

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

RELATÓRIO FINAL DO ESTÁGIO CURRICULAR OBRIGATÓRIO DO CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA, REALIZADO JUNTO AO LABORATÓRIO DE MORFOFISIOLOGIA MOLECULAR E DO DESENVOLVIMENTO, FZEA/USP, PIRASSUNUNGA, SP.

Caso de interesse: Imortalização celular de fibroblastos de cervo-do-pantanal (*Blastocerus dichotomus*) visando a conservação prolongada de material biológico.

Nome do autor: Janaína Mattos Lopes Torres

Orientador: Prof. Dr. José Maurício Barbanti Duarte
Supervisor: Prof(a). Dra. Fabiana Fernandes Bressan

JABOTICABAL – S.P.
2º SEMESTRE DE 2025.

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

Caso de interesse: Imortalização celular de fibroblastos de cervo-do-pantanal (*Blastocerus dichotomus*) visando a conservação prolongada de material biológico.

Janaína Mattos Lopes Torres

Orientador: Prof. Dr. José Maurício Barbanti Duarte
Relatório do Estágio Curricular em Prática Veterinária
apresentado à Faculdade de Ciências Agrárias e
Veterinárias, Câmpus de Jaboticabal, Unesp, para
graduação em Medicina Veterinária

JABOTICABAL – S.P.

2º semestre/2025.

T693r

Torres, Janaina Mattos Lopes

Relatório final do estágio curricular obrigatório do curso de medicina veterinária, realizado junto ao laboratório de morfofisiologia molecular e do desenvolvimento, fzea/usp, pirassununga, sp. Caso de interesse: Imortalização celular de fibroblastos de cervo-do-pantanal (*Blastocerus dichotomus*) visando a conservação prolongada de material biológico. / Janaina Mattos Lopes Torres. -- Jaboticabal, 2025

60 p. : il., tabs., fotos

Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Medicina Veterinária) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal

Orientador: José Maurício Barbanti Duarte

1. Medicina veterinária. 2. Genética animal. 3. Senescência celular. 4. Cervídeo. 5. Técnicas de cultura de células. I. Título.

Janaina Mattos Lopes Torres

RELATÓRIO FINAL DO ESTÁGIO CURRICULAR OBRIGATORIO DO CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA, REALIZADO JUNTO AO LABORATÓRIO DE MORFOFISIOLOGIA MOLECULAR E DO DESENVOLVIMENTO, FZEA/USP, PIRASSUNUNG-SP. : Caso de interesse: Imortalização celular de fibroblastos de cervo do pantanal (*Blastocerus dichotomus*) visando a conservação prolongada de material biológico.

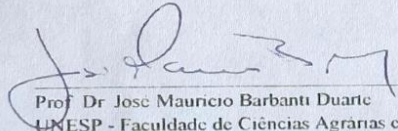
Relatório de Estágio em Prática Veterinária apresentado à Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, para obtenção do título de Bacharel em Medicina Veterinária

Orientador Prof. Dr. José Mauricio Barbanti Duarte
Coorientador (se houver)

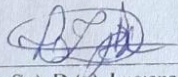
Área de Concentração Genética animal

Trabalho aprovado em 28/11/2025

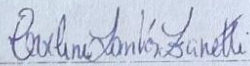
Banca Examinadora



Prof. Dr. José Mauricio Barbanti Duarte
UNESP - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Campus de Jaboticabal



Prof(a) Dr(a) Luciana Dimiz Rola
UNESP - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Campus de Jaboticabal



Dr(a) Eveline dos Santos Zanetti
CCCP - Centro de Conservação do Cervo do Pantanal TIJOA

Documento assinado digitalmente
 CAIO JOSÉ XAVIER ABIMUSSI
Data: 01.12.2025 13:48:58-0300
Verifique em <https://validar.dig.gov.br>

Prof. Dr. Caio José Xavier Abimussi - Coordenador de Estágio do Curso de Medicina Veterinária

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus por me conceder cada oportunidade que tive nesta caminhada, desde a entrada na graduação até a realização do estágio obrigatório.

À minha família agradeço especialmente aos meus avós maternos Jairo e Maria Aparecida, ao meu pai Wanderlei e, em destaque, à minha mãe, Estelita. Que fizeram o possível e o impossível para que eu conseguisse alcançar meus objetivos, fornecendo apoio inimaginável quando foi necessário.

Quero agradecer também à Professora Rosemeri de Oliveira Vasconcelos, minha primeira orientadora na graduação, por ter me concedido as primeiras oportunidades em âmbito acadêmico, por todo o conhecimento que pacientemente me ensinou e, por fim, por ter me apoiado com cada etapa que realizei.

Ao meu orientador, Professor José Maurício Barbanti Duarte, por ter me apresentado o mundo da conservação de animais selvagens, que se tornou uma grande inspiração na área. Agradeço imensamente pelo tempo, pela paciência e por cada ensinamento e orientação nesses anos de graduação.

Agradeço a todos os meus amigos que fiz nesta caminhada e que estiveram torcendo por mim: aqueles que estiveram comigo antes da universidade, aqueles que fiz no caminho em Jaboticabal ou na correria de estágios.

Gostaria de agradecer também a toda a equipe e aos funcionários do Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos (NUPECCE) por toda a cumplicidade ao longo desses anos, seja no cotidiano do laboratório, nas coletas, nos estágios ou nas confraternizações. Também se tornam amigos e, com certeza, são profissionais que me inspiram. Tenho muito orgulho de ter feito parte desse projeto tão importante para a conservação dos cervídeos brasileiros.

Agradeço imensamente também à professora Fabiana Fernandes Bressan pela oportunidade e pelo tempo concedidos. Assim como a toda a equipe do laboratório do LMMD, que me auxiliou no desenvolvimento deste projeto e proporcionou um período de estágio obrigatório de aprendizagem. Gostaria de agradecer também às meninas da República Red Bull, que me acompanharam nesse período.

Agradeço também aos animais que estiveram presentes em toda a minha trajetória, me ensinando a me tornar uma médica veterinária, em especial aos animais

dos meus experimentos de iniciação científica e àqueles que deram origem a este trabalho. Desde já, meus mais sinceros agradecimentos.

Por fim, agradeço à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal, unidade pertencente à UNESP, pela qualidade do ensino em todos esses cinco anos de graduação. Obrigada a todos os professores, funcionários, colegas e animais de estudo. Com certeza levarei parte de cada um de vocês para sempre.

SUMÁRIO

I- RELATÓRIO DE ESTÁGIO OBRIGATÓRIO	1
1. Introdução	1
2. Descrição do local de estágio.....	1
2.1. Reprocel	3
3. Descrição de atividades do estágio	5
3.1. Atividades acompanhadas.	5
3.1.1. Cultura de células	5
3.1.2. Isolamento de fibroblastos embrionários de ovos de calopsita (Nymphicus hollandicus).	6
3.1.3. Obtenção de fibroblastos embrionários de rolinha (Columbina strepitans) a partir de ovos perdidos naturalmente.	7
3.1.4. Isolamento de fibroblastos embrionários bovinos.....	7
3.1.5. Fabricação de lentivírus com genes de interesse.....	8
3.1.6. Reação em cadeia de polimerase (PCR)	8
3.1.7. Participação em reuniões laboratoriais acerca de temas desenvolvidos nos projetos de pesquisa.....	9
3.1.8. Participação no ciclo de palestras: “Da célula-tronco ao músculo: estratégias de geração e caracterização de linhagens musculares” promovido pelo grupo The USP Alt Protein Project.....	9
3.2. Atividades desenvolvidas.....	10
3.2.1. Isolamento de fibroblastos de cervo-do-pantanal.....	10
3.2.2. Cultivo de fibroblastos.....	12
3.2.3. Transdução lentiviral para a integração de genes de interesse e reprogramação celular	13
3.2.4. Citometria de fluxo	15
3.2.5. Doubling Time	16

3.2.6. Análise de integridade celular.....	16
3.2.7. Extração ácidos nucleicos e síntese de cDNA.	17
3.2.8. Desenho de Primer.....	19
3.2.9. Reação em cadeia da polimerase convencional (PCR).....	20
3.2.10. Eletroforese	21
3.2.11. Processamento citogenético de cultivos celulares.....	21
4. Discussão das atividades de estágio.	22
5. Considerações finais.	23
II- CASO DE INTERESSE: Imortalização celular de fibroblastos de cervo- do-pantanal (<i>Blastocerus dichotomus</i>) visando à conservação prolongada de material biológico.....	24
1. Introdução	24
2. Revisão de literatura.....	26
2.1. Introdução à cultura de células de animais selvagens	26
2.2. Senescência replicativa e imortalização celular	27
2.3. Imortalização celular em células de cervídeos	29
3. Relato de caso.....	30
4. Discussão.....	36
5. Considerações finais.....	38
6. Referências	38

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Fachada do prédio Anexo I do Laboratório de Morfofisiologia Molecular e Desenvolvimento (LMMD) localizado na USP, Câmpus Pirassununga-SP. Fonte: arquivo pessoal (2025)..... 2
- Figura 2: Estrutura pertencente ao laboratório do anexo I do LMMD. A. Bancada de síntese de cDNA. B. Bancada de extração de ácidos nucleicos com cabine de exaustão de gases. C. Bancada geral D. Ultracentrífuga e freezers. Fonte: Arquivo pessoal (2025). 3
- Figura 3: Estrutura pertencente ao laboratório do Anexo II, unidade do LMMD. A. Bancada de eletroforese. B. Bancada de imunohistoquímica. C. Microscópio micromanipulador para técnicas de transferência nuclear. Fonte: Arquivo pessoal (2025)..... 3
- Figura 4: Logotipo do grupo de pesquisa de proteínas alternativas da Universidade de São Paulo (USP). Fonte: Good Food Institute Alt Protein Project USP (2025)..... 4
- Figura 5: Estrutura do laboratório de reprogramação celular (Reprocel) subunidade do LMMD. A. Cabines de fluxo laminar. B. Área de microscopia eletrônica e botijões de nitrogênio. C. Estufas de CO₂ D. Bancada e refrigeradores. Fonte: Arquivo pessoal (2025). 5
- Figura 6: Isolamento de fibroblastos embrionários do óvulo após 7 dias de incubação pós-fertilização. A. Embrião circundado pelo conteúdo corioalantoide. B. Embrião isolado e lavado duas vezes com PBS. C. Fibroblastos obtidos por dissociação com colagenase após 24 h de isolamento (10x). D. Fibroblastos obtidos por dissociação com TrypLE™ após 24 h de isolamento (10x). E. Fibroblastos obtidos por dissociação espontânea após 24 h de isolamento (20x). Fonte: Arquivo pessoal de Nyanne S. C. C. da Silva (2025). 6
- Figura 7: Isolamento de fibroblastos embrionários de ovos caídos do ninho. A. Representativo da espécie *Columbina strepitans*. B e C. Embriões próximos à casca do ovo após a queda. D. Embriões medidos após lavagem com PBS (4X anti-anti). E. Dissecção do embrião para isolamento de fibroblastos. F. Porções distribuídas igualmente para isolamento via colagenase, TrypLE™ e explante. G. Fibroblastos obtidos por dissociação com TrypLE™ após 24 h de isolamento (10x). H. Fibroblastos obtidos por dissociação espontânea após 24 h de

