N. Vasa Homolog Genes in Mammalian Germ Cell Development. **Cell Structure and Function**, v. 26, n. 3, p. 131–136, 2001.
- QIU, P.; BAI, Y.; PAN, S.; LI, W.; LIU, W.; HUA, J. Gender depended potentiality of differentiation of human umbilical cord mesenchymal stem cells into oocyte-Like cells in vitro. **Cell Biochemistry and Function**, v. 31, n. 5, p. 365–373, 2013.
- SAGA, Y. Mouse germ cell development during embryogenesis. **Current Opinion in Genetics & Development**, v. 18, n. 4, p. 337–341, 2008.
- SHIRAZI, R.; ZARNANI, A. H.; SOLEIMANI, M.; ABDOLVAHABI, M. A.; NAYERNIA, K.; RAGERDI KASHANI, I. BMP4 can generate primordial germ cells from bone-marrow-derived pluripotent stem cells. **Cell Biology International**, v. 36, n. 12, p. 1185–1193, 2012.
- SONG, S.-H.; KUMAR, B. M.; KANG, E.-J.; LEE, Y.-M.; KIM, T.-H.; OCK, S.-A.; LEE, S.-L.; JEON, B.-G.; RHO, G.-J. Characterization of Porcine Multipotent Stem/Stromal Cells Derived from Skin, Adipose, and Ovarian Tissues and Their Differentiation In Vitro into Putative Oocyte-Like Cells. **Stem Cells and Development**, v. 20, n. 8, p. 1359–1370, 2011.
- WILDT, D. E. Strategies for the practical application of reproductive technologies to endangered species. **Zoo Biology**, v. 8, n. S1, p. 17–20, 1989.

YEW, T.-L.; CHIU, F.-Y.; TSAI, C.-C.; CHEN, H.-L.; LEE, W.-P.; CHEN, Y.-J.; CHANG, M.-C.; HUNG, S.-C. Knockdown of p21Cip1/Waf1 enhances proliferation, the expression of stemness markers, and osteogenic potential in human mesenchymal stem cells. **Aging Cell**, v. 10, n. 2, p. 349–361, 2011.

YU, X.; WANG, N.; QIANG, R.; WAN, Q.; QIN, M.; CHEN, S.; WANG, H. Human Amniotic Fluid Stem Cells Possess the Potential to Differentiate into Primordial Follicle Oocytes In Vitro. **Biology of Reproduction**, v. 90, n. 4, p. 1–11, 2014.

ZHANG, S.; LIU, P.; CHEN, L.; WANG, Y.; WANG, Z.; ZHANG, B. The effects of spheroid formation of adipose-derived stem cells in a microgravity bioreactor on stemness properties and therapeutic potential. **Biomaterials**, v. 41, p. 15–25, 2015.

ZHOU, Q.; WANG, M.; YUAN, Y.; WANG, X.; FU, R.; WAN, H.; XIE, M.; LIU, M.; GUO, X.; ZHENG, Y.; FENG, G.; SHI, Q.; ZHAO, X.-Y.; SHA, J.; ZHOU, Q. Complete Meiosis from Embryonic Stem Cell-Derived Germ Cells In Vitro. **Cell Stem Cell**, v. 18, n. 3, p. 330–340, 2016.