

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 05/05/2022.

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Instituto de Biociências de Botucatu

PPG – Farmacologia e Biotecnologia

Células tronco embrionárias e induzidas ao estado de pluripotência em bovinos: características moleculares e aplicação em quimeras embrionárias

Ramon Cesar Botigelli

2021

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

Células tronco embrionárias e induzidas ao estado de pluripotência em bovinos: características moleculares e aplicação em quimeras embrionárias

Ramon Cesar Botigelli

Orientador: Marcelo Fábio Gouveia Nogueira

Co-orientadora: Fabiana Fernandes Bressan

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação do Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista (UNESP), para obtenção do título de doutora em Farmacologia e Biotecnologia

Botucatu / São Paulo

Brasil

Maio, 2021

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Botigelli, Ramon Cesar.

Células tronco embrionárias e induzidas ao estado de pluripotência em bovinos : características moleculares e aplicação em quimeras embrionárias / Ramon Cesar Botigelli. - Botucatu, 2021

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu
Orientador: Marcelo Fábio Gouveia Nogueira
Coorientador: Fabiana Fernandes Bressan
Capes: 21000000

1. Células tronco embrionárias. 2. Reprogramação celular.
3. Biotecnologia - Reprodução. 4. Quimeras de transplante.
5. Bovino.

Palavras-chave: Biotecnologia da reprodução; Células tronco; Quimeras; Reprogramação celular.

Autor: Ramon Cesar Botigelli

Título: Células tronco embrionárias e induzidas ao estado de pluripotência em bovinos: características moleculares e aplicação em quimeras embrionárias

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Marcelo Fábio Gouveia Nogueira

Presidente e orientador

Universidade Estadual Paulista (UNESP) – Assis, São Paulo, Brasil.

Profa. Dra. Fernanda da Cruz Landim

Membro

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (UNESP – FMVZ) / Departamento de Reprodução Animal. Botucatu, São Paulo, Brasil.

Profa. Dra. Claudia Maria Bertan Membrive

Membro

Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas (UNESP - Câmpus de Dracena) / Departamento de Produção Animal. Dracena, São Paulo, Brasil.

Prof. Dr. Lawrence Charles Smith

Membro

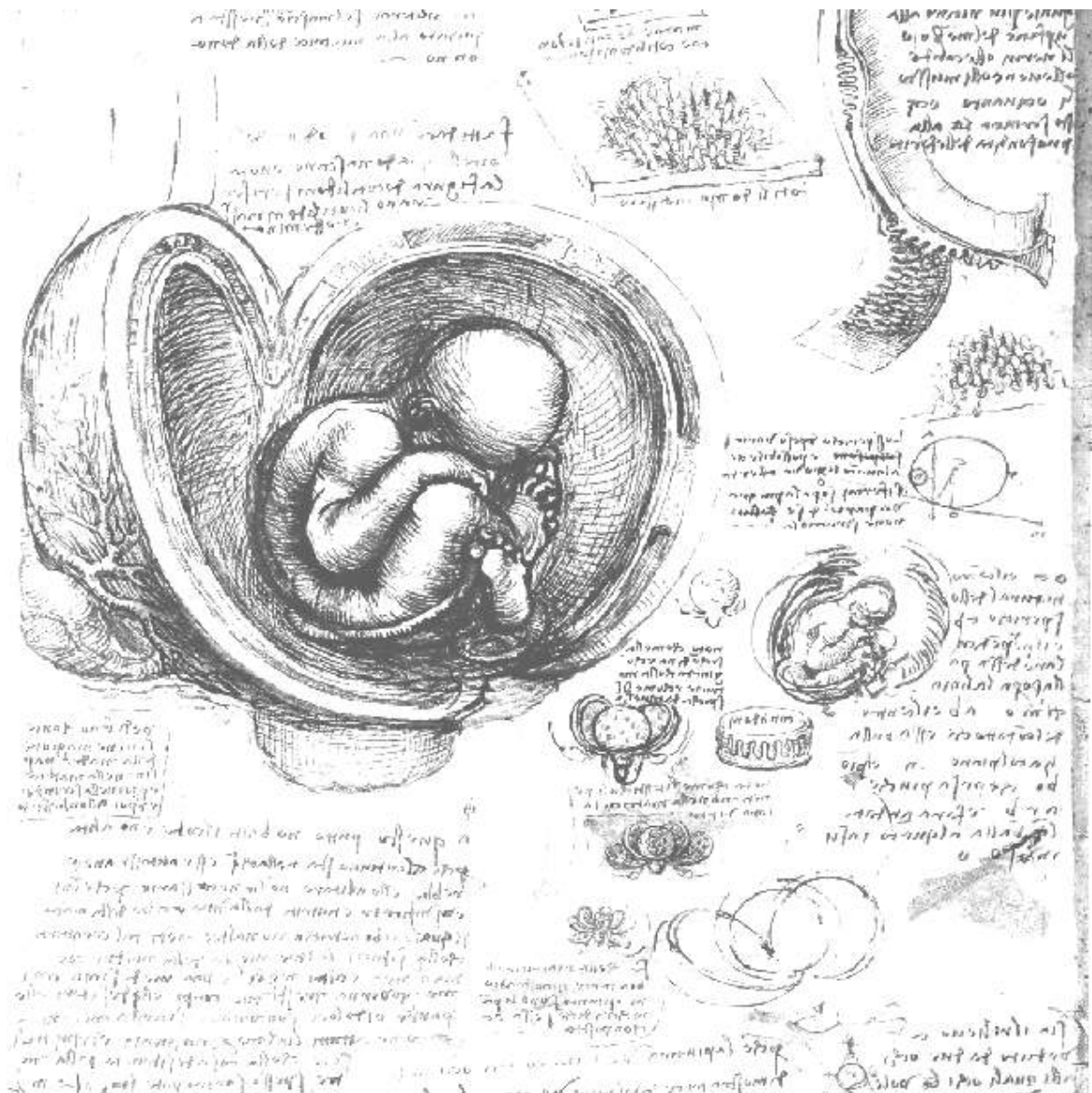
Université de Montréal / Centre de recherche en reproduction animale. Saint-Hyacinthe, Quebec, Canadá.

Prof. Dr. Marcelo Demarchi Goissis

Membro

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (USP – FMVZ) / Departamento de Reprodução Animal. São Paulo, São Paulo, Brasil.

Data da defesa: 05/05/2021



"Learning Never Exhausts the Mind."

Leonardo da Vinci (1452-1519)

Contents

ACKNOWLEDGMENTS	9
ETHICS STATEMENT	11
RESUMO	14
ABSTRACT	15
INTRODUCTION	16
HYPOTHESIS	18
OBJECTIVES	18
EXPERIMENTAL DESIGN	19
CHAPTER 1: LITERATURE REVIEW	20
BACKGROUND	20
DEFINITION AND DIFFERENT TYPES OF PLURIPOTENT STEM CELLS	22
TERATOCARCINOMAS/ EMBRYONIC CARCINOMA CELLS	22
EMBRYONIC STEM CELLS (ESCs)	23
HYPOXIA IN EARLY EMBRYONIC DEVELOPMENT	25
NAÏVE, INTERMEDIATE AND PRIMED PLURIPOTENT STATES	27
INDUCED PLURIPOTENT STEM CELLS (iPSCs)	30
CHIMERISM	33
LIVESTOCK PLURIPOTENT STEM CELLS APPLICATIONS	34
CHAPTER 2: OXYGEN LEVELS DURING IN VITRO INDUCED REPROGRAMMING ALTER PLURIPOTENCY	
ACQUISITION AND MAINTENANCE IN CATTLE	36
ABSTRACT	37
INTRODUCTION	38
MATERIAL AND METHODS	39
<i>Cells and Media</i>	39
<i>Feeder cells</i>	40
<i>Lentivirus production</i>	40
<i>Bovine induced pluripotent stem cells generation</i>	40

<i>In vitro embryo production</i>	41
<i>Histochemistry and Immunocytochemistry</i>	41
<i>RNA extraction and Reverse Transcription</i>	42
<i>Real time qPCR</i>	42
<i>Spontaneous differentiation in embryoid bodies</i>	43
<i>Statistical analysis</i>	43
RESULTS	43
<i>Influence of low or high oxygen tension and different pluripotent supplements during the reprogramming process of bovine fibroblasts</i>	43
<i>Molecular profile of biPSCs generated in low or high oxygen tension and different pluripotent supplements</i>	44
<i>Spontaneous differentiation of biPSCs generated in low and high oxygen conditions and different pluripotent supplements</i>	45
DISCUSSION	45
DECLARATIONS	49
<i>Funding</i>	49
<i>Acknowledgements</i>	49
<i>Authors' contributions</i>	49
<i>Conflicts of Interest</i>	49
<i>Data Availability Statement</i>	49
REFERENCES	49
TABLES	54
FIGURES	55
LEGENDS OF FIGURES	58
CHAPTER 3: ACQUISITION AND MAINTENANCE OF PLURIPOTENCY ARE INFLUENCED BY FIBROBLAST GROWTH FACTOR, LEUKEMIA INHIBITORY FACTOR AND 2I ON BOVINE-INDUCED PLURIPOTENT STEM CELLS	59
ABSTRACT	60
BACKGROUND	61
MATERIAL AND METHODS	62
<i>Cells and Media</i>	63
<i>Feeder cells</i>	63
<i>Lentivirus production</i>	64
<i>Bovine fibroblasts and induced pluripotent stem cells production (biPSC)</i>	64
<i>Bovine in vitro embryo production</i>	65
<i>Bovine embryonic stem cells isolation and culture (bESC)</i>	65