isolamento (4x). E. Fibroblastos obtidos por dissociação com colagenase após 24 h de isolamento (10x). Fonte: Arquivo pessoal de Nyanne S. C. C. da Silva (2025).....	7
Figura 8: Isolamento de fibroblastos de cervo-do-pantanal (<i>Blastocerus dichotomus</i>): fibroblastos obtidos por dissociação espontânea após 7 dias de isolamento (20x). Fonte: Arquivo pessoal (2025).....	11
Figura 9: Cultivo in vitro de fibroblastos. A. Fibroblastos embrionários murinos-MEF (10X). B. Fibroblastos de cervo-do-pantanal (<i>Blastocerus dichotomus</i>) (10X). Fonte: Arquivo pessoal (2025).....	13
Figura 10: Cultura de fibroblastos de cervo-do-pantanal, submetidos a reprogramação contendo o gene da GFP (FUGW) e expressando a luminescência. Fonte: Arquivo pessoal (2025).....	15
Figura 11: Análise quantitativa de células vivas e mortas por meio do corante de azul de tripan em câmara de Neubauer. Células vivas em tonalidade branca e células mortas em tonalidade de azul. Fonte: Arquivo pessoal (2025).	17
Figura 12: Produto resultante da extração de DNA genômico por meio do protocolo do trizol. Fonte: Arquivo pessoal (2025).....	19
Figura 13: Plasmídeo sintetizado com a sequência do gene hTERT. Fonte: Arquivo institucional Addgene (2024).....	20
Figura 14: Eletroforese em gel de agarose para a visualização de bandas relativas a presença/ausência do DNA de interesse. A. Equipamento biorad de eletroforese B. Gel de agarose após corrida em eletroforese. Fonte: Arquivo pessoal (2025).	21
Figura 15: Esquema representativo do experimento de imortalização de fibroblastos de cervo-do-pantanal (<i>Blastocerus dichotomus</i>) utilizando vetores lentivirais hTERT e FUGW. Fonte: Arquivo pessoal elaborado no BioRender.com (2025).	30
Figura 16: Morfologia de fibroblastos em cultivo in vitro de cervo-do-pantanal (<i>Blastocerus dichotomus</i>) após dez dias de transdução lentiviral. A. Morfologia das células controle negativo B. Morfologia das células submetidas a 25 µL da alíquota de partículas lentivirais hTERT. C. Morfologia das células submetidas a 50 µL da alíquota de partículas lentivirais	

hTERT. D. Morfologia das células submetidas a 100 µL da alíquota de partículas lentivirais hTERT.....31

Figura 17: Citometria de fluxo para análise de fluorescência de fibroblastos de cervo-do-pantanal (*Blastocerus dichotomus*) transduzidos com o vetor lentiviral FUGW. A. análise do animal A1 demonstrando 99,8% de eficiência de integração viral. B. Análise do animal A2 demonstrando 77,3% de eficiência de integração viral. C. Análise do animal A3 demonstrando 83,5% de eficiência de integração viral.....33

Figura 18: Eletroforese em gel de agarose para demarcação de banda positivas ao PCR de cDNA correspondente ao hTERT.....35

Figura 19: Metáfase para a visualização de cromossomos provenientes de fibroblastos imortalizados de cervo-do-pantanal (*Blastocerus dichotomus*) coradas com Giemsa(60X).
Fonte: Arquivo pessoal (2025).....36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Parâmetros da análise do tempo de duplicação (doubling time) de fibroblastos de três espécimes de cervo-do-pantanal (*Blastocerus dichotomus*) antes e após a transdução com diferentes volumes da alíquota de vetor lentiviral hTERT. Fonte: Arquivo pessoal (2025).32

Tabela 2: Parâmetro de viabilidade por azul de tripan de três espécimes de cervo-do-pantanal (*Blastocerus dichotomus*) submetidos a transdução lentiviral de hTERT. ...34

I- RELATÓRIO DE ESTÁGIO OBRIGATÓRIO

1. Introdução

O presente relatório tem como finalidade apresentar as atividades desenvolvidas pela discente Janaína Mattos Lopes Torres, no período de estágio curricular obrigatório realizado no décimo semestre do curso de Medicina Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal (UNESP), por meio da orientação do Prof. Dr José Maurício Barbanti Duarte. O período de estágio obrigatório é de fundamental contribuição para a formação acadêmica, permitindo o aprofundamento de conhecimentos adquiridos durante a graduação e a formação de novas habilidades necessárias para a prática profissional.

Desta forma, a aluna optou por dedicar-se a atividades relacionadas à reprodução e à biologia celular sob supervisão da Profa. Dra. Fabiana Fernandes Bressan, no Laboratório de Morfofisiologia Molecular e Desenvolvimento (LMMD), unidade pertencente à Universidade de São Paulo - Câmpus de Pirassununga-SP. Com isso, o estágio foi realizado durante o período de 4 de agosto de 2025 a 19 de novembro de 2025, totalizando 600 horas, conforme o projeto curricular do curso estabelece.

Neste tempo, a aluna foi treinada em técnicas de biossegurança, cultivo celular e técnicas moleculares para projetos de pesquisa referentes à geração de células de pluripotência induzida em diferentes espécies, visando diversas aplicações, como biomédicas, reprodutivas e de produção de carne cultivada em laboratório.

2. Descrição do local de estágio

A Faculdade de Engenharia de Alimentos e Zootecnia (FZEA), localizada no campus Fernando Costa em Pirassununga-SP, é uma unidade pertencente à Universidade de São Paulo (USP). Atualmente, oferece cursos de graduação em Zootecnia, Engenharia de Alimentos, Engenharia de Biosistemas e Medicina Veterinária, além dos cursos de pós-graduação nas respectivas áreas.

A faculdade é dividida em cinco departamentos, sendo o Departamento de Medicina Veterinária (ZMV) responsável por abrigar o LMMD, onde foi realizado o estágio curricular da aluna.



Figura 1: Fachada do prédio Anexo I do Laboratório de Morfofisiologia Molecular e Desenvolvimento (LMMD) localizado na USP, Câmpus Pirassununga-SP. Fonte: arquivo pessoal (2025).

O LMMD foi inaugurado no ano de 2001 pelo Professor Doutor Flávio Vieira Meirelles, com a responsabilidade de desenvolver pesquisas na área de biotecnologias reprodutivas, desenvolvimento fetal e biologia celular, por meio de estudos em estruturas embrionárias, células reprogramadas de pluripotência ou clonadas, metabolômica, entre outras.

Dentre os exemplos de pesquisas desenvolvidas destacam-se técnicas de cultivo celular, produção de embriões, clonagem por transferência nuclear, determinação de expressão gênica, e sequenciamento de DNA e RNA.

O LMMD é formado por dois laboratórios distintos conhecidos como Anexo I e Anexo II (Figura 1). O primeiro, Anexo I, conhecido como laboratório geral, possui uma sala de uso comum com bancadas destinadas à realização de PCR e salas específicas para cada atividade, sendo estas: extração de ácidos nucleicos, reprogramação celular, cultivo celular, maturação in vitro, laboratório de fertilização in vitro e citometria de fluxo (Figura 2).



Figura 2: Estrutura pertencente ao laboratório do anexo I do LMMD. A. Bancada de síntese de cDNA. B. Bancada de extração de ácidos nucleicos com cabine de exaustão de gases. C. Bancada geral D. Ultracentrífuga e freezers. Fonte: Arquivo pessoal (2025).

Já o Anexo II, outro laboratório situado ao lado do departamento, possui bancada de imunohistoquímica, eletroforese e microscópio micromanipulador (Figura 3).



Figura 3: Estrutura pertencente ao laboratório do Anexo II, unidade do LMMD. A. Bancada de eletroforese. B. Bancada de imunohistoquímica. C. Microscópio micromanipulador para técnicas de transferência nuclear. Fonte: Arquivo pessoal (2025).

Os professores responsáveis pelo laboratório e orientadores para desenvolvimento de pesquisas são: Prof. Dr. Felipe Perecin (Biologia da Reprodução), Prof. Dr. Claudia Lima Verde Leal (Biotecnologia da Reprodução e Desenvolvimento), Profa. Dra. Fabiana Fernandes Bressan (Geração de células-tronco, edição gênica, reprogramação celular e epigenética em animais) e Prof. Flávio Vieira Meirelles (Biologia da Reprodução e Clonagem).

2.1. Reprocel

O Laboratório Reprocel (Reprogramação Celular), é uma subunidade pertencente aos anexos do LMMD, é administrado pela Profa.Dra. Fabiana Fernandes

Bressan, e atualmente orienta projetos como de geração e manutenção de células-tronco de pluripotência induzida (iPS) e produção de carne *in vitro* a partir de células iPS cultivadas. Este último projeto conta com um grupo de estudos denominado “The USP Alt Protein Project” (Figura 4), apoiado pela entidade internacional “The Good Food Institute”.



Figura 4: Logotipo do grupo de pesquisa de proteínas alternativas da Universidade de São Paulo (USP). Fonte: Good Food Institute Alt Protein Project USP (2025).

Atualmente, o laboratório conta com cinco doutorandos e três mestrandos que desenvolvem pesquisas nas áreas citadas acima.

Em relação à estrutura, o laboratório possui equipamentos que permitem o estabelecimento e a cultura de células, como cabines de fluxo laminar para cultivo celular (2), centrífugas (1), estufas incubadoras (2), geladeiras e freezers (3),

microscópios invertidos de fluorescência (2) e botijões de nitrogênio líquido (2) (Figura 5).



Figura 5: Estrutura do laboratório de reprogramação celular (Reprocel) subunidade do LMMD. A. Cabines de fluxo laminar. B. Área de microscopia eletrônica e botijões de nitrogênio. C. Estufas de CO₂ D. Bancada e refrigeradores. Fonte: Arquivo pessoal (2025).

Por utilizar vetores virais nas técnicas de reprogramação, o laboratório é classificado como nível de biossegurança 2 (NB-2) devido à manipulação de agentes que oferecem risco moderado aos pesquisadores e baixo à comunidade.

Todos os experimentos que envolvem análises moleculares, como extração de ácidos nucleicos e PCR, são realizados no laboratório geral do LMMD ou Anexo I.

3. Descrição de atividades do estágio

As atividades acompanhadas e desenvolvidas ao longo do estágio consistiram no acompanhamento das pesquisas de pós-graduandos orientados pela Profa. Dra. Fabiana Fernandes Bressan e na realização de um experimento com amostras de pele de cervo-do-pantanal (*Blastocerus dichotomus*).

Em resumo, as atividades desenvolvidas foram no âmbito de técnicas de biossegurança, cultivo celular e técnicas moleculares para a geração de células reprogramadas, visando diferentes aplicações reprodutivas e de geração de proteínas alternativas em laboratório.

3.1. Atividades acompanhadas.

3.1.1. Cultura de células

Com o avanço do desenvolvimento da cultura de células, foi possível estabelecer pesquisas e tecnologias baseadas no desenvolvimento de

medicamentos, na fabricação de vacinas, em estudos genéticos, em tecnologias de reprodução assistida ou ainda no uso da reprogramação de células somáticas, que permitem sucessos significativos nas áreas de medicina regenerativa (YAO; ASAYAMA, 2017). Com isso foi acompanhado o cultivo de fibroblastos estabelecidos de diversas espécies como Bovinas (*Bos taurus*), Bubalinas, Galinhas e Peixes utilizando de meio Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM) (Gibco, cat# 12200-036), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Gibco, cat# 12657-029) e 1% de penicilina/estreptomicina (Lonza, cat# 17-602E) mantidos em estufa 37° e 5% de CO₂.