<i>Histochemistry and Immunohistochemistry</i>	65
<i>RNA extraction and Reverse Transcription</i>	66
<i>Real time qPCR</i>	66
<i>In vitro differentiation</i>	67
<i>Generation of GFP+ lines from bovine iPSCs and ESCs</i>	67
<i>Preparation and bovine PSCs contribution to chimeric blastocysts</i>	67
<i>Statistical analysis</i>	68
RESULTS	68
<i>Generation and initial characterization of biPSCs</i>	68
<i>Gene expression and Immunohistochemistry profile on biPSCs</i>	69
<i>Differentiation potential of bovine iPSCs and bESCs</i>	70
DISCUSSION	71
CONCLUSION	75
ABBREVIATIONS	75
DECLARATIONS	75
<i>Ethics approval and consent to participate</i>	76
<i>Funding</i>	76
<i>Acknowledgements</i>	76
<i>Authors' contributions</i>	76
LEGENDS OF FIGURES	85
SUPPLEMENTARY MATERIALS	87
CHAPTER 4: FINAL REMARKS	88
REFERENCES	90
CURRICULUM VITAE	102

Acknowledgments

Agradeço primeiramente aos meus pais Sidnei e Silmara, minha irmã Gabriella e meu cunhado Rodrigo, e minha amada Maria Victória por me darem o suporte incondicional em todos os momentos, serem minha motivação e me incentivarem incondicionalmente para dar o meu melhor.

Ao Prof. Marcelo Nogueira, pela oportunidade concedida desde o primeiro momento, pela confiança, ensinamentos científicos, culturais e de vida. Ainda, pela amizade construída que levarei com muito carinho por toda a vida.

À Profa. Fabiana Bressan, por ter aceitado me co-orientar, ter apresentado um novo mundo (stem cells), este, que não me vejo mais fora dele. Ainda, por todos os ensinamentos e suporte para minha evolução.

À Profa. Claudia Leal, por ter aberto seu laboratório à mais de 10 anos atrás para que eu iniciasse minha carreira científica.

Aos meus amigos do “grupo iPS”: Naira Pieri, Luquinhas Simões, Aline Souza, Laís Pessoa, Raquel Castro, Kaiana Recchia, Jéssica Brunhara, Gabriela Barbosa e ao saudoso Brendon Bessi. Estes que sempre estiveram presentes nos “dias de luta e dias de glória”.

Aos amigos do Lab LMMD, em especial a turma da velha guarda e aos que desembarcaram recentemente: Juliano Sangalli, Rafael Sampaio, Tiago De Bem, Leonardo Amaral, Ricardo Nociti, Deiwison, João Paixão, Alessandra, Gabriella Mamede, Maíra Bianchi, Kátia Schwarz, Fabiane Zafallon, Hugo Fernandes, Fernanda Cavallari e tantos outros que passaram pelo lab e contribuíram direta ou indiretamente.

Aos amigos do Botucatu e Lab FitoFarmaTec, que me receberam muito bem e logo se tornaram tão especiais: Prof. Luiz Di Stasi, Eduardo Razza, Carolzinha, Anthony Castilho, Mariana Fernandes, Patricia Fontes, Elisa Pioltine, Priscila Santos, Fernanda Franchi e Camila Bortoliero e outros que também contribuíram.

I want to thank professor Pablo Ross and professor Richard Schultz for making my internship experience special, giving me the opportunity to increase my scientific skills and knowledge. To Alma Islas-Trejo and Xiaoqin (Shally) Xu for all the support. To

Ross's Lab: Emily Fishman, Ahmed Mahdi, Insung Park, Chuan Zou, Carly Gultinan, Daniel Goszczynski, Erika Paulson and Michelle Halstead.

I want to thank my Davis's family, Karen Andrea Garman, Mark Guzman and Saeahram Yoo for all our shared moments. Completing my internship experience was easier living with you.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de pesquisa durante o primeiro ano de doutorado, Código de Financiamento 001.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela Bolsa de doutorado (2016/16841-2) e pela Bolsa no exterior (2019/10751-0).

Ethics statement



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos
Comitê de Ética em Pesquisa da FZEA

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Investigação de mecanismos celulares e moleculares da aquisição da toti- e pluripotência induzida in vitro - modelo translacional", protocolada sob o CEUA nº 3526250717, sob a responsabilidade de **Fabiana Fernandes Bressan** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprova**da pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo - FZEA/USP (CEUA/FZEA) na reunião de 19/12/2017.

We certify that the proposal "Investigation of cellular and molecular mechanisms on in vitro induced toti- and pluripotency acquisition - a translational approach", utilizing 6 Heterogenic mice (males and females), 3 Swines (males and females), protocol number CEUA 3526250717, under the responsibility of **Fabiana Fernandes Bressan** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Animal Science and Food Engineering - (São Paulo University) (CEUA/FZEA) in the meeting of 12/19/2017.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa \(Acadêmica\)](#)

Vigência da Proposta: de [03/2017](#) a [01/2020](#) Área: [Medicina Veterinária](#)

Origem:	Animais provenientes de estabelecimentos comerciais			
Espécie:	Camundongos heterogênicos	sexo:	Machos e Fêmeas	idade: 2 a 4 semanas N: 6
Linhagem:	Balb/c		Peso:	15 a 30 g
Origem:	Suinocultura VNP (Laboratório de pesquisa em Suínos)			
Espécie:	Suínos	sexo:	Machos e Fêmeas	idade: 3 a 12 meses N: 3
Linhagem:	comercial		Peso:	15 a 50 kg

Resumo: A manipulação da reprogramação celular é uma ferramenta importante para o entendimento da biologia celular de células pluripotentes e para o estudo de diferentes doenças teciduais ou genéticas, possibilitando a investigação dos eventos moleculares responsáveis pela competência celular à toti- e pluripotência. A presente proposta objetiva consolidar a tecnologia de produção de células reprogramadas pluripotentes e células germinativas in vitro em espécies de animais domésticos de interesse comercial ou biomédico (em especial bovinos e suínos), com ênfase tanto no aspecto técnico, com a disseminação de protocolos e material biológico para novos estudos e colaborações, como no aspecto científico, através da investigação dos mecanismos celulares e moleculares envolvidos na reprogramação celular. São propostas 3 metas: 1) A padronização do protocolos reproduzíveis e seguros de geração de iPS animais, 2) A geração de gametas, células germinativas e embriões a partir de células cultivadas in vitro, e 3) A investigação dos mecanismos transcricionais e epigenéticos de reprogramação celular. Cada uma das metas está composta por atividades descritas específicas. É esperada com a realização desta proposta a consolidação da pesquisa nacional na temática reprogramação nuclear e epigenética, assim como a inserção internacional a partir de colaborações e publicações científicas de alto impacto, resultando na formação de um grupo de pesquisa multidisciplinar, competitivo e colaborativo nacionalmente e internacionalmente.

Local do experimento: Manutenção do animal no Setor de Suinocultura da FMVZ/USP Análise do material coletado no Laboratório de Morfofisiologia Molecular e Desenvolvimento - FZEA/USP

Pirassununga, 24 de agosto de 2018



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos
Comitê de Ética em Pesquisa da FZEA

Profa. Dra. Daniele dos Santos Martins
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da
Universidade de São Paulo - FZEA/USP

Profa. Dra. Cristiane Gonçalves Titto
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da
Universidade de São Paulo - FZEA/USP



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos
Comitê de Ética em Pesquisa da FZEA

Pirassununga, 22 de maio de 2019
CEUA N [3526250717](#)

Ilmo(a). Sr(a).
Responsável: Fabiana Fernandes Bressan
Área: Medicina Veterinária

Título da proposta: "Investigação de mecanismos celulares e moleculares da aquisição da toti- e pluripotência induzida in vitro - modelo translacional".

Parecer Consubstanciado da Comissão de Ética no Uso de Animais FZEA (ID 000893)

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo - FZEA/USP, no cumprimento das suas atribuições, analisou e **APROVOU** a Emenda (versão de 14/janeiro/2019) da proposta acima referenciada.

Resumo apresentado pelo pesquisador: "Para a realização do ensaio de produção de embriões quiméricos bovinos neste experimento, foi associado ao Projeto de Jovem Pesquisador uma proposta de doutorado que incluirá a transferência dos embriões produzidos in vitro a receptoras, e posterior abate das mesmas. Os animais utilizados são provenientes da Prefeitura do Campus Fernando Costa. A solicitação à prefeitura encontra-se em anexo.".