3.1.2. Isolamento de fibroblastos embrionários de ovos de calopsita (*Nymphicus hollandicus*).

Os fibroblastos embrionários de calopsita foram obtidos a partir do isolamento de ovos embrionados, após sete dias de incubação a uma temperatura de 37,7–37,3 °C e uma umidade controlada de 65%, seguindo os estágios de desenvolvimento embrionário de aves.

Os embriões foram dissecados utilizando tesoura, pinça de ponta reta e bisturi e posteriormente lavados duas vezes com PBS para remover detritos de acordo Chapman *et al.* (2001), para posteriormente serem submetidos à maceração utilizando uma lâmina de bisturi para desagregação inicial do tecido e otimizar o processo de dissociação celular. O material foi então dividido igualmente em três metodologias: (1) dissociação enzimática com colagenase, (2) dissociação enzimática com TrypLE™ e (3) dissociação espontânea por cultura de explantes, conforme mostrado na Figura 6.

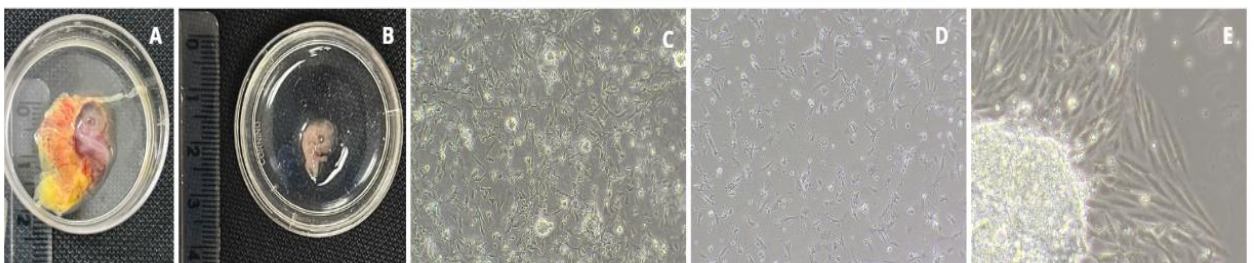


Figura 6: Isolamento de fibroblastos embrionários do óvulo após 7 dias de incubação pós-fertilização. A. Embrião circundado pelo conteúdo corioalantoide. B. Embrião isolado e lavado duas vezes com PBS. C. Fibroblastos obtidos por dissociação com colagenase após 24 h de isolamento (10x). D. Fibroblastos obtidos por dissociação com TrypLE™ após 24 h de isolamento (10x). E. Fibroblastos obtidos por dissociação espontânea após 24 h de isolamento (20x). Fonte: Arquivo pessoal de Nyanne S. C. C. da Silva (2025).

Os três protocolos de dissociação celular foram eficazes para isolar e cultivar fibroblastos embrionários de calopsitas (*Nymphicus hollandicus*). As células foram cultivadas com meio IMDM e 1% de SFB, repicadas antes de atingirem 90% de confluência e criopreservadas com 90% de IMDM e 10% de Dimetilsulfóxido (DMSO) para formar um banco de células para experimentos futuros.

3.1.3. Obtenção de fibroblastos embrionários de rolinha (*Columbina strepitans*) a partir de ovos perdidos naturalmente.

Dois embriões inviáveis de rolinha, provenientes de ovos que caíram naturalmente, foram utilizados para estabelecer culturas primárias de fibroblastos para futuros estudos de reprogramação. O isolamento foi realizado utilizando um protocolo previamente padronizado descrito no item 3.1.2., demonstrando recuperação e expansão bem-sucedidas dos fibroblastos mesmo com horas desconhecidas post mortem e intensa probabilidade de contaminação bacteriana (Figura 7).

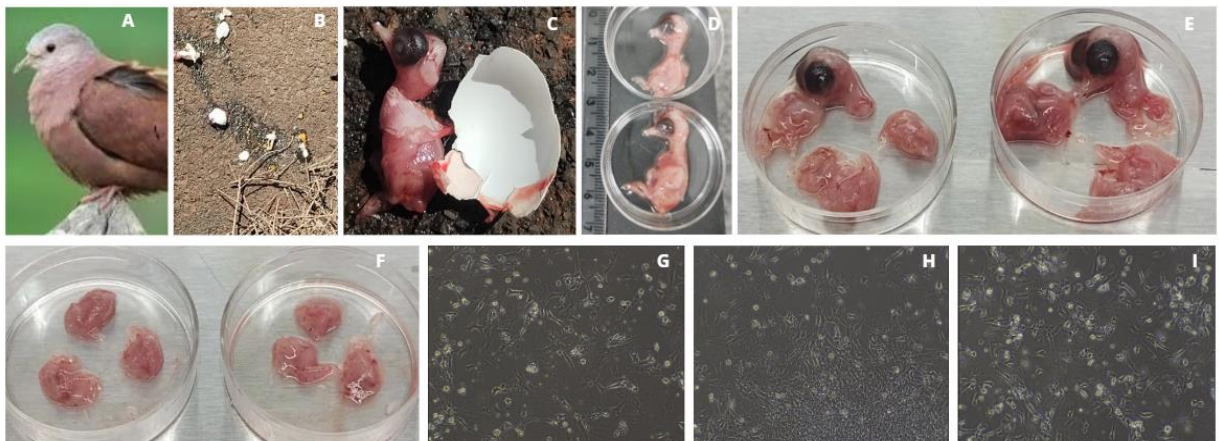


Figura 7: Isolamento de fibroblastos embrionários de ovos caídos do ninho. A. Representativo da espécie *Columbina strepitans*. B e C. Embriões próximos à casca do ovo após a queda. D. Embriões medidos após lavagem com PBS (4X anti-anti). E. Dissecção do embrião para isolamento de fibroblastos. F. Porções distribuídas igualmente para isolamento via collagenase, TrypLE™ e explante. G. Fibroblastos obtidos por dissociação com TrypLE™ após 24 h de isolamento (10x). H. Fibroblastos obtidos por dissociação espontânea após 24 h de isolamento (4x). I. Fibroblastos obtidos por dissociação com collagenase após 24 h de isolamento (10x). Fonte: Arquivo pessoal de Nayanne S. C. C. da Silva (2025).

3.1.4. Isolamento de fibroblastos embrionários bovinos.

Embriões bovinos no sétimo dia após a fertilização *in vitro* foram dissecados manualmente para obtenção da massa celular interna. Para isso, com o auxílio de um bisturi, o trofotoderma foi removido, mantendo-se apenas a massa celular interna. Após a separação da massa celular interna, esta foi destinada ao cultivo por meio da utilização de MEF (Fibroblastos embrionários murinos) para sustentação,

empregando-se meio de cultura Alpha-MEM (Gibco) suplementado com 10% FBS, com adição de 1% de de Penicilina/Estreptomicina.

3.1.5. Fabricação de lentivírus com genes de interesse.

Os vetores lentivirais representam uma estratégia eficaz para introduzir material genético em células-alvo, pois conseguem transfectar tanto células em mitose ativa quanto células que não estão se dividindo, resultando em uma expressão gênica desejada por meio da manipulação gênica (KALIDASAN *et al.*, 2021).

Para isso, as partículas lentivirais são desenhadas e fabricadas contendo os genes de interesse. Todo o processo foi realizado em laboratório NB2, seguindo os critérios de biossegurança. Para a produção de vírus contendo sequências de interesse, foram utilizados plasmídeos prontos e amplificados em células Stable3 em meio LB suplementado com ampicilina. O DNA plasmidial foi então purificado e quantificado por leitura a 260 nm. Em seguida, células 293-FT foram transfectadas com o plasmídeo de interesse, o envelope pMD2.G e o vetor empacotador pspAX2 usando XtremeGENE HP DNA.

O meio contendo vírus foi coletado após 48 e 72 horas, e as partículas foram concentradas pela ultracentrifugação em Beckman Coulter SW-28, rotor do tipo Swing-Bucket. Ao final, as amostras foram armazenadas em freezer a -150 °C.

3.1.6. Reação em cadeia de polimerase (PCR)

A técnica de PCR é uma técnica da genética molecular capaz de amplificar sequências específicas de DNA, ou seja, replicando diversas vezes o código genético de interesse dependendo de ciclos de temperatura e enzimas específicas. Para isso, é necessário o segmento de DNA de interesse: seja o DNA genômico e/ou o cDNA correspondente ao RNA expresso pelo maquinário celular.

São também utilizados primers que têm como função delimitar o início e o final da reação de síntese.

Uma vez a reação finalizada, pode-se quantificar (RT-qPCR) ou evidenciar a presença/ausência a partir da presença de bandas em gel de agarose (PCR-Convencional).

Com isso, foi acompanhada atividades referentes a realização de PCR para células de pluripotência induzida para a confirmação da atividade dos genes de interesse exógenos e endógenos.

3.1.6.1. RT-qPCR

O RT-qPCR foi realizado a fim de quantificar a atividade da expressão dos genes por meio do cDNA. A amplificação foi realizada no equipamento QuantStudio 5 (Thermo Scientific), utilizando Power SYBR™ Green Master Mix (Thermo Scientific, 4367659). As reações seguiram o protocolo térmico estabelecido de primeiramente desnaturação inicial a 95 °C por 15 minutos, seguida de 45 ciclos de 95 °C por 15 segundos, 60 °C por 5 segundos e 72 °C por 2 minutos.

3.1.6.2. PCR convencional

Já para o PCR convencional para posterior corrida em gel de agarose, a amplificação das amostras foi realizada pelo Termociclador ProFlex PCR system com a Taq Platinum Polimerase (Thermo Scientific). As reações seguiram o protocolo térmico com a primeira desnaturação inicial à temperatura de 94 °C por 120 segundos, seguida de 35 ciclos de anelamento a 57 °C por 30 minutos e extensão a 72 °C pelo mesmo tempo anterior. Ao final, as amostras foram mantidas a 4 °C.

3.1.7. Participação em reuniões laboratoriais acerca de temas desenvolvidos nos projetos de pesquisa.

No período do estágio houve a participação em dez reuniões laboratoriais relacionadas à discussão de temas como geração de células IPS, gametogênese in vitro, vetores de reprogramação e carne cultivada. Também foi apresentado o progresso dos projetos de pesquisa de pós-graduandos, bem como a apresentação antes e após conclusão do estudo de caso desenvolvido para este relato.

3.1.8. Participação no ciclo de palestras: “Da célula-tronco ao músculo: estratégias de geração e caracterização de linhagens musculares” promovido pelo grupo The USP Alt Protein Project.

Durante o dia 17 de novembro, foi acompanhado na qualidade de ouvinte, um ciclo de palestras, com a temática de carne cultivada a partir de células iPS, com pós-

graduandos, orientados da Profa. Dra. Fabiana Bressan juntamente com o Prof. Dr. André Monteiro da Rocha. Os temas abordaram as novidades frente a esta linha de pesquisa em crescimento.

3.2. Atividades desenvolvidas

As atividades desenvolvidas consistiram na execução de um estudo de caso acerca da cultivo e técnicas de reprogramação celular com fibroblastos de cervo-do-pantanal (*Blastocerus dichotomus*). As amostras foram obtidas do Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos (NUPECCE), sob liberação do comitê de ética no uso de animais de Jaboticabal (protocolo nº 9942697939/2025).

3.2.1. Isolamento de fibroblastos de cervo-do-pantanal.

O isolamento de fibroblastos foi realizado de formas distintas: isolamento primário por dissociação espontânea da pele, isolamento primário pelo uso de collagenase.