Comentário da CEUA: "Esta CEUA FZEA aprova a emenda do projeto.".

Profa. Dra. Daniele dos Santos Martins
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da
Universidade de São Paulo - FZEA/USP

Profa. Dra. Cristiane Gonçalves Titto
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da
Universidade de São Paulo - FZEA/USP

Resumo

Células tronco pluripotentes são uma ferramenta fundamental para os estudos da embriologia, para o desenvolvimento de estudos clínicos in vitro, para a medicina regenerativa e mais recentemente, para a produção de gametas in vitro. Em 2006, Takahashi e colaboradores demonstraram ser possível a obtenção de células-tronco pluripotentes por indução gênica (induced pluripotent stem cells ou iPSCs). No entanto, condições ambientais e de cultura in vitro, como a utilização de diferentes suplementos para a manutenção da pluripotência podem diminuir e modular a eficiência da reprogramação à pluripotência. Dessa forma, a presente tese teve como objetivo estudar os efeitos do oxigênio e de diferentes suplementos para a manutenção da pluripotência no cultivo e reprogramação de células iPSCs de bovinos (biPSCs). No primeiro estudo, fibroblastos fetais de bovinos foram reprogramados em diferentes tensões de oxigênio (baixo ou alto oxigênio) e diferentes suplementos para a manutenção de pluripotência, bFGF ou bFGF+LIF+CHIR+PD (bFL2i). Em nossas condições experimentais, baixo oxigênio não aumentou a eficiência de reprogramação quando comparada a reprogramação em alto oxigênio. Por outro lado, a suplementação bFL2i aumentou a eficiência de reprogramação das biPSCs. As biPSCs derivadas com bFL2i em baixo oxigênio indicaram ausência de habilidade de auto renovação. As linhagens caracterizadas foram positivas para fosfatase alcalina, positivas para a expressão de genes marcadores de pluripotência (SOX2, OCT4 e STELLA), no entanto, negativas para NANOG. Ainda, baixo oxigênio aumentou a expressão de GLUT1 e GLUT3. As biPSCs também foram positivas na imunofluorescência para OCT4 e SOX2, mas negativas para NANOG. As biPSCs foram competentes em formar corpos embrióides e estes expressam marcadores de mesoderme e ectoderme, ainda, uma linhagem apresentou expressão de endoderme. No segundo estudo, fibroblastos fetais de bovinos foram reprogramados com diferentes suplementos para a manutenção da pluripotência (fatorial 2x2; bFGF, bFGF2i, LIF, LIF2i), ainda, linhagens de células tronco embrionárias foram isoladas para serem comparadas com as biPSCs geradas. A reprogramação de biPSCs foi mais eficiente com bFGF. As linhagens derivadas com LIF2i indicaram ausência de habilidade de auto renovação. As linhagens biPSCs e bESCs foram positivas para fosfatase alcalina. As biPSCs e bESCs foram positivas para a expressão de genes marcadores de pluripotência (SOX2, OCT4, STELLA, LIFr e OTX2) e somente as biPSCs expressaram NANOG e ESRRb. Ainda, biPSCs e bESCs foram positivas para SOX2, OCT4 e H3K27me3, negativas para NANOG na imunofluorescência. As biPSCs e bESCs foram competentes em formar corpos embrióides, estes expressaram marcadores de mesoderme, ectoderme e endoderme. Ainda, nossos resultados indicaram que em nossas condições, as biPSCs foram mais competentes comparadas as bESCs para a contribuição de blastocistos quiméricos quimeras. Por fim, nossos resultados demonstram que a reprogramação de biPSCs é possível em baixo e alto oxigênio. No entanto, a suplementação LIF2i e bFL2i (baixo oxigênio) não promoveram a auto renovação das biPSCs. Também, as biPSCs e bESCs geradas e isoladas apresentaram características de pluripotência, onde, biPSCs foram mais competentes em contribuir em quimeras embrionárias.

Abstract

Pluripotent stem cells are a crucial tool to embryology studies, to development *in vitro* clinical studies, to regenerative medicine and more recently, to gametes *in vitro* production. In 2006, Takahashi and collaborators demonstrated can be possible generate pluripotent stem cells by gene expression induction (induced pluripotent stem cells or iPSCs). However, *in vitro* culture and environmental conditions can modulate the reprogramming efficiency to pluripotency. Thus, the present thesis aimed to study the effects of oxygen and different sets of supplements for maintenance the pluripotency state during the bovine iPSC reprogramming window (biPSCs). In the first study, bovine fetal fibroblasts were reprogrammed in low or high oxygen and in different sets supplements for maintenance of pluripotency, bFGF or bFGF+LIF+CHIR+PD (bFL2i). In our conditions, low oxygen did not increase the reprogramming efficiency when compared to normoxia. On the other hand, bFL2i supplementation increased the reprogramming efficiency of biPSCs. The biPSCs derived in bFL2i low oxygen indicated the absence of self-renewal ability. The characterized biPSCs were positive for alkaline phosphatase, positive for expression of pluripotency marker genes (SOX2, OCT4 and STELLA), however, negative to NANOG. In addition, low oxygen increased the expression of GLUT1 and GLUT3. biPSCs were positive for OCT4 and SOX2, but negative for NANOG in immunofluorescence. The biPSCs were competent in forming embryoid bodies (EBs), also, EBs expressed markers of mesoderm and ectoderm, also, one biPSCs line expressed endoderm marker. In the second study, fetal bovine fibroblasts were reprogrammed with different supplements to maintain pluripotency (factorial 2x2; bFGF, bFGF2i, LIF, LIF2i), and embryonic stem cell lines were isolated to be compared with the generated biPSCs. The bFGF supplementation increased the reprogramming efficiency of biPSCs. The biPSCs derived with LIF2i indicated the absence of self-renewal ability. The biPSCs and bESCs were positive for alkaline phosphatase. The biPSCs and bESCs were positive for the expression of pluripotency marker genes (SOX2, OCT4, STELLA, LIFr and OTX2) and only the biPSCs expressed NANOG and ESRRb. In addition, biPSCs and bESCs were positive for SOX2, OCT4 and H3K27me3, negative for NANOG in immunofluorescence. The biPSCs and bESCs were competent to form embryoid bodies, which expressed markers of mesoderm, ectoderm and endoderm. Still, our results indicate biPSCs were more competent compared to bESCs for the chimeric blastocyst contribution. Finally, our results demonstrate the reprogramming of biPSCs is possible in low and high oxygen. However, supplementation LIF2i and bFL2i (low oxygen) did not promote self-renewal ability on biPSCs. Also, biPSCs and bESCs were generated and isolated and showed pluripotency characteristics, where biPSCs were more competent in contributing to embryonic chimeras.

Introduction

Pluripotent stem cells (PSCs) have two particular features, which are self-renewal and pluripotency. Self-renewal is the capacity to generate new cells with similar characteristics as the original cell, whereas pluripotency is the cell's ability to differentiate into all cell lines (somatic and germ line) from the adult organism (Ying *et al.* 2008). PSCs can be derived from blastocysts, by isolating embryonic stem cells (ESCs) lines or reprogramming differentiated cells, the called induced pluripotent stem cells (iPSCs). Both ESCs and iPSCs are pluripotent and have been receiving attention from the scientific community due to their potential applications such as: cellular agriculture, gamete generation, gene-edited animals (agricultural production or creating large animal models for human conditions), tissue generation and more. Associated with the numeric expansion, several studies investigate how to improve derivation of ESCs, the reprogramming efficiency of iPSCs, and the pluripotent state of ESCs and iPSCs. On this subject, several molecules, small molecules and inhibitors have been used to promote such characteristics.

A general compilation of these methods is presented in Chapter 1. This literature review addresses the first reports of PSCs, main strategies to derivate ESCs and reprogramming iPSCs on livestock species, their limitations and applications.

One of the challenges when working with iPSCs derived from differentiated cells of livestock species is the impossibility to compare results with other studies, especially because different transcription factors delivery methods, medium composition, growth factors and small molecules are often used. Still, different approaches were used to characterize cell lines and to test the differentiation capacity.

In the **Chapter 2**, bovine iPSCs were generated by lentiviral reprogramming using mouse OCT4, KLF4, SOX2 and C-MYC (mOKSM) transcription factors (TFs) into the fetal fibroblasts genome. The reprogramming was conducted in a 2x2 factorial experiment design, when we tested different oxygen tension (low x high oxygen, or 5% x 20%, respectively) and different sets of supplementations during culture (bFGF x bFGF+LIF+CHIR+PD, called bFL2i) to improve the reprogramming efficiency in biPSCs.