3.2.1.1. Isolamento primário de fibroblastos adultos por dissociação espontânea de pele criopreservada

Uma biópsia de pele de uma fêmea de dois anos de cervo-do-pantanal (*Blastocerus dichotomus*), proveniente do NUPECCE, foi descongelada em banho-maria a 37°C e retirada do meio de congelamento, contendo 71,6% de Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), 20% SFB, 6% de DMSO, 2% de solução de Penicilina/Estreptomicina (100 UI e 0,01 mg/mL) e 0,4% de solução de Anfotericina B (1 mg/mL) (DUARTE *et al.*, 2021). Em laboratório, sob fluxo laminar, a amostra foi lavada em 2 mL de Phosphate-Buffered Saline (PBS) e, posteriormente, divulsionada em fragmentos menores com auxílio de bisturi, em uma placa de Petri com 2 mL de meio IMDM, suplementado com 10% de SFB e 1% de penicilina/estreptomicina.

Após isso, os fragmentos foram destinados a um frasco de cultivo de 25 cm², contendo meio IMDM, suplementado com 10% de SFB e 1% de penicilina/estreptomicina. A troca de meio foi realizada a cada 48 horas. Durante o cultivo, foi observada o desprendimento de células (Figura 8) e conforme os dias

passaram a presença de clusters celulares, sem espaço entre os fibroblastos, sendo necessário o repique para a manutenção da viabilidade da amostra.

O repique celular foi realizado por meio da tripsinização, utilizando 1 mL de TrypLE™ e incubando por 5 a 7 minutos na incubadora a 38,5 °C, para o desprendimento das células. Com as células soltas no fundo do frasco, a solução foi centrifugada a 400 g por 5 minutos, e então o sobrenadante foi descartado para a ressuspensão e homogeneização do pellet em 1 mL de meio.

Posteriormente, as células foram plaqueadas de acordo com o experimento de reprogramação à pluripotência e imortalização que serão explicados posteriormente.

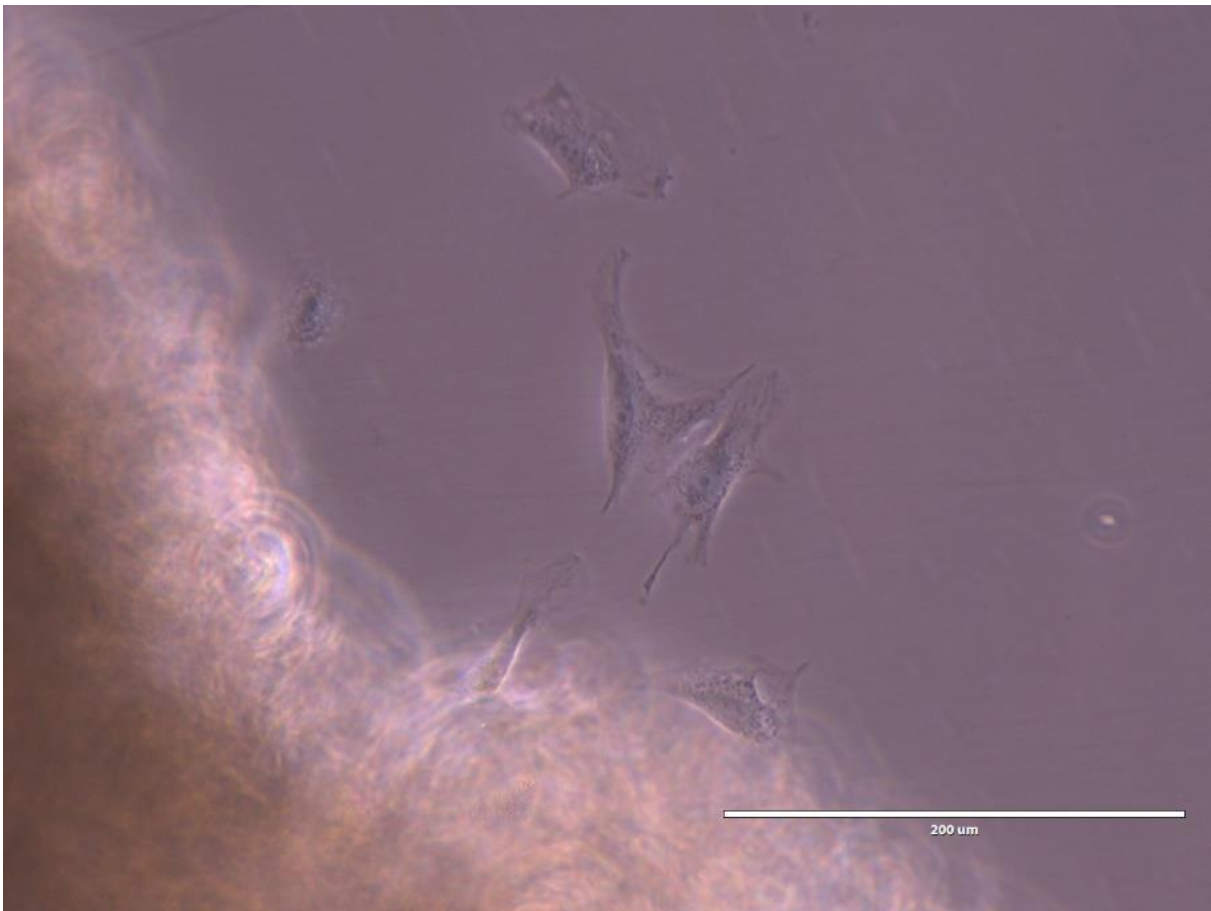


Figura 8: Isolamento de fibroblastos de cervo-do-pantanal (*Blastocerus dichotomus*): fibroblastos obtidos por dissociação espontânea após 7 dias de isolamento (20x). Fonte: Arquivo pessoal (2025).

3.2.1.2. Isolamento primário de fibroblastos adultos pelo uso da colagenase IV.

Parte do fragmento utilizado na metodologia anterior foi destinada à digestão enzimática pelo protocolo de colagenase IV.

Para isso, a pele fragmentada em pedaços menores foi colocada em um tubo Falcon com 6 mL de Meio Essencial Mínimo α (MEM), junto com colagenase do tipo IV e 10 μ L de penicilina/estreptomicina/anfotericina B, por 1 h e 40 minutos com agitação constante para facilitar a digestão enzimática.

Após o período decorrido, a mistura foi centrifugada a 400 g por 5 minutos e ressuspendida em 1 mL de meio de cultivo, que foi transferido para uma garrafa de 25 cm³ para decantação e cultivo.

A amostra foi mantida na temperatura de 38 °C a 5% de CO₂, com monitoramento diário e meio trocado parcialmente a cada 48 horas.

Porém, não foi possível obter células por essa metodologia para a espécie em questão provavelmente por conta do menor tempo de exposição ou do tipo da colagenase utilizada.

3.2.2.Cultivo de fibroblastos

Foi realizado o cultivo de fibroblastos de cervo-do-pantanal e embrionários murinos criopreservados (MEF), estes utilizados posteriormente como camada de fixação para os fibroblastos de cervo (Figura 9).

Os fragmentos foram descongelados à temperatura ambiente e posteriormente centrifugados a 400 g por 5 minutos para o descarte do DMSO. Após isso, foram ressuspendidos em meio de cultura e transferidos para frascos de cultivo de 25 cm² com a troca de meio a cada 48 horas, usando meio de cultura IMDM, suplementado com 10% de SFB e 1% de penicilina/estreptomicina.

Os fibroblastos foram mantidos até atingirem 70% de confluência de área para posteriormente serem plaqueados para experimentos de reprogramação.

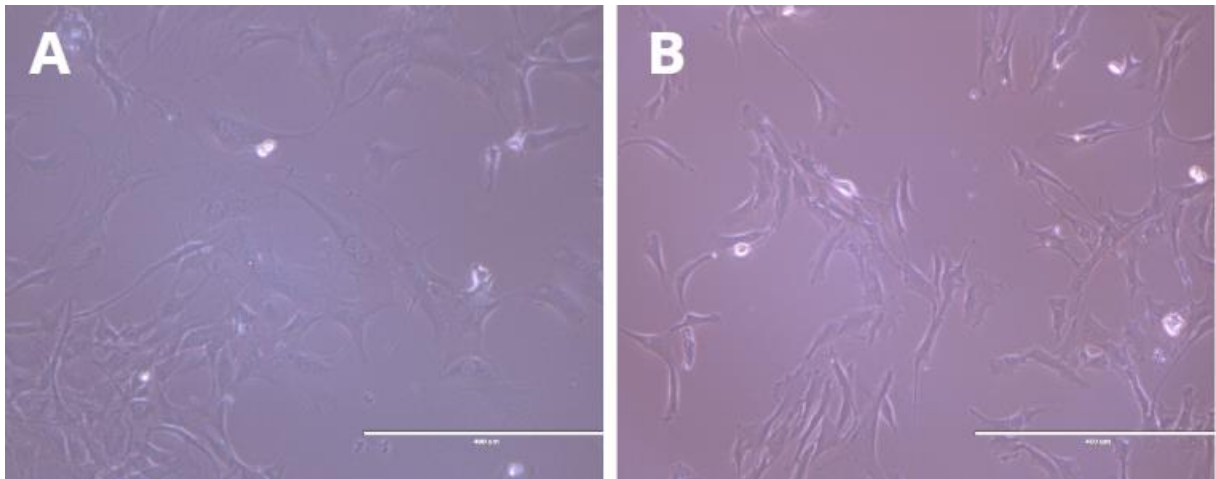


Figura 9: Cultivo *in vitro* de fibroblastos. A. Fibroblastos embrionários murinos-MEF (10X). B. Fibroblastos de cervo-do-pantanal (*Blastocerus dichotomus*) (10X). Fonte: Arquivo pessoal (2025).

3.2.3. Transdução lentiviral para a integração de genes de interesse e reprogramação celular

3.2.3.1. Imortalização celular

A imortalização celular consiste em uma população celular que, mesmo após múltiplas passagens em cultivo, não entra em senescência (WANG *et al.*, 2019). Isso ocorre porque, por meio da inserção exógena de genes, como o hTERT (a transcriptase reversa da telomerase humana), repetidas sequências de DNA são adicionadas às extremidades cromossômicas, prevenindo a morte celular (CONG *et al.*, 1999).

Desta forma, foram utilizadas partículas lentivirais com o gene hTERT para a reprogramação. Para isso, os fibroblastos de cervo destinados à transdução foram semeados a uma concentração de 2×10^4 em placas de 6 poços de cultivo e mantidas à temperatura de 38 °C a 5% de CO₂.

Para o protocolo lentiviral, foram adicionados 8 µg/mL de polibreno (1,5-dimetil-1,5-diazaundecametileno polibrometo, brometo de hexadimetrina, Sigma-Aldrich), juntamente com as partículas lentivirais e o meio de cultivo já descrito anteriormente. O meio de cultura foi substituído pela solução descrita e incubado nas mesmas condições de cultivo por 24 horas, com troca de meio e retirada do vírus.

3.2.3.2. Reprogramação celular à pluripotência induzida

A reprogramação celular para a formação de células pluripotentes induzidas (iPS) foi primeiramente concluída por Yamanaka e Takahashi em fibroblastos murinos por meio da inserção de quatro fatores comumente conhecidos como OSKM: Oct4 (fator de transcrição de ligação ao octâmero 4), Sox2 (proteína 2 da caixa de grupo de alta mobilidade relacionada ao SRY), C-Myc (oncogene viral da mielocitomatose) e Klf4 (fator 4 semelhante a Kruppel) (TAKAHASHI; YAMANAKA, 2006).