In the **Chapter 3**, bovine iPSCs were generated by lentiviral reprogramming on bovine fetal fibroblasts. The reprogramming was conducted in a 2x2 factorial experiment design, four sets of supplementations during culture (bFGF, bFGF+2i, LIF and LIF+2i) were tested to improve the reprogramming efficiency, and the pluripotent state in biPSCs. Additionally, bovine embryonic stem cells (bESCs) were derived to compare the pluripotent profile and characteristics to biPSCs. The pluripotent profile of biPSCs and bESCs were analyzed by RT-qPCR and immunostaining. Also, we evaluated biPSCs and bESCs on gold standard method to assess the differentiation ability of PSCs, producing and analyzing the contribution of biPSCs and bESCs on chimeric embryos. Finally, in **Chapter 4**, the final considerations of the findings of these studies are presented.

References

- 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., and Xiao L. (2011). Reprogramming of ovine adult fibroblasts to pluripotency via drug-inducible expression of defined factors. *Cell Res.* **21**, 600–8. doi:10.1038/cr.2011.6
- Bao S., Tang F., Li X., Hayashi K., Gillich A., Lao K., and Surani M. A. (2009). Epigenetic reversion of post-implantation epiblast to pluripotent embryonic stem cells. *Nature* **461**, 1292–1295. doi:10.1038/nature08534
- Batt P. A., Gardner D. K., and Cameron A. W. (1991). Oxygen concentration and protein source affect the development of preimplantation goat embryos in vitro. *Reprod. Fertil. Dev.* **3**, 601–607. <https://doi.org/10.1071/RD9910601>
- Behboodi E., Bondareva A., Begin I., Rao K., Neveu N., Pierson J. T., Wylie C., Piero F. D., Huang Y. J., Zeng W., Tanco V., Baldassarre H., Karatzas C. N., and Dobrinski I. (2011). Establishment of goat embryonic stem cells from in vivo produced blastocyst-stage embryos. *Mol. Reprod. Dev.* **78**, 202–211. doi:10.1002/mrd.21290
- Blomberg L., Hashizume K., and Viebahn C. (2008). Blastocyst elongation, trophoblastic differentiation, and embryonic pattern formation. *Reproduction* **135**, 181–95. doi:10.1530/REP-07-0355
- Bogliotti Y. S., Wu J., Vilarino M., Okamura D., Soto D. A., Zhong C., Sakurai M., Sampaio R. V., Suzuki K., Izpisua Belmonte J. C., and Ross P. J. (2018). Efficient derivation of stable primed pluripotent embryonic stem cells from bovine blastocysts. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **115**, 2090–2095. doi:10.1073/pnas.1716161115
- Brinster R. L. (1974). The effect of cells transferred into the mouse blastocyst on subsequent development. *J. Exp. Med.* **140**, 1049–1056. doi:10.1084/jem.140.4.1049
- Butler J. E., Anderson G. B., BonDurant R. H., Pashen R. L., and Penedo M. C. (1987). Production of ovine chimeras by inner cell mass transplantation. *J. Anim. Sci.* **65**, 317–24. doi:10.2527/jas1987.651325x
- Canizo J. R., Vazquez Echegaray C., Klisch D., Aller J. F., Paz D. A., Alberio R. H., Alberio R., and Guberman A. S. (2018). Exogenous human OKSM factors maintain

- pluripotency gene expression of bovine and porcine iPS-like cells obtained with STEMCCA delivery system. *BMC Res. Notes* **11**, 1–8. doi:10.1186/s13104-018-3627-8
- Cao H., Yang P., Pu Y., Sun X., Yin H., Zhang Y., Zhang Y., Li Y., Liu Y., Fang F., Zhang Z., Tao Y., and Zhang X. (2012). Characterization of bovine induced pluripotent stem cells by lentiviral transduction of reprogramming factor fusion proteins. *Int. J. Biol. Sci.* **8**, 498–511. doi:10.7150/ijbs.3723
- Carbognin E., Betto R. M., Soriano M. E., Smith A. G., and Martello G. (2016). Stat3 promotes mitochondrial transcription and oxidative respiration during maintenance and induction of naive pluripotency. *EMBO J.* **35**, 618–634. doi:10.15252/embj.201592629
- Cheng D., Li Z., Liu Y., Gao Y., and Wang H. (2012). Kinetic analysis of porcine fibroblast reprogramming toward pluripotency by defined factors. *Cell. Reprogram.* **14**, 312–23. doi:10.1089/cell.2012.0025
- Christians E. S. (2019). Totipotency continuity from zygote to early blastomeres: a Model Under Revision. *Reproduction* **158**, R49–R65. doi:10.1530/REP-18-0462
- Evans M. J., and Kaufman M. H. (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* **292**, 154–156. doi:10.1038/292154a0
- Ezashi T., Das P., and Roberts R. M. (2005). Low O₂ tensions and the prevention of differentiation of hES cells. **102**, 2–7.
- Fischer B., and Bavister B. D. (1993). Oxygen tension in the oviduct and uterus of rhesus monkeys, hamsters and rabbits. *J. Reprod. Fertil.* **99**, 673–679. doi:10.1530/jrf.0.0990673
- Folmes C. D. L., Dzeja P. P., Nelson T. J., and Terzic A. (2012). Metabolic plasticity in stem cell homeostasis and differentiation. *Cell Stem Cell* **11**, 596–606. doi:10.1016/j.stem.2012.10.002
- Folmes C. D. L., Nelson T. J., Martinez-Fernandez A., Arrell D. K., Lindor J. Z., Dzeja P. P., Ikeda Y., Perez-Terzic C., and Terzic A. (2011). Somatic oxidative bioenergetics transitions into pluripotency-dependent glycolysis to facilitate nuclear reprogramming. *Cell Metab.* **14**, 264–271. doi:10.1016/j.cmet.2011.06.011
- Forristal C. E., Wright K. L., Hanley N. A., Oreffo R. O. C., and Houghton F. D. (2010).

- Hypoxia inducible factors regulate pluripotency and proliferation in human embryonic stem cells cultured at reduced oxygen tensions. *Reproduction* **139**, 85–97. doi:10.1530/REP-09-0300
- Fujishiro S., Nakano K., Mizukami Y., Azami T., Arai Y., Matsunari H., Ishino R., Nishimura T., Watanabe M., Abe T., Furukawa Y., Umeyama K., Yamanaka S., Ema M., Nagashima H., and Hanazono Y. (2012). Generation of Naive-Like Porcine-Induced Pluripotent Stem Cells Capable of Contributing to Embryonic and Fetal Development. *Stem Cells Dev.* **22**, 473–82. doi:10.1089/scd.2012.0173
- Gardner R. L. (1968). Mouse chimaeras obtained by the injection of cells into the blastocyst. *Nature* **220**, 596–597. doi:10.1038/220596a0
- Guo G., Yang J., Nichols J., Hall J. S., Eyres I., Mansfield W., and Smith A. (2009). Klf4 reverts developmentally programmed restriction of ground state pluripotency. *Development* **136**, 1063–1069. doi:10.1242/dev.030957
- Guo H., Zhu P., Yan L., Li R., Hu B., Lian Y., Yan J., Ren X., Lin S., Li J., Jin X., Shi X., Liu P., Wang X., Wang W., Wei Y., Li X., Guo F., Wu X., Fan X., Yong J., Wen L., Xie S. X., Tang F., and Qiao J. (2014). The DNA methylation landscape of human early embryos. *Nature* **511**, 606–610. doi:10.1038/nature13544
- Gurdon J. B. (1962a). The developmental capacity of nuclei taken from intestinal epithelium cells of feeding tadpoles. *J. Embryol. Exp. Morphol.* **10**, 622–640. doi:10.1002/stem.684
- Gurdon J. B. (1962b). Adult frogs derived from the nuclei of single somatic cells. *Dev. Biol.* **4**, 256–273. doi:10.1016/0012-1606(62)90043-X
- Handyside A., Hooper M. L., Kaufman M. H., and Wilmut I. (1987). Towards the isolation of embryonal stem cell lines from the sheep. *Roux's Arch. Dev. Biol.* **196**, 185–190.
- Hanna J. H., Saha K., and Jaenisch R. (2010). Pluripotency and cellular reprogramming: Facts, hypotheses, unresolved issues. *Cell* **143**, 508–525. doi:10.1016/j.cell.2010.10.008
- Hassani S.-N., Totonchi M., Gourabi H., Schöler H. R., and Baharvand H. (2014). Signaling roadmap modulating naive and primed pluripotency. *Stem Cells Dev.* **23**, 193–208. doi:10.1089/scd.2013.0368