Os fatores citados são responsáveis por sustentar a pluripotência e a manutenção celular dos fibroblastos reprogramados (SAMAVARCHI-TEERANI *et al.*, 2010).

Atualmente, células pluripotentes já estão sendo estabelecidas com eficácia em animais domésticos, com a intenção de servir de base para a gametogênese *in vitro*, uma oportunidade para a produção de embriões, a fim de aprimorar o melhoramento genético de rebanhos (BRESSAN *et al.*, 2020; CASTRO *et al.*, 2024).

Desta forma, foram utilizadas partículas lentivirais com os fatores OSKM humanos e murinos para a reprogramação em fibroblastos do cervo-do-pantanal. Para isso, o protocolo anterior foi repetido: as células destinadas à transdução foram semeadas a uma concentração de 2×10^4 em placas de 6 poços de cultivo e mantidas à temperatura de 38°C com 5% de CO₂.

Posteriormente, foram também utilizados 8 µg/mL de polibreno (Sigma-Aldrich) e partículas lentivirais. Ao final, o material permaneceu nas mesmas condições de cultivo por 24 horas, com troca de meio e retirada do vírus.

No quinto dia após a transdução lentiviral, os fibroblastos foram dissociados enzimaticamente com a TrypLE™ e transferidos para uma nova placa que continha uma fina camada de fibroblastos embrionários murinos fixados, para observação diária da formação de colônias sugestivas.

Os fibroblastos foram mantidos em cultura por 30 dias, com observação e troca de meio a cada 48 horas, usando meio iPS contendo DMEM/F-12 (Gibco) com 10% de KnockOut Serum Replacement (KSR, Gibco), 1% de solução antibiótica de penicilina e estreptomicina (Gibco), 1% de L-glutamina (Gibco), 1% de aminoácidos não essenciais (Gibco) e 0,008% de β-mercaptoetanol (Gibco).

Contudo, para esta abordagem não foi possível obter indícios sugestivos de reprogramação à pluripotência.

3.2.4. Citometria de fluxo

Para verificar a eficiência da integração viral das células destinadas a imortalização foi também utilizado um lentivírus contendo o gene da GFP (FUGW), promotor ativo da ubiquitina C, responsável pela fluorescência celular, por meio de citometria de fluxo (Figura 10).

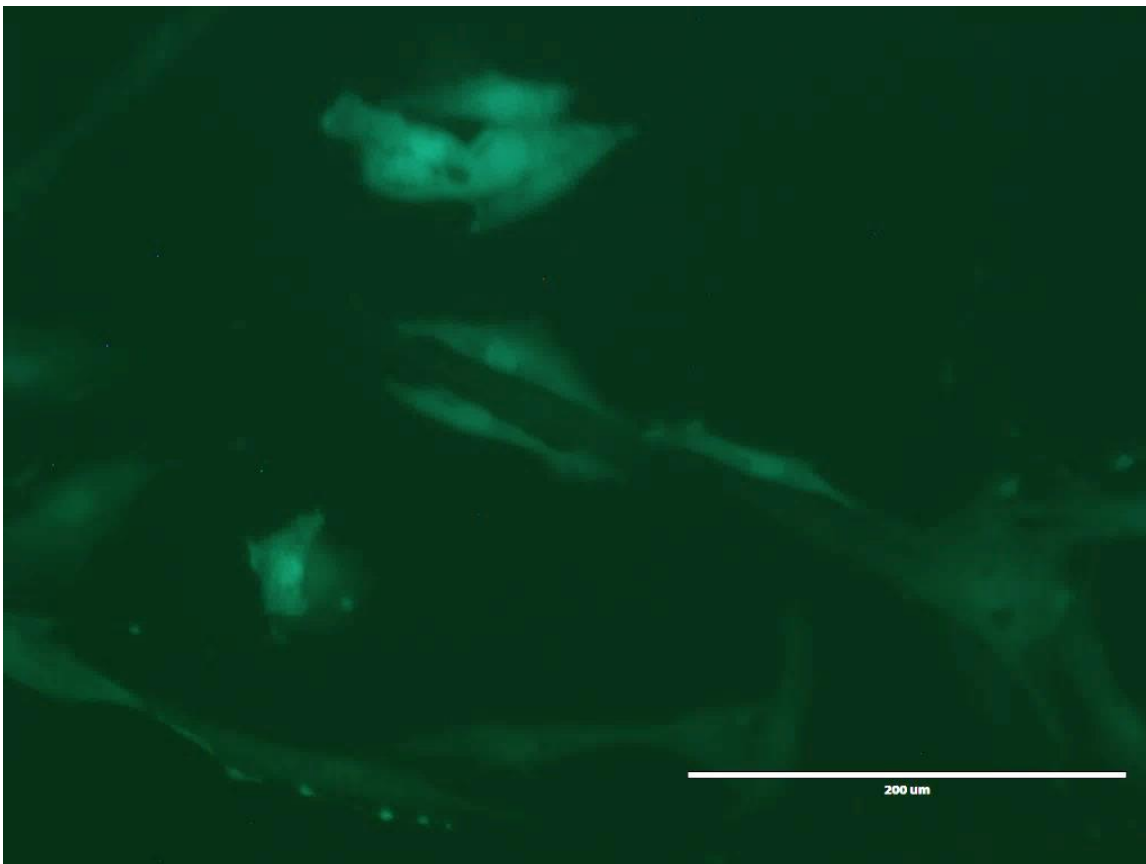


Figura 10: Cultura de fibroblastos de cervo-do-pantanal, submetidos a reprogramação contendo o gene da GFP (FUGW) e expressando a luminescência. Fonte: Arquivo pessoal (2025).

As células também foram plaqueadas a uma concentração de 2×10^4 em placas de 6 poços de cultivo, mantidas a 38°C com 5% de CO_2 . Depois, foram adicionados $8 \mu\text{g/mL}$ de polibreno (Sigma-Aldrich) em um tubo com as partículas lentivirais e meio de cultivo. Em seguida, o meio de cultura foi substituído pela solução descrita e incubado nas mesmas condições por 24 horas, com troca de meio.

As células cultivadas foram dissociadas enzimaticamente com a TrypLE™ e separadas em uma concentração de 1×10^5 por tubo individualmente. Posteriormente, foram incubadas em grupo controle e grupos com FUGW. Após isso, foram lavadas em PBS 0,1% e centrifugadas a 300 g por 7 minutos para a leitura do citômetro.

A leitura pelo citômetro ocorre enquanto as células passam uma a uma, em fila única, por um feixe de laser que detecta a fluorescência causada pela ativação da ubiquitina C. Durante o processo, a luz captada é convertida em sinais eletrônicos, gerando gráficos que representam a atividade celular diante da integração e expressão exógena dos genes.

3.2.5. Doubling Time

Para cada cultivo celular, os fibroblastos antes do experimento foram destinados ao protocolo de tempo de duplicação (Doubling Time), responsável por analisar o tempo e a concentração celular para a duplicação. Com essa informação, foi possível prever a qualidade da receptividade celular frente a integração viral.

Para isso, as células foram plaqueadas a uma concentração de 10^4 em placas de cultura contendo 12 poços revestidos com gelatina proveniente de pele bovina a 0,1%. Após o plaqueamento inicial, foi realizado o subcultivo em intervalos de 24 h, 48 h, 72 h e 96 h. Durante o subcultivo, as células foram dissociadas enzimaticamente, adicionando TrypLE™, e a contagem de cada poço foi realizada individualmente para estimar a taxa de crescimento celular pela fórmula:

$$\text{double time} = \ln(2) / \text{growth rate.}$$

3.2.6. Análise de integridade celular

A integridade da membrana celular foi analisada utilizando o corante azul de tripan, que é um indicador de viabilidade celular. Uma vez que as células mortas adquirem uma tonalidade de azul, o corante é capaz de penetrar na célula devido à fragilidade da membrana plasmática, o que não ocorre com células saudáveis (CHEN *et al.*, 2021).

Com a confluência celular nos poços à reprogramação, a suspensão de células foi preparada pela tripsinização utilizando 1,0 mL de solução TRYPLE™. Posteriormente, a suspensão foi centrifugada a 400 g por 5 minutos com o descarte de sobrenadante e ressuspensão/homogeneização em 1 mL de meio de cultivo com 10% de soro fetal bovino.

Logo após, 10 µL desta solução celular foram transferidos para um microtubo e adicionados a 40 µL do corante de azul de tripan com posterior homogeneização. A concentração desta suspensão celular foi calculada a partir da câmara de Neubauer

sob microscópio de luz, no aumento 40x (Figura 11). A contagem das células foi realizada, computando-se as coradas e não coradas, conforme LEÓN-QUINTO *et al.* (2014), obtendo-se a razão entre as células totais e as com membrana íntegra em porcentagem.

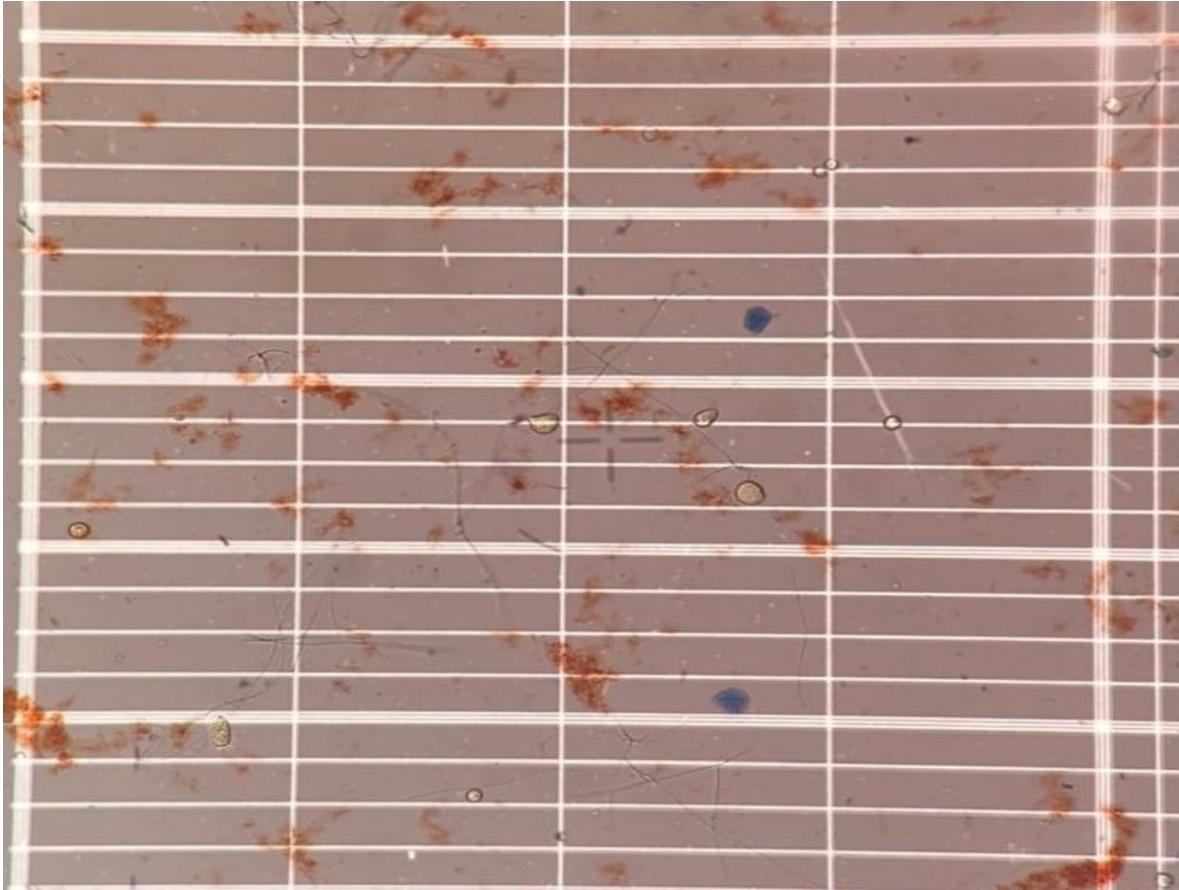


Figura 11: Análise quantitativa de células vivas e mortas por meio do corante de azul de tripan em câmara de Neubauer. Células vivas em tonalidade branca e células mortas em tonalidade de azul. Fonte: Arquivo pessoal (2025).