- Heo Y. T., Quan X., Xu Y. N., Baek S., Choi H., Kim N.-H. H., and Kim J. (2014). CRISPR/Cas9 Nuclease-Mediated Gene Knock-In in Bovine-Induced Pluripotent Cells. *Stem Cells Dev.* **00**, 1–10. doi:10.1089/scd.2014.0278
- Hirai H., Karian P., and Kikyo N. (2011). Regulation of embryonic stem cell self-renewal and pluripotency by leukaemia inhibitory factor. *Biochem. J.* **438**, 11–23. doi:10.1042/BJ20102152
- Huang B., Li T., Alonso-Gonzalez L., Gorre R., Keatley S., Green A., Turner P., Kallingappa P. K., Verma V., and Oback B. (2011). A virus-free poly-promoter vector induces pluripotency in quiescent bovine cells under chemically defined conditions of dual kinase inhibition. *PLoS One* **6**, 1–14. doi:10.1371/journal.pone.0024501
- Huang Y., Osorno R., Tsakiridis A., and Wilson V. (2012). In Vivo Differentiation Potential of Epiblast Stem Cells Revealed by Chimeric Embryo Formation. *CellReports* **2**, 1571–1578. doi:10.1016/j.celrep.2012.10.022
- Hyttel P., Sinowatz F., Vejlsted M., and Betteridge K. (2010). 'Essentials of Domestic Animal Embryology.' (Elsevier Health Sciences)
- Iannaccone P. M., Taborn G. U., Garton R. L., Caplice M. D., and Brenin D. R. (1994). Pluripotent Embryonic Stem Cells from the Rat Are Capable of Producing Chimeras. *Dev. Biol.* **163**, 288–292. doi:https://doi.org/10.1006/dbio.1994.1146
- Iwasaki S., Campbell K. H., Galli C., and Akiyama K. (2000). Production of live calves derived from embryonic stem-like cells aggregated with tetraploid embryos. *Biol. Reprod.* **62**, 470–475.
- Jia W., Yang W., Lei A., Gao Z., Yang C., Hua J., Huang W., Ma X., Wang H., and Dou Z. (2008). A caprine chimera produced by injection of embryonic germ cells into a blastocyst. *Theriogenology* **69**, 340–348. doi:10.1016/j.theriogenology.2007.08.037
- Kleinsmith L. J., and Pierce G. B. J. (1964). Multipotentiality of single embryonal carcinoma cells. *Cancer Res.* **24**, 1544–1551.
- Kumar D. (2015). Induced pluripotent stem cells: Mechanisms, achievements and perspectives in farm animals. *World J. Stem Cells.* doi:10.4252/wjsc.v7.i2.315
- Laureates N. (2012). The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2012. **1**, 1–7.
- Lee K.-H., Chuang C.-K., Wang H. W., Stone L., Chen C.-H., and Tu C.-F. (2007). An

- alternative simple method for mass production of chimeric embryos by coculturing denuded embryos and embryonic stem cells in Eppendorf vials. *Theriogenology* **67**, 228–237. doi:10.1016/j.theriogenology.2006.07.014
- Li Y., Cang M., Lee A. S., Zhang K., and Liu D. (2011). Reprogramming of sheep fibroblasts into pluripotency under a drug-inducible expression of mouse-derived defined factors. *PLoS One* **6**, 0–7. doi:10.1371/journal.pone.0015947
- Li M., Li Y. H., Hou Y., Sun X. F., Sun Q., and Wang W. H. (2004). Isolation and culture of pluripotent cells from in vitro produced porcine embryos. *Zygote* **12**, 43–48. doi:10.1017/S0967199404002679
- Li D., Secher J., Hyttel P., Ivask M., Kolko M., Hall V. J., and Freude K. K. (2018). Generation of transgene-free porcine intermediate type induced pluripotent stem cells. *Cell Cycle* **17**, 2547–2563. doi:10.1080/15384101.2018.1548790
- Li M., Zhang D., Hou Y., Jiao L., Zheng X., and Wang W. H. (2003). Isolation and culture of embryonic stem cells from porcine blastocysts. *Mol. Reprod. Dev.* **65**, 429–434. doi:10.1002/mrd.10301
- Lin Y.-C., Kuo K.-K., Wuputra K., Lin S.-H., Ku C.-C., Yang Y.-H., Wang S.-W., Wang S.-W., Wu D.-C., Wu C.-C., Chai C.-Y., Lin C.-L., Lin C.-S., Kajitani M., Miyoshi H., Nakamura Y., Hashimoto S., Matsushima K., Jin C., Huang S.-K., Saito S., and Yokoyama K. K. (2014). Bovine induced pluripotent stem cells are more resistant to apoptosis than testicular cells in response to mono-(2-ethylhexyl) phthalate. *Int. J. Mol. Sci.* **15**, 5011–31. doi:10.3390/ijms15035011
- Liu J., Balehosur D., Murray B., Kelly J. M., Sumer H., and Verma P. J. (2012). Generation and characterization of reprogrammed sheep induced pluripotent stem cells. *Theriogenology* **77**, 338–46.e1. doi:10.1016/j.theriogenology.2011.08.006
- Martin G. R. (1975). Teratocarcinomas as a model system for the study of embryogenesis and neoplasia. *Cell* **5**, 229–243. doi:10.1016/0092-8674(75)90098-7
- Martin G. R. (1981). Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **78**, 7634–7638. doi:10.1073/pnas.78.12.7634
- Martin G. R., and Evans M. J. (1975). Differentiation of clonal lines of teratocarcinoma

- cells: formation of embryoid bodies in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **72**, 1441–1445. doi:10.1073/pnas.72.4.1441
- Meinecke-Tillmann S., and Meinecke B. (1996). Isolation of ES-like cell lines from ovine and caprine preimplantation embryos. *J. Anim. Breed. Genet.* **113**, 413–426. doi:10.1111/j.1439-0388.1996.tb00632.x
- Miyoshi K., Taguchi Y., Sendai Y., Hoshi H., and Sato E. (2000). Establishment of a porcine cell line from in vitro-produced blastocysts and transfer of the cells into enucleated oocytes. *Biol. Reprod.* **62**, 1640–1646. doi:10.1095/biolreprod62.6.1640
- Moore N. W., Adams C. E., and Rowson L. E. (1968). Developmental potential of single blastomeres of the rabbit egg. *J. Reprod. Fertil.* **17**, 527–531.
- Nagy A.; Vintersten K.; Behringer R. (2003). 'Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual, 3rd ed.'
- Nagy K., Sung H.-K., Zhang P., Laflamme S., Vincent P., Agha-Mohammadi S., Woltjen K., Monetti C., Michael I. P., Smith L. C., and Nagy A. (2011). Induced Pluripotent Stem Cell Lines Derived from Equine Fibroblasts. *Stem Cell Rev. Reports* **7**, 693–702. doi:10.1007/s12015-011-9239-5
- Nakagawa M., Koyanagi M., Tanabe K., Takahashi K., Ichisaka T., Aoi T., Okita K., Mochiduki Y., Takizawa N., and Yamanaka S. (2008). Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nat. Biotechnol.* **26**, 101–106. doi:10.1038/nbt1374
- Närvä E., Pursiheimo J.-P., Laiho A., Rahkonen N., Emani M. R., Viitala M., Laurila K., Sahla R., Lund R., Lähdesmäki H., Jaakkola P., and Lahesmaa R. (2013). Continuous hypoxic culturing of human embryonic stem cells enhances SSEA-3 and MYC levels. *PLoS One* **8**, e78847. doi:10.1371/journal.pone.0078847
- Navarro M., Soto D. A., Pinzon C. A., Wu J., and Ross P. J. (2019). Livestock pluripotency is finally captured in vitro. *Reprod. Fertil. Dev.* **32**, 11–39. doi:10.1071/RD19272
- Nichols J., and Smith A. (2009). Naive and Primed Pluripotent States. *Cell Stem Cell* **4**, 487–492. doi:10.1016/j.stem.2009.05.015
- Okamoto I., Patrat C., Thépot D., Peynot N., Fauque P., Daniel N., Diabangouaya P., Wolf J. P., Renard J. P., Duranthon V., and Heard E. (2011). Eutherian mammals

- use diverse strategies to initiate X-chromosome inactivation during development. *Nature* **472**, 370–374. doi:10.1038/nature09872
- Okita K., Ichisaka T., and Yamanaka S. (2007). Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature* **448**, 313–317. doi:10.1038/nature05934
- Onishi A., Takeda K., Komatsu M., Akita T., and Kojima T. (1994). Production of chimeric pigs and the analysis of chimerism using mitochondrial deoxyribonucleic acid as a cell marker. *Biol. Reprod.* **51**, 1069–1075. doi:10.1095/biolreprod51.6.1069
- Pieri N. C. G., de Souza A. F., Botigelli R. C., Machado L. S., Ambrosio C. E., dos Santos Martins D., de Andrade A. F. C., Meirelles F. V., Hyttel P., and Bressan F. F. (2019). Stem cells on regenerative and reproductive science in domestic animals. *Veterinary Research Communications* **43**, 7–16. doi:10.1007/s11259-019-9744-6
- Roach M., Wang L., Yang X., and Tian X. C. (2006). Bovine Embryonic Stem Cells. *Methods Enzymol.* **418**, 21–37. doi:10.1016/S0076-6879(06)18002-7
- Robinton D. A., and Daley G. Q. (2012). The promise of induced pluripotent stem cells in research and therapy. *Nature* **481**, 295–305. doi:10.1038/nature10761
- Ross P. J., Ragina N. P., Rodriguez R. M., Iager A. E., Siripattarapivat K., Lopez-Corrales N., and Cibelli J. B. (2008). Polycomb gene expression and histone H3 lysine 27 trimethylation changes during bovine preimplantation development. *Reproduction* **136**, 777–785. doi:10.1530/REP-08-0045
- Rossant J. (2001). Stem cells from the Mammalian blastocyst. *Stem Cells* **19**, 477–482. doi:10.1634/stemcells.19-6-477
- Rossant J. (2008). Stem cells and early lineage development. *Cell* **132**, 527–31. doi:10.1016/j.cell.2008.01.039
- Rossant J., and Frels W. I. (1980). Interspecific chimeras in mammals: successful production of live chimeras between *Mus musculus* and *Mus caroli*. *Science* **208**, 419–421. doi:10.1126/science.7367871
- Sahakyan A., Kim R., Chronis C., Sabri S., Bonora G., Theunissen T. W., Kuoy E., Langerman J., Clark A. T., Jaenisch R., and Plath K. (2017). Human Naive Pluripotent Stem Cells Model X Chromosome Dampening and X Inactivation. *Cell*