3.2.7. Extração ácidos nucleicos e síntese de cDNA.

Para compreender a integração e expressão gênica celular referente aos genes de interesse inseridos, foi necessário extrair o DNA e o RNA das células reprogramadas com os genes de interesse, como também das células originais. Essa molécula carrega as informações dos genes que, além de estarem integrados, devem estar sendo ativamente expressos pela maquinaria celular.

Para isso, os ácidos nucleicos são extraídos de fibroblastos utilizando o protocolo do Trizol (CHOMCZYNSKI; SACCHI, 1987). O protocolo consiste na mistura de acrilamida linear (10 μ L de acrilamida para 90 μ L de água por amostra) com o

volume de amostra adicionado, junto de 900 μL de Trizol. Em seguida, foi adicionado clorofórmio para homogeneização.

A mistura foi centrifugada a 1500 x g por 15 minutos a 4 °C. Nesta fase, foi possível distinguir as diferentes fases do trizol: a fase vermelha, que continha DNA genômico e proteínas, e a fase translúcida com o RNA da amostra.

Para a extração do RNA, essa última fase foi transferida para outro tubo e homogeneizada com álcool isopropílico, destinada ao armazenamento a -80 °C por 2 horas. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas novamente e o sobrenadante removido. Nessa etapa, adicionam-se 1000 μL de álcool etílico 75% (7500 μL de álcool para 2500 μL de água ultrapura), seguida de centrifugação com o sobrenadante removido, restando apenas o pellet, para secagem. Na etapa final, o pellet foi ressuspenso em 16 μL de água, e o RNA extraído foi quantificado usando 1 μL no Nanodrop.

Posteriormente a essa etapa, foi necessário a síntese da fita correspondente de DNA (cDNA) a partir das amostras de RNA extraídas para a leitura em PCR a fim de analisar a expressão gênica das células. Para isso, a amostra de RNA extraída e diluída em água ultrapura foi homogeneizada com dois mixes: o primeiro, composto por 3 μL de DNase, 0,75 μL de RNase Out e 3 μL de buffer de DNase, foi destinado ao termociclador por no mínimo 15 minutos a 25°C.

Após isso, foi adicionado 1 μL de EDTA por amostra, e o segundo mix foi preparado usando 2 μL de RT tampão, 0,8 μL de DNTP mix, 3,2 μL de água ultrapura, 1 μL de RNase Out, 1 μL de Multiscribe e 2 μL de RT random, totalizando 10 μL por amostra. Essa mistura foi então aquecida por 5 minutos a 85 °C no termociclador.

Enquanto isso, para a extração de DNA genômico, a fase vermelha do trizol (Figura 12) foi destinada a sucessivas lavagens de solução citrato 10% e posteriormente de etanol 75% para secagem e ressusensão em 10ul de buffer TBE para também quantificação em 1 μL no Nanodrop.



Figura 12: Produto resultante da extração de DNA genômico por meio do protocolo do trizol. Fonte: Arquivo pessoal (2025).

3.2.8. Desenho de Primer

A realização do PCR de células imortalizadas exigiu o desenho de um primer contendo uma pequena sequência do gene de interesse (hTERT) por meio do desenho do plasmídeo (Figura 13). Para isso, a sequência do gene alvo foi inserida no site <https://www.ncbi.nlm.nih.gov> e, pela ferramenta Primer-Blast, foram projetadas sequências de primers para PCR. Todas as opções foram validadas por meio do “OligoAnalyzer” (<https://www.idtdna.com/pages/tools/oligoanalyzer>), a fim de analisar as propriedades da sequência gerada em relação à reação de PCR.

Contudo, nenhuma opção atendeu às especificações exigidas de temperatura e aos parâmetros de desempenho frente a ocorrência de: Harpins (possibilidade de auto-ligação no próprio primer “grampos”), Self-dimer (possibilidade de ligação

indesejada entre dois primers) ou Hetero-dimer (possibilidade de ligação entre primers diferentes). Dessa forma, foi necessário recorrer à literatura científica publicada, e um novo primer foi adaptado, proveniente de CHEN *et al.*, 2024, com as sequências forward GCCGATTGTGAACATGGACTA e reverse TCGTAGTTGAGCACGCTGAA, que atenderam a todos os requisitos listados.

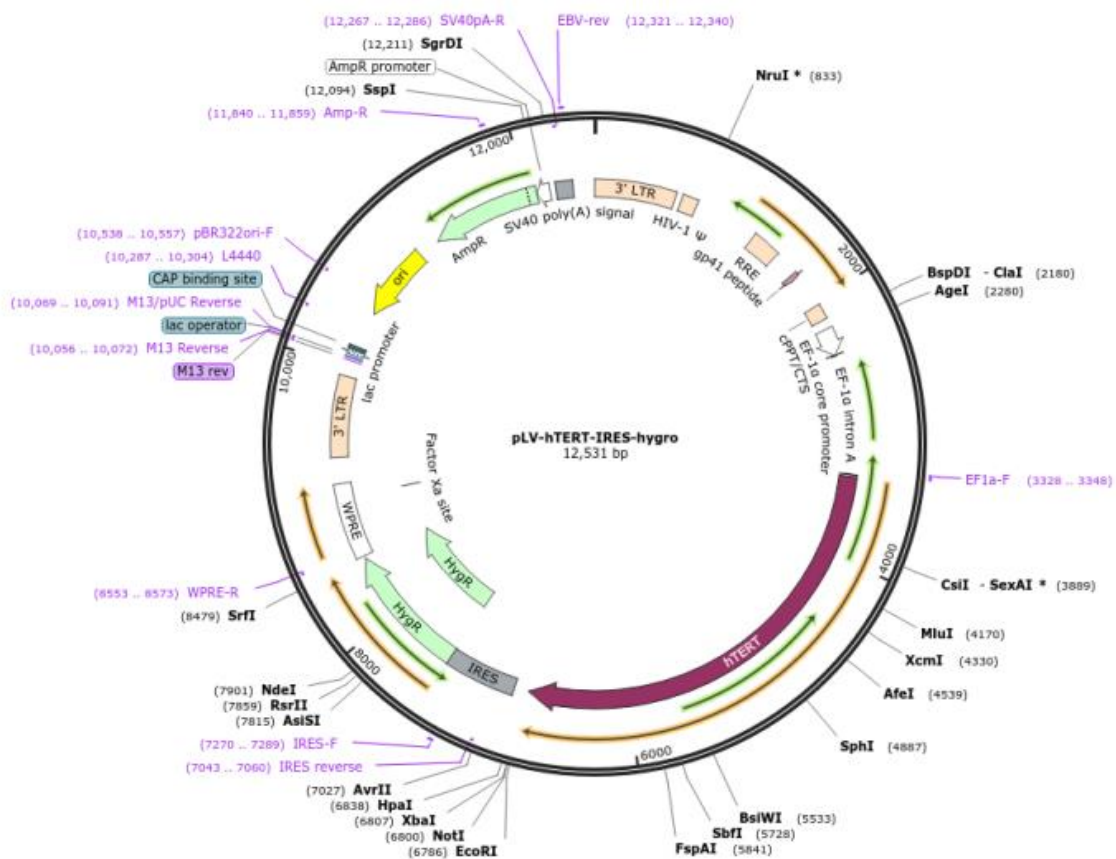


Figura 13: Plasmídeo sintetizado com a sequência do gene hTERT. Fonte: Arquivo institucional Addgene (2024).

3.2.9. Reação em cadeia da polimerase convencional (PCR).

Para a confirmação frente a imortalização celular foi necessário a realização do PCR convencional para a confirmação da presença e atividade do gene hTERT.

As amostras de DNA genômico e cDNA provenientes do RNAm foram amplificadas pelo pelo método convencional com o uso do Termociclador ProFlex PCR system com a Taq Platinum Polimerase (Thermo Scientific). As reações seguiram o protocolo térmico já descrito anteriormente. Ao final, o produto do PCR foi destinado à eletroforese para a visualização de bandas em gel de agarose.

3.2.10. Eletroforese

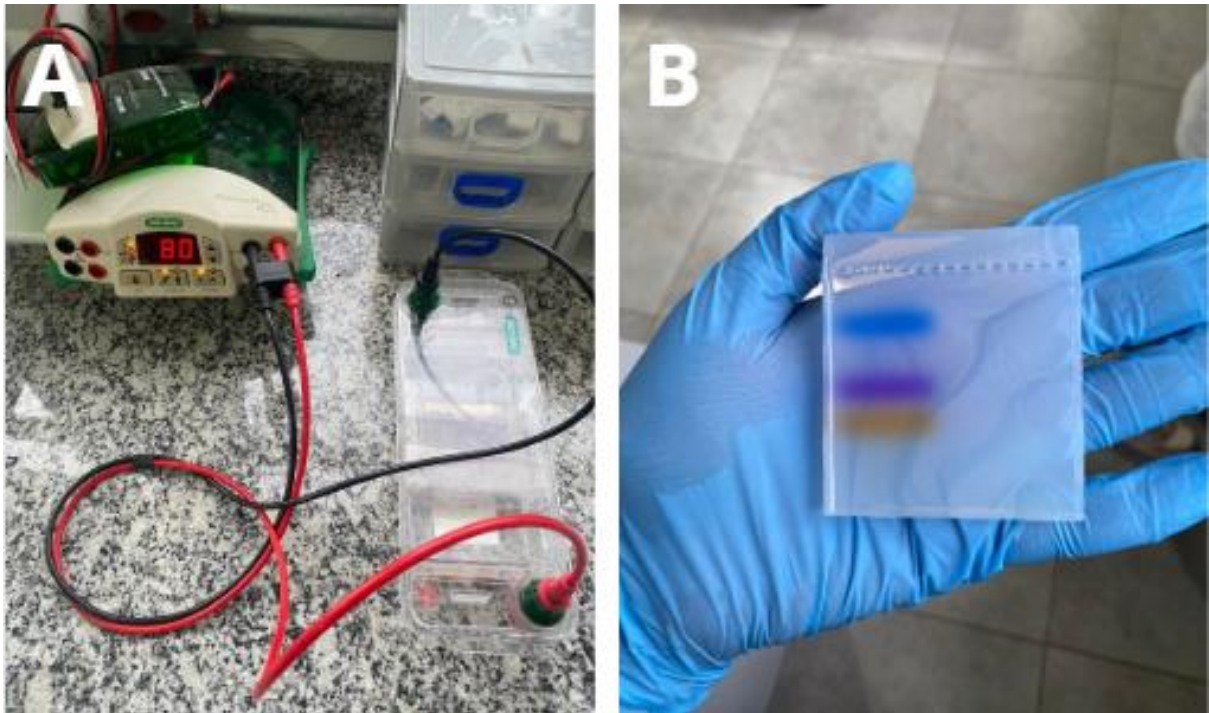


Figura 14: Eletroforese em gel de agarose para a visualização de bandas relativas a presença/ausência do DNA de interesse. A. Equipamento biorad de eletroforese B. Gel de agarose após corrida em eletroforese. Fonte: Arquivo pessoal (2025).