- Stem Cell* **20**, 87–101. doi:10.1016/j.stem.2016.10.006
- Saito S., and Niemann H. (1991). Effects of extracellular matrices and growth factors on the development of isolated porcine blastomeres. *Biol. Reprod.* **44**, 927–936. doi:10.1095/biolreprod44.5.927
- Saito S., Strelchenko N., and Niemann H. (1992). Bovine embryonic stem cell-like cell lines cultured over several passages. *Roux's Arch. Dev. Biol.* **201**, 134–141. doi:10.1007/BF00188711
- Sánchez F., and Smitz J. (2012). Molecular control of oogenesis. *Biochim. Biophys. Acta* **1822**, 1896–912. doi:10.1016/j.bbadis.2012.05.013
- Schoonjans L., Albright G. M., Li J. L., Collen D., and Moreadith R. W. (1996). Pluripotential rabbit embryonic stem (ES) cells are capable of forming overt coat color chimeras following injection into blastocysts. *Mol. Reprod. Dev.* **45**, 439–443. doi:10.1002/(SICI)1098-2795(199612)45:4<439::AID-MRD5>3.0.CO;2-S
- Sciorio R., and Smith G. D. (2019). Embryo culture at a reduced oxygen concentration of 5%: a mini review. *Zygote* **27**, 355–361. doi:10.1017/S0967199419000522
- Sim Y. J., Kim M. S., Nayfeh A., Yun Y. J., Kim S. J., Park K. T., Kim C. H., and Kim K. S. (2017). 2iL Maintains a Naive Ground State in ESCs through Two Distinct Epigenetic Mechanisms. *Stem Cell Reports* **8**, 1312–1328. doi:10.1016/j.stemcr.2017.04.001
- Singh V. K., Kalsan M., Kumar N., Saini A., and Chandra R. (2015). Induced pluripotent stem cells: Applications in regenerative medicine, disease modeling, and drug discovery. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. doi:10.3389/fcell.2015.00002
- Solter D., Skreb N., and Damjanov I. (1970). Extrauterine growth of mouse egg-cylinders results in malignant teratoma. *Nature* **227**, 503–504. doi:10.1038/227503a0
- Soto D. A., and Ross P. J. (2016). Pluripotent stem cells and livestock genetic engineering. *Transgenic Res.* **25**, 289–306. doi:10.1007/s11248-016-9929-5
- Sperber H., Mathieu J., Wang Y., Ferreccio A., Hesson J., Xu Z., Fischer K. A., Devi A., Detraux D., Gu H., Battle S. L., Showalter M., Valensisi C., Bielas J. H., Ericson N. G., Margaretha L., Robitaille A. M., Margineantu D., Fiehn O., Hockenbery D., Blau

- C. A., Raftery D., Margolin A. A., Hawkins R. D., Moon R. T., Ware C. B., and Ruohola-baker H. (2015). The metabolome regulates the epigenetic landscape during naive-to-primed human embryonic stem cell transition. *Nat. Cell Biol.* **17**, 1523–1535. doi:10.1038/ncb3264
- Stevens L. C. (1970). The development of transplantable teratocarcinomas from intratesticular grafts of pre- and postimplantation mouse embryos. *Dev. Biol.* **21**, 364–382. doi:10.1016/0012-1606(70)90130-2
- Stevens L. C., and Little C. C. (1954). Spontaneous Testicular Teratomas in an Inbred Strain of Mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **40**, 1080–1087. doi:10.1073/pnas.40.11.1080
- Strojek R. M., Reed M. A., Hoover J. L., and Wagner T. E. (1990). A method for cultivating morphologically undifferentiated embryonic stem cells from porcine blastocysts. *Theriogenology* **33**, 901–913.
- Sumer H., Liu J., Malaver-Ortega L. F., Lim M. L., Khodadadi K., and Verma P. J. (2011). NANOG is a key factor for induction of pluripotency in bovine adult fibroblasts. *J. Anim. Sci.* **89**, 2708–2716. doi:10.2527/jas.2010-3666
- Takahashi K., Tanabe K., Ohnuki M., Narita M., Ichisaka T., Tomoda K., and Yamanaka S. (2007). Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* **131**, 861–72. doi:10.1016/j.cell.2007.11.019
- Takahashi K., and Yamanaka S. (2006). Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell* **126**, 663–676. doi:10.1016/j.cell.2006.07.024
- Tarkowski A. K. (1961). Mouse Chimæras Developed from Fused Eggs. *Nature* **190**, 857–860. doi:10.1038/190857a0
- Telugu B. P. V. L., Ezashi T., and Roberts R. M. (2010). Porcine induced pluripotent stem cells analogous to nave and primed embryonic stem cells of the mouse. *Int. J. Dev. Biol.* **54**, 1703–1711. doi:10.1387/ijdb.103200bt
- Telugu B. P. V. L., Ezashi T., Sinha S., Alexenko A. P., Spate L., Prather R. S., and Roberts R. M. (2011). Leukemia Inhibitory Factor (LIF)-dependent, pluripotent stem cells established from inner cell mass of porcine embryos. *J. Biol. Chem.* **286**, 28948–28953. doi:10.1074/jbc.M111.229468

- Tesar P. J., Chenoweth J. G., Brook F. A., Davies T. J., Evans E. P., Mack D. L., Gardner R. L., and McKay R. D. G. (2007). New cell lines from mouse epiblast share defining features with human embryonic stem cells. *Nature* **448**, 196–199. doi:10.1038/nature05972
- Thomson J. A., Itskovitz-Eldor J., Shapiro S. S., Waknitz M. A., Swiergiel J. J., Marshall V. S., and Jones J. M. (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* (80-.). **282**, 1145–1147. doi:10.1126/science.282.5391.1145
- Thomson J. A., Kalishman J., Golos T. G., Durning M., Harris C. P., Becker R. A., and Hearn J. P. (1995). Isolation of a primate embryonic stem cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**, 7844–7848. doi:10.1073/pnas.92.17.7844
- Tian H. Bin, Wang H., Sha H. Y., Xu X. J., Zhu M., Wu Y. B., Cheng S. H., Chen J. Q., Shi Y. X., Bai Z. L., and Cheng G. X. (2006). Factors derived from mouse embryonic stem cells promote self-renewal of goat embryonic stem-like cells. *Cell Biol. Int.* **30**, 452–458. doi:10.1016/j.cellbi.2006.02.006
- Vajta G., Peura T. T., Holm P., Paldi A., Greve T., Trounson A. O., and Callesen H. (2000). New method for culture of zona-included or zona-free embryos: the Well of the Well (WOW) system. *Mol. Reprod. Dev.* **55**, 256–264. doi:10.1002/(SICI)1098-2795(200003)55:3<256::AID-MRD3>3.0.CO;2-7 [pii] 10.1002/(SICI)1098-2795(200003)55:3<256::AID-MRD3>3.0.CO;2-7
- Viswanathan S. R., Daley G. Q., and Gregory R. I. (2008). Selective blockade of microRNA processing by Lin28. *Science* **320**, 97–100. doi:10.1126/science.1154040
- Wang H., and Dey S. K. (2006). Roadmap to embryo implantation: Clues from mouse models. *Nat. Rev. Genet.* **7**, 185–199. doi:10.1038/nrg1808
- Wang L., Duan E., Sung L. Y., Jeong B. S., Yang X., and Tian X. C. (2005). Generation and characterization of pluripotent stem cells from cloned bovine embryos. *Biol. Reprod.* **73**, 149–155. doi:10.1095/biolreprod.104.037150
- Weinberger L., Ayyash M., Novershtern N., and Hanna J. H. (2016). Dynamic stem cell states : naive to primed pluripotency in rodents and humans. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **17**, 155–69. doi:10.1038/nrm.2015.28
- Weissman I. L. (2000). Stem cells: units of development, units of regeneration, and

- units in evolution. *Cell* **100**, 157–168. doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81692-X
- Whitworth D. J., Ovchinnikov D. A., Sun J., Fortuna P. R. J., and Wolvetang E. J. (2014). Generation and characterization of leukemia inhibitory factor-dependent equine induced pluripotent stem cells from adult dermal fibroblasts. *Stem Cells Dev.* **23**, 1515–1523. doi:10.1089/scd.2013.0461
- Willadsen S. M. (1980). The viability of early cleavage stages containing half the normal number of blastomeres in the sheep. *J. Reprod. Fertil.* **59**, 357–362. doi:10.1530/jrf.0.0590357
- Wilmot I., Schnieke a E., McWhir J., Kind a J., and Campbell K. H. S. (1997). Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* **385**, 810–813. doi:10.1038/385810a0
- Wu J., Ocampo A., and Belmonte J. C. I. (2016). Cellular Metabolism and Induced Pluripotency. *Cell* **166**, 1371–1385. doi:10.1016/j.cell.2016.08.008
- Wu J., Okamura D., Li M., Suzuki K., Luo C., Ma L., He Y., Li Z., Benner C., Tamura I., Krause M. N., Nery J. R., Du T., Zhang Z., Hishida T., Takahashi Y., Aizawa E., Kim N. Y., Lajara J., Guillen P., Campistol J. M., Esteban C. R., Ross P. J., Saghatelian A., Ren B., Ecker J. R., and Belmonte J. C. I. (2015). An alternative pluripotent state confers interspecies chimaeric competency. *Nature* **521**, 316–321. doi:10.1038/nature14413
- Wu J., Platero-Luengo A., Sakurai M., Sugawara A., Gil M. A., Yamauchi T., Suzuki K., Bogliotti Y. S., Cuello C., Morales Valencia M., Okumura D., Luo J., Vilariño M., Parrilla I., Soto D. A., Martinez C. A., Hishida T., Sánchez-Bautista S., Martinez-Martinez M. L., Wang H., Nohalez A., Aizawa E., Martinez-Redondo P., Ocampo A., Reddy P., Roca J., Maga E. A., Esteban C. R., Berggren W. T., Nuñez Delicado E., Lajara J., Guillen I., Guillen P., Campistol J. M., Martinez E. A., Ross P. J., and Izpisua Belmonte J. C. (2017). Interspecies Chimerism with Mammalian Pluripotent Stem Cells. *Cell* **168**, 473-486.e15. doi:10.1016/j.cell.2016.12.036
- Yadav P. S., Kues W. A., Herrmann D., Carnwath J. W., and Niemann H. (2005). Bovine ICM derived cells express the Oct4 ortholog. *Mol. Reprod. Dev.* **72**, 182–190. doi:10.1002/mrd.20343

- Ying Q.-L. L., Wray J., Nichols J., Batlle-Morera L., Doble B., Woodgett J., Cohen P., and Smith A. (2008). The ground state of embryonic stem cell self-renewal. *Nature* **453**, 519–523. doi:10.1038/nature06968
- Yoshida Y., Takahashi K., Okita K., Ichisaka T., and Yamanaka S. (2009a). Hypoxia Enhances the Generation of Induced Pluripotent Stem Cells. *Cell Stem Cell* **5**, 237–241. doi:10.1016/j.stem.2009.08.001
- Yoshida Y., Takahashi K., Okita K., Ichisaka T., and Yamanaka S. (2009b). Brief Report Hypoxia Enhances the Generation of Induced Pluripotent Stem Cells. *Stem Cell* **5**, 237–241. doi:10.1016/j.stem.2009.08.001
- Yu J., Hu K., Smuga-otto K., Tian S., Stewart R., Igor I., and Thomson J. A. (2009). Human Induced Pluripotent Stem Cells Free of Vector and Transgene Sequences. *Scie* **324**, 797–801. doi:10.1126/science.1172482.Human
- Yu J., Vodyanik M. A., Smuga-Otto K., Antosiewicz-Bourget J., Frane J. L., Tian S., Nie J., Jonsdottir G. A., Ruotti V., Stewart R., Slukvin I. I., and Thomson J. A. (2007). Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* **318**, 1917–1920. doi:10.1126/science.1151526
- Yu L., Wei Y., Sun H. X., Mahdi A. K., Pinzon Arteaga C. A., Sakurai M., Schmitz D. A., Zheng C., Ballard E. D., Li J., Tanaka N., Kohara A., Okamura D., Mutto A. A., Gu Y., Ross P. J., and Wu J. (2020). Derivation of Intermediate Pluripotent Stem Cells Amenable to Primordial Germ Cell Specification. *Cell Stem Cell* **28**, 1–18. doi:10.1016/j.stem.2020.11.003
- Zhang W., Pei Y., Zhong L., Wen B., Cao S., and Han J. (2015). Pluripotent and Metabolic Features of Two Types of Porcine iPSCs Derived from Defined Mouse and Human ES Cell Culture Conditions. *PLoS One* **10**, e0124562. doi:10.1371/journal.pone.0124562
- Zhang J., Ratanasirintrawoot S., Chandrasekaran S., Wu Z., Ficarro S. B., Yu C., Ross C. A., Cacchiarelli D., Xia Q., Seligson M., Shinoda G., Xie W., Cahan P., Wang L., Ng S. C., Tintara S., Trapnell C., Onder T., Loh Y. H., Mikkelsen T., Sliz P., Teitell M. A., Asara J. M., Marto J. A., Li H., Collins J. J., and Daley G. Q. (2016). LIN28 Regulates Stem Cell Metabolism and Conversion to Primed Pluripotency. *Cell Stem Cell* **19**, 66–80. doi:10.1016/j.stem.2016.05.009

Zhou W., Choi M., Margineantu D., Hesson J., Cavanaugh C., Anthony C., Horwitz M. S., Hockenbery D., Ware C., and Ruohola-baker H. (2012). HIF1 α induced switch from bivalent to exclusively glycolytic metabolism during ESC-to-EpiSC / hESC transition. *EMBO J.* **31**, 2103–2116. doi:10.1038/emboj.2012.71

Curriculum Vitae

EDUCATION

PhD student in Pharmacology and Biotechnology, São Paulo State University (UNESP) (2016-current) / University of California Davis (UC Davis)

Master of Science in Animal Science, University of Sao Paulo (USP), Brazil (2011-2014)

Biological Science, Centro Universitário Herminio Ometto de Araras (UNIARARAS), Brazil (2007-2010)

Public defense of PhD: 05/05/2021

VISITING SCHOLAR

University of California Davis, USA

Effective date (Start): August 21, 2019

Effective date (End): May 20, 2020

Title: “Trophectoderm Complementation Assay for pluripotent cells: a proposal for assessing pluripotency in cattle”

Supervisor: Prof Pablo J Ross

Funding: FAPESP-Brazil (19/10751-0)

Instituto Leloir, LELOIR, Argentina.

Effective date (Start): September 4, 2017

Effective date (End): September 17, 2020

Title: “Human induced pluripotent stem cells (hiPSCs), generation, maintenance and basic characterization”

Supervisor: Fernando Pitossi

Funding: CBAB/CABBIO

AREAS OF RESEARCH AND LAB TECHNIQUES

- Stem Cells (iPSCs and ESCs)

Related methods: Isolation and characterization of embryonic stem cells, iPSC generation and characterization, in vitro differentiation.

- Epigenetics and molecular biology

Interest: small molecules on pluripotent state of iPSCs and ESCs, oxygen tension on pluripotent state of iPSCs and ESCs.

- Bovine embryo production

Related methods: General medium production, oocyte collection and maturation, in vitro fertilization, embryo culturing.

- LAB TECHNIQUES

Immunostaining, confocal analysis, gene expression by RT-qPCR, gene knockdown by siRNA, transfection, lentivirus production, micromanipulation of zygotes and embryos, chimeric embryos.

BIBLIOGRAPHY

MANUSCRIPTS IN PREPARATION

Generation of human progenitor primordial germ cell-like in Turner syndrome patients

Aline Fernanda de Souza; Fabiana Fernandes Bressan; Naira Caroline Godoy Pieri; **Ramon Botigelli**; Ester Silveira Ramos; Willian Allan King, Flavio Vieira Meirelles

Generation of porcine primordial germ cells-like (PGCLCs) from induced pluripotent stem cells with different profile phenotypes related of the culture condition.