A eletroforese foi realizada utilizando o gel de agarose 2% (0,9g de agarose e 45mL de TAE) corado com 4,5mL de Syber-safe. Para a visualização de bandas, foram adicionados 2uL de corante Blue juice a 10 uL de amostra. A voltagem utilizada foi de 80V e 400A por 40 minutos (Figura 14).

3.2.11. Processamento citogenético de cultivos celulares

Foi realizada a fixação de material pós-cultivo de fibroblastos de cervo-do-pantanal, búfalo, calopsitas e de células de pluripotência induzida bovinas. Quando as células atingiam 80% de confluência, foram tripsinizadas (conforme protocolo previamente descrito) e retornaram ao frasco para serem colhidas após 24 horas. Para isso, foi adicionado 60 μ L de colchicina às garrafas, e então foram incubadas a 38 °C por 1 hora. Após esse período, as células foram novamente tripinizadas, transferidas para tubos e centrifugadas. Os sobrenadantes foram então descartados e os sedimentos homogeneizados com solução hipotônica de KCl 0,067 M em banho-maria por 20 minutos a 38 °C. Em seguida, foi realizada a pré-fixação do material com 100

μL de uma solução de metanol e ácido acético em proporção 3:1, centrifugando a 300 g por 5 minutos. Os sobrenadantes foram descartados novamente, e a suspensão foi preparada para a fixação. As lâminas foram preparadas segundo o método convencional de Giemsa (VERMA; BABU, 1995).

4. Discussão das atividades de estágio.

Durante o estágio, foram realizadas atividades de pesquisa acadêmica, incluindo o desenvolvimento de técnicas de biologia celular, como isolamento, cultivo e manutenção de diferentes estágios de fibroblastos de várias espécies. Além disso, foram feitas análises moleculares avançadas para caracterizar células após reprogramação genética. Essas atividades foram essenciais para consolidar os conhecimentos adquiridos na graduação, com ênfase na aplicação prática, voltada principalmente para pesquisas em genética e reprodução animal.

A experiência em elaborar um relato de caso sobre a produção de células exogenamente reprogramadas proporcionou maior conscientização científica, contribuindo para o amadurecimento profissional, especialmente considerando que essa área tem despertado crescente interesse na pesquisa médica e é de extrema importância para a construção de estratégias de conservação de espécies selvagens.

Por se tratar de um laboratório com uso de diversas espécies, foi possível acompanhar avanços na espécie bovina, como a tentativa da gametogênese *in vitro*, e assim compreender os desafios de adaptar metodologias para espécies não convencionais. Por exemplo, para as espécies de cervídeos neotropicais, ainda não há um protocolo bem-sucedido para geração células iPS a partir de fibroblastos adultos.

Assim, é importante entender que a indução da pluripotência nessas células é bastante difícil, exigindo pesquisas que explorem o desenvolvimento embrionário e a expressão gênica do grupo, para identificar quais os fatores sustentam a manutenção do estado de pluripotência embrionária.

Além disso, considerando a conservação de espécies e a potencial utilização de células iPS na produção de gametas, é importante desenvolver vetores específicos para cada espécie, já que todos os projetos que tentaram induzir a reprogramação à pluripotência utilizaram os fatores OSKM humanos e murinos, o que é uma

problemática para o desenvolvimento de embriões e novos indivíduos a partir destes. Ainda nesse âmbito, vale ressaltar a importância do uso de entregas gênicas não incorporativas ao genoma.

Isso também se aplica à imortalização celular com o fator hTERT, pois, além de ser um agente exógeno, é de origem estranha à espécie (humana). Felizmente, sua ação não está relacionada ao genoma do animal, atuando apenas na extremidade do cromossomo, diretamente na telomerase, sendo uma ação promissora para estocagem de material para biobancos de diversidade genética e faunística.

Ainda na questão da espécie específica, durante o desenvolvimento dos experimentos com células de animais não convencionais, surge o desafio de utilizar primers endógenos específicos. Assim, para construir sequências específicas, é necessário o genoma completo, que ainda não é totalmente descrito para a maioria das espécies neotropicais. Como alternativa, a maioria dos primers é baseada em animais filogeneticamente próximos, o que pode levar a erros.

Portanto, a participação e a elaboração de projetos que envolvam toda essa problemática celular possibilitaram compreender os processos moleculares e biológicos envolvidos nesta determinada área da biotecnologia e medicina veterinária.

5. Considerações finais.

O período de estágio curricular em prática veterinária foi de grande importância para a formação acadêmica, possibilitando a ampliação do conhecimento teórico e prático na área de pesquisa acadêmica, principalmente no acompanhamento e desenvolvimento de atividades relacionadas à manutenção celular de fibroblastos de diversas espécies, além da participação em encontros de discussão sobre os projetos desenvolvidos com a equipe.

Neste âmbito, é importante ressaltar que as atividades realizadas no laboratório REPROCEL são pouco difundidas na realidade do profissional da medicina veterinária, sendo atualmente exclusivas de caráter científico. Contudo, há grande possibilidade de difusão no futuro, como no caso do desenvolvimento de carne cultivada em laboratório. Portanto, a experiência com as metodologias descritas foi de extrema importância para a formação profissional da aluna. Dessa forma, as metodologias realizadas facilitaram a compreensão de biologia celular por meio do

cultivo de células e de biologia molecular, com o objetivo de caracterizar a manutenção celular *in vitro*.

II- CASO DE INTERESSE: Imortalização celular de fibroblastos de cervo-do-pantanal (*Blastocerus dichotomus*) visando à conservação prolongada de material biológico.

1. Introdução

O cervo-do-pantanal (*Blastocerus dichotomus*), maior exemplar da família Cervidae que ocupa o território brasileiro, está atualmente classificado como “vulnerável” pela lista vermelha da União Internacional para a Conservação da Natureza (IUCN) (IUCN, 2025). Está ameaçado por conta do declínio populacional que em poucas décadas foi provocado pela intensa fragmentação de habitat e ações humanas como a caça, avanço agropecuário e o estabelecimento de hidrelétricas (ANDRIOLO *et al.*, 2013; GONZÁLEZ; DUARTE, 2020).

Atualmente, a espécie persiste com poucos exemplares em áreas residuais ainda preservadas em regiões de várzea como as dos rios Paraguai, Paraná, São Francisco, Araguaia, Tocantins, Xingu e Guaporé (TIEPOLO; TOMAS, 2006). Estimativas populacionais documentaram queda acentuada de 54% em populações de vida livre como a de Porto Primavera (SP), sendo indispensáveis ações de conservação voltadas diretamente à espécie (ANDRIOLO *et al.*, 2013).

Desta forma, visando à conservação de espécies selvagens, estratégias são desenvolvidas para estoque da diversidade genética, com utilização de técnicas de reprodução assistida para aumentar a diversidade populacional nos fragmentos naturais ainda existentes (SHIVAJI *et al.*, 2003; SILVA *et al.*, 2022). Para este fim, é necessário determinar geneticamente as populações ainda remanescentes, mas também realizar o armazenamento e a manutenção dos bancos de germoplasma, entre eles os que mantêm fibroblastos (DUARTE *et al.*, 2012; MÁRQUEZ *et al.*, 2006; PRAXEDES *et al.*, 2018).

Fibroblastos armazenados podem servir de base para estudos moleculares, citogenéticos e até biotécnicas reprodutivas (EVANGELISTA *et al.*, 2022; SHWARTZ *et al.*, 2007). Exemplos como a clonagem por transferência nuclear ou ainda a geração

de iPS, demonstram por meio de estudos preliminares em espécies domésticas a possibilidade de produzir células germinativas primordiais e até mesmo células gaméticas, como oócitos e espermatozoides, a partir de células pluripotentes cultivadas *in vitro* (BRESSAN *et al.*, 2016; MACHADO *et al.*, 2018; PEREIRA *et al.*, 2019). Este processo poderia facilitar programas de reintrodução a longo prazo devido ao valor genético de indivíduos fundadores (PEREIRA *et al.*, 2023).

Vale ressaltar que células mantidas por muito tempo em cultura podem apresentar desafios devido à capacidade de proliferação e distinção de linhagens celulares (HAYFLICK, 1965). Fato explicado pelo limite de divisões celulares que as células em cultura possuem, fenômeno conhecido como limite de Hayflick, devido ao encurtamento dos telômeros que é um dos principais responsáveis pela senescência e apoptose celular (CHALAK *et al.*, 2024; HAYFLICK *et al.*, 1961; HARLEY *et al.*, 1990).

O uso prolongado de fibroblastos nos centros conservacionistas torna-se um empecilho, uma vez que se trata de um recurso biológico limitado. Isso gera a necessidade de coletas repetidas, inviáveis em animais de vida livre por diversos motivos: a captura e a sedação, para a obtenção de biópsias, são procedimentos arriscados, especialmente para espécies como o cervo-do-pantanal, que podem desenvolver patologias relacionadas ao estresse de captura, como também riscos para a equipe de manejo, além das questões éticas relacionadas (CHALAK *et al.*, 2024; GASPARINNI *et al.*, 1997). Outro fator dificultoso é referente ao valor genético de indivíduos geneticamente importantes para a população, sendo que, em muitos casos, é possível realizar apenas uma única coleta de material biológico (JAMIELSON, 2015).

Dessa forma, uma alternativa são as células imortais (ou imortalizadas), que, por meio de mecanismos exógenos, como a inserção de genes específicos utilizando lentivírus, passam a não entrar em senescência mesmo após múltiplas passagens em cultivo (WANG *et al.*, 2019). Isso permite que o material possa ser utilizado por tempo indefinido. Para a imortalização celular, é essencial preservar o genótipo e fenótipo próximos ao da célula primordial. Por isso, são desenvolvidas técnicas específicas que garantem essa preservação (MACDONALD, 2008).

Uma técnica atualmente utilizada envolve o uso do gene hTERT, que sintetiza a transcriptase reversa da telomerase humana e é responsável por acrescentar sequências repetidas de DNA às extremidades dos cromossomos, ajudando a retardar a senescência celular (CONG *et al.*, 1999). Para conferir essa capacidade à célula, é necessária a inserção do gene hTERT, que é fundamental para restaurar a atividade da enzima telomerase, responsável por manter a integridade da estrutura do DNA (CHALAK *et al.*, 2024; MACNEIL *et al.*, 2016).

O avanço no estabelecimento de linhagens imortais forneceria subsídios e dados genéticos capazes de fornecer informações importantes acerca de espécies que sofreram grandes mudanças populacionais como também embasar pesquisas futuras para biotecnologias (STRONEN *et al.*, 2018). Quanto às espécies de cervídeos, linhagens imortais celulares já foram realizadas por meio do gene hTERT de células tronco de chifres de veado sika (*Cervus nippon*) e em fibroblastos de cervo milu (*Elaphurus davidianus*) por meio da expressão do oncogene SV40T (CHEN *et al.*, 2024; ZHANG *et al.*, 2025). Porém, até o momento, não há relatos na literatura quanto ao desenvolvimento de linhagens fibroblásticas *in vitro* para cervídeos brasileiros, como o cervo-do-pantanal, utilizando a expressão exógena do hTERT.