Naira Caroline Godoy Pieri, Aline Fernanda de Souza; Ramon Cesar Botigelli, Laís Vicari de Figueiredo Pessôa; Kaiana Rechia; Mayra Hirakawa Glória; Raquel Vasconcelos Guimarães de Castro; Diego Leal; Paulo Fantinato-Neto, Daniele dos Santos Martins; Flávio Vieira Meirelles; André Furugen C. Andrade; Fabiana Fernandes Bressan

Bovine induced pluripotent stem cells are affected by oxygen levels during the reprogramming process

Brendon Bessi; Ramon Botigelli; Pamela Moraes; Naira Caroline Godoy Pieri; Aline Fernanda de Souza; Raquel de Castro; Flavio Vieira Meirelles; Fabiana Fernandes Bressan;

Different small molecules and maintenance agents affect reprogramming process and pluripotency state of bovine-induced pluripotent stem cells

Ramon Cesar Botigelli; Naira Carolina Godoy Pieri; Brendon Bessi; Aline Fernanda Souza, Raquel Castro; Flávio Vieira Meirelles; Fabiana Fernandes Bressan; Marcelo Fábio Gouveia Nogueira

SUBMITTED MANUSCRIPTS

Embryonic microRNAs are essential for bovine preimplantation embryo development. **PNAS**
Erika E Paulson; Emily Lillian Fishman; Ramon C. Botigelli; Richard M Schultz; Pablo J Ross

In vitro induced pluripotency from urine-derived cells in swine. **Scientific reports.**

Kaiana Recchia; Lucas S. Machado; Ramon C. Botigelli; Naira C. G. Pieri; Gabriela Barbosa; Brendon W. Bessi; Raquel V. G. Castro; Lais V. F. Pessôa; Paulo Fantinato Neto; Flavio V. Meirelles; Aline F. Souza; Simone M. M. K. Martins; Fabiana F. Bressan

Genomic and Phenotypic Analyses of Antral Follicle Count in Aberdeen Angus Cows. **Livestock Science.**

Gerson Oliveira Junior, Vinícius G. Pinheiro, Pablo Augusto de Souza Fonseca, Camila B. Costa, Elisa Mariano Pioltine, Ramon Botigelli, Eduardo Razza, Ronaldo L. Ereno, Jose Bento Ferraz, Marcelo M. Seneda

FULL LENGTH PEER REVIEWED PUBLICATIONS:

10 in total – h-index 5; Total number of citations currently 38.

Number of citation for each manuscript are given in parentheses [] where applicable.

1. de Lima, Marina Amaro; Morotti, Fábio; Bayeux, Bernardo Marcozzi; de Rezende, Rômulo Germano; Botigelli, Ramon Cesar; De Bem, Tiago Henrique Camara; Fontes, Patrícia Kubo; Nogueira, Marcelo Fábio Gouveia; Meirelles, Flávio Vieira; Baruselli, Pietro Sampaio;. Ovarian follicular dynamics, progesterone concentrations, pregnancy rates and transcriptional patterns in Bos indicus females with a high or low antral follicle count. **Scientific reports**. (2020) 10 (1), 1-13.
2. Machado, Lucas Simões; Pieri, Naira Caroline Godoy; Botigelli, Ramon Cesar; de Castro, Raquel Vasconcelos Guimarães; de Souza, Aline Fernanda; Bridi, Alessandra; Lima, Marina Amaro; Fantinato Neto, Paulo; de Figueiredo Pessôa, Laís Vicari; Martins, Simone Maria Massami Kitamura;. Generation of neural progenitor cells (NPC) from porcine induced pluripotent stem cells (piPSC). **Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine**. (2020).
3. Pioltine, Elisa M; Machado, Mariana F; da Silveira, Juliano C; Fontes, Patrícia K; Botigelli, Ramon C; Quaglio, Ana Elisa V; Costa, Camila B; Nogueira, Marcelo FG;. Can extracellular vesicles from bovine ovarian follicular fluid modulate the in-vitro oocyte meiosis progression similarly to the CNP-NPR2 system?. **Theriogenology**. (2020) 157 210-217. [1]

4. Pieri, Naira Caroline Godoy; de Souza, Aline Fernanda; Botigelli, Ramon Cesar; Machado, Lucas Simões; Ambrosio, Carlos Eduardo; dos Santos Martins, Daniele; de Andrade, André Furugen Cesar; Meirelles, Flavio Vieira; Hyttel, Poul; Bressan, Fabiana Fernandes;. Stem cells on regenerative and reproductive science in domestic animals. **Veterinary research communications**. (2019) 43 (1), 7-16. [5]
5. Machado, LS; de Souza, AF; Pieri, NCG; Botigelli, RC; Recchia, K; Martins, D dos S; Meirelles, FV; de Andrade, AFC; Bressan, FF;. Induced pluripotent stem cells (iPS cells) in domestic animals and the possibility to generate gametes in vitro. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. (2018) 42 (3/4), 114-119. [1]
6. Botigelli, Ramon Cesar; Razza, Eduardo Montanari; Pioltine, Elisa Mariano; Fontes, Patricia Kubo; Schwarz, Kátia Regina Lancellotti; Leal, Cláudia Lima Verde; Nogueira, Marcelo Fábio Gouveia;. Supplementing in vitro embryo production media by NPPC and sildenafil affect the cytoplasmic lipid content and gene expression of bovine cumulus-oocyte complexes and embryos. **Reproductive Biology**. (2018) 18(1) 66-75. [5]
7. Schwarz, Kátia RL; de Castro, Fernanda C; Schefer, Letícia; Botigelli, Ramon C; Paschoal, Daniela M; Fernandes, Hugo; Leal, Cláudia LV;. The role of cGMP as a mediator of lipolysis in bovine oocytes and its effects on embryo development and cryopreservation. **PLoS ONE**. (2018) 13(1). [8]
8. Schwarz, Kátia RL; Botigelli, Ramon Cesar; Del Collado, Maite; de Castro, Fernanda Cavallari; Fernandes, Hugo; Paschoal, Daniela M; Leal, Cláudia Lima Verde;. Effects of fetal calf serum on cGMP pathway and oocyte lipid metabolism in vitro. **Reproduction, Fertility and Development**. (2017) 29(8) 1593. [6]
9. Botigelli, Ramon Cesar; Schwarz, Katia Lancellotti; Zaffalon, Fabiane Gilli; Del Collado, Maite; Castro, Fernanda Cavallari; Fernandes, Hugo; Leal, Claudia Lima Verde;. Influence

of nitric oxide and phosphodiesterases during in vitro maturation of bovine oocytes on meiotic resumption and embryo production. **Zygote**. (2017) 25(3) 321-330. [4]

10. Botigelli, Ramon Cesar; Razza, Eduardo Montanari; Pioltine, Elisa Mariano; Nogueira, Marcelo Fábio Gouveia;. New approaches regarding the in vitro maturation of oocytes: Manipulating cyclic nucleotides and their partners in crime. **Jornal Brasileiro de Reproducao Assistida**. (2017) 21(1) 35-44. [7]

CONFERENCE ABSTRACTS POSTERS:

R Botigelli, N Pieri, B Bessi, R de Castro, K Recchia, A de Souza, G Barbosa, F Meirelles, F Bressan, M Nogueira. Different pluripotency maintenance supplements affect the reprogramming process and pluripotency state of bovine-induced pluripotent stem cells. **IETS** New York, 46th Annual Conference 2020.

BOTIGELLI, RC; PIERI, NCG; MACHADO, LS; CASTRO, R; SOUZA, AF; MEIRELLES, FV; BRESSAN, FF; NOGUEIRA, MFG. Cellular reprogramming by defined factors of GFP expressing fetal fibroblasts in cattle: preliminary results on culture optimization. **SBTE** Florianópolis – Santa Catarina/BR, 2018.

BOTIGELLI, RC; RAZZA, EM; PIOLTINE, EM; FONTES, PK; SCHWARZ, KRL; LEAL, CLV; NOGUEIRA, MFG. Cyclic GMP modulators (NPPC and Sildenafil) effects during in vitro maturation on cytoplasmic lipid content and transcripts abundance in bovine cumulus-oocyte complexes and embryos. **SBTE** Cabo de Santo Agostinho – Pernambuco/BR, 2017.

BOTIGELLI, RC; SCHWARZ, KRL; DEL COLLADO, M; CASTRO, FC; FERNANDES, H; LEAL, CLV. Effects of Snap and/or cilostamide supplementation during bovine oocyte in vitro maturation on maturation kinetics and embryo production. **SBTE** Foz do Iguaçu – Parana/BR, 2016.

BOTIGELLI, RC; MACHADO, MF; FONTES, PK; RAZZA, EM; PIOLTINE, EM; LEAL, CLV; BARROS, CM; NOGUEIRA, MFG. Expression of Lh receptor in bovine cumulus oophorus cells is modulated by follicular diameter and the gonadotropins stimulus. **SBTE** Gramado – Rio Grande do Sul/BR, 2015.

RC Botigelli, KRL Schwarz, FG Zaffalon, CLV Leal. INFLUENCE OF NITRIC OXIDE AND PHOSPHODIESTERASE INHIBITORS ON CYCLIC NUCLEOTIDES AND MEIOSIS RESUMPTION IN BOVINE OOCYTES IN VITRO MATURED. **IETS** Versailles, 41th Annual Conference 2015.

BOTIGELLI, RC; SCHWARZ, KRL; ZAFFALON, FG; CASTRO, FC; CUNHA, MCRV; FERNANDES, H; GARCIA, LM; CRUZ, MHC; LEAL, CLV. Influence of nitric oxide in the levels of cyclic nucleotides and the resumption of meiosis during in vitro maturation of bovine oocytes. **SBTE** Praia do Forte – Bahia/BR, 2013.

AWARD:

2015 - 2º Students competition of SBTE meeting. Is the NPPC/NPR2 system, described for murine model, applied to bovine antral follicles?