2. Revisão de literatura

2.1. Introdução à cultura de células de animais selvagens

O cultivo de células animais é amplamente utilizado devido à acessibilidade, ao menor custo e à facilidade de reprodutibilidade de dados, sendo um ótimo modelo destinado a pesquisas, como no estudo de agentes microbiológicos, biologia celular, patogênese e genética. (ZHAO, 2023).

As células podem ser obtidas de animais a partir de diferentes formas e de diversos tipos, sendo os fibroblastos os mais comuns devido à sua alta adaptabilidade em cultivo *in vitro* (FERNANDES *et al.*, 2014; (VILLEGAS; MCPHAUL, 2005).

Desta forma, para a obtenção de culturas celulares, o método mais comum é a desagregação e expansão a partir de um pequeno fragmento de biópsia. Uma vez estabelecidas, é possível destiná-las ao subcultivo para expansão ou criopreservação,

a fim de realizar a estocagem de material biológico por longos períodos (FRESHNEY, 2005; JANZ *et al.*, 2012).

Para espécies selvagens, a coleta de fragmentos é mais complexa, pois requer a captura e sedação de animais livres para obter biópsias, o que pode ser difícil dependendo do treinamento da equipe (CHALAK *et al.*, 2024; GASPARINNI *et al.*, 1997). No entanto, ao coletar e armazenar materiais biológicos de espécies ameaçadas em biobancos, torna-se possível preservar a diversidade genética de populações vulneráveis (SILVA *et al.*, 2022).

Estes avanços são particularmente pertinentes, pois, com o sucesso no estabelecimento de linhagens celulares de diversos animais, é possível avançar em pesquisas como clonagem por transferência nuclear ou ainda na geração de células-tronco pluripotentes induzidas (iPS) (BRESSAN *et al.*, 2016; MACHADO *et al.*, 2018; PEREIRA *et al.*, 2019), visando à reintrodução de espécies ameaçadas de extinção.

Outra aplicação relevante dos biobancos é servir como fonte para estudos taxonômicos de espécies com questões de identidade, onde o uso de fibroblastos é indispensável tanto para análises moleculares quanto para a obtenção de cromossomos para análises citogenéticas (STACE, 2000).

2.2. Senescência replicativa e imortalização celular

Todavia, o desafio contínuo ao manter células em cultivo prolongado é a senescência replicativa, causada por múltiplas passagens que geram danos oxidativos e o encurtamento dos telômeros, mecanismo natural do envelhecimento (REGULSKI., 2017).

O máximo número de divisões que as células mantidas em cultura *in vitro* completam antes de entrar em senescência celular é definido como limite de Hayflick, postulado pelo pesquisador no ano de 1974, ao demonstrar que linhagens celulares fetais de humanos poderiam se replicar apenas entre 40 a 60 vezes em cultivo antes de sofrerem apoptose devido ao encurtamento das extremidades teloméricas (HAYFLICK; MOORHEAD, 1961; VERMA *et al.*, 2020;).

Estes constituem elementos repetitivos de DNA nas extremidades dos cromossomos cuja função é proteger e permitir que o código genético mantenha sua estrutura durante a replicação (HAHN;MEYERSON, 2001). Porém, com o passar das divisões mitóticas, os telômeros encurtam seu comprimento, comprometendo a integridade genética e facilitando a ocorrência de fusões entre cromossomos, o que dá origem a ganho ou perda de material genético (CASTRO *et al.*,2024; KIM *et al.*, 2016). Portanto, a instabilidade cromossômica gerada é a principal origem dos danos ao DNA e da formação de linhagens cancerígenas (FANG *et al.*, 2016).

Para prevenir a proliferação destas células *in vitro* e *in vivo*, ocorre a indução da senescência, um processo controlado pelos mecanismos de regulação do ciclo celular (SERRANO; BLASCO, 2001; LLOYD, 2002). Proteínas como p53, p16 e Rb são as principais ativadoras dessa via e trabalham juntas para impedir a transcrição celular, o que, por sua vez, conduz à apoptose e à perda da linhagem (BEN-PORATH; WEINBERG, 2005).

Esse fato representa um obstáculo para atividades de cultivo celular, pois, como já discutido, os fibroblastos são recursos biológicos limitados que requerem novas biópsias frequentes de animais para assegurar a viabilidade do material (CHALAK *et al.*, 2024; GASPARINNI *et al.*, 1997). Por isso, uma alternativa eficaz são as células imortalizadas, que, através da manipulação exógena de oncoproteínas e/ou do hTERT(transcriptase reversa da telomerase humana), evitam que os mecanismos de controle do ciclo celular sejam ativados, favorecendo a estabilidade por períodos mais longos em cultivo, além de manterem o genótipo e o fenótipo semelhantes aos das células de origem (BARDET *et al.*, 2023; SHAY *et al.*, 1991).

A manipulação exógena por meio da superexpressão do hTERT é responsável pela adição de sequências de nucleotídeos a fim de restaurar o comprimento e a função dos telômeros, protegendo assim o código genético da degeneração (COHEN *et al.*, 2007). Como também o uso de vetores clonados de oncogenes e proteínas, como E6/E7 do HPV16, responsável por inativar as vias p53, p16 e Rb, ativando indiretamente a telomerase e bloqueando a cascata da senescência celular (ROGER *et al.*, 2021). Relatos afirmam que, dependendo do tipo celular e da espécie em questão, deve-se realizar as duas manipulações conjuntamente para o sucesso da

imortalização *in vitro* como no caso de fibroblastos humanos (KIYONO *et al.*, 1998; MATSUMURA *et al.*, 2004).

Atualmente, a abordagem da entrega gênica varia de acordo com o protocolo aplicado, podendo ser viral, utilizando lentivirais, altamente eficazes para a transdução em fibroblastos (Kalidasan *et al.* 2021). Como também, os vetores não virais que utilizam a lipofecção ou a eletroporação, porém com menor eficiência de integração no genoma (GAO *et al.*,2007). Ainda há sistemas modernos como o CRISPR/Cas9, que, por meio de quebras em regiões específicas do DNA genômico, conseguem realizar a edição gênica (KANE *et al.*, 2008).

Como ressalva, a imortalização pode provocar alterações celulares indesejadas, como mudanças no genótipo, na morfologia e alterações cromossômicas, como as aneuploidias e trissomias, que são menos comuns com o uso do hTERT, em comparação aos oncogenes virais (SHITOVA *et al.*, 2024; XIE *et al.*, 2016).

No campo da medicina veterinária, o estabelecimento de células imortalizadas já foi bem-sucedido em mamíferos e aves, representando uma fonte contínua de material biológico para a criação de biobancos, seja para produzir carne cultivada ou manter estoques de biodiversidade (GUO *et al.*, 2022; SOICE & JOHNSTON, 2021; RYDER & ONUMA *et al.*, 2018). Como exemplo do benefício do uso de células imortalizadas em pesquisas celulares, a transformação pode facilitar a reprogramação de células para a pluripotência ao silenciar epigeneticamente locus como o *Ink4a/Arf*, uma das principais vias que impedem a manutenção (UTIKAL *et al.*,2009).

2.3. Imortalização celular em células de cervídeos

Até o momento da escrita desse relato, só haviam dois estudos que obtiveram eficiência em imortalizar linhagens celulares de cervídeos, ambos realizados em territórios chineses (CHEN *et al.*, 2024 ; ZHANG *et al.*, 2025).

O primeiro caso, publicado em outubro de 2024, Chen e colaboradores obtiveram êxito em imortalizar células-tronco do chifre de veado-sika (*Cervus nippon*) utilizando a expressão exógena do hTERT por via lentiviral, as células-tronco mantiveram fenotipicamente normais, com alto potencial de passagem celular e

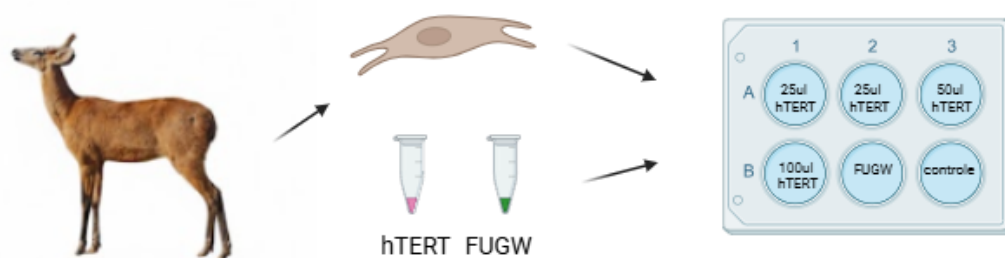
diferenciação (CHEN *et al.*, 2024). Por sua vez, em outubro de 2025, Zhang e colaboradores publicaram o primeiro relato de linhagens de fibroblastos imortalizadas de cervo milu (*Elaphurus davidianus*) por inserção exógena do oncogene SV40T, que apresentaram positivamente alta proliferação e permaneceram estáveis em cultivo *in vitro* (ZHANG *et al.*, 2025).

Contudo, até o momento, não foram relatados o estabelecimento e a caracterização de células imortalizadas em cervídeos brasileiros.

3. Relato de caso

Este caso reporta a produção de fibroblastos imortalizados *in vitro* de cervo-do-pantanal, por meio da técnica lentiviral de inserção do gene hTERT e sua caracterização, avaliando a intensidade de receptividade de integração viral, expressão gênica, morfologia e integridade genética. Para isso, fibroblastos de três animais foram descongelados em segunda passagem e destinados ao cultivo para a expansão.

Após atingirem 70% de confluência, as células foram desprendidas e replaqueadas, para os experimentos de imortalização a seguir: grupo controle negativo, grupo FUGW (para avaliar a eficiência da integração viral com o gene GFP) e grupo hTERT (separados de acordo com diferentes volumes da alíquota de partículas lentivirais utilizadas: 25 μ L, 50 μ L e 100 μ L, respectivamente) (Figura 15).



Created in BioRender.com 

Figura 15: Esquema representativo do experimento de imortalização de fibroblastos de cervo-do-pantanal (*Blastocerus dichotomus*) utilizando vetores lentivirais hTERT e FUGW. Fonte: Arquivo pessoal elaborado no BioRender.com (2025).

Para isso, os fibroblastos foram semeados desta vez em placas de 6 poços, com uma concentração de 2×10^4 células em 2 mL de meio IMDM, suplementado com

10% de soro fetal bovino (SFB), e submetidos à transdução lentiviral contendo o gene de interesse por 8 horas. Após esse período, o meio foi trocado, agora contendo a adição de 1% de penicilina/estreptomicina. As células foram acompanhadas diariamente em cultivo, com troca de meio a cada 48 horas.

Quando a concentração celular se aproximava da confluência máxima de 80% da área do frasco de cultivo, foi realizado o repique e transferência celular para novos recipientes, a fim de manter a atividade mitótica das células e evitar alterações epigenéticas devido à concentração celular.

As amostras foram inicialmente mantidas em cultivo por 10 dias para análise da morfologia celular em 3, 5 e 10 dias pós-transdução. Ao final do período, foi observado que as células em cultura apresentaram ligeiro alongamento do citoplasma, sem nenhuma outra mudança significativa na conformação celular (Figura 16).

Ao final dos 10 dias de observação, foi separado material para extração de DNA genômico e RNA; este foi destinado à posterior síntese de cDNA. Também, uma parte das células foi destinada à expansão para a caracterização do tempo de duplicação e do cariótipo, ambos pré e pós-transdução, para comparação.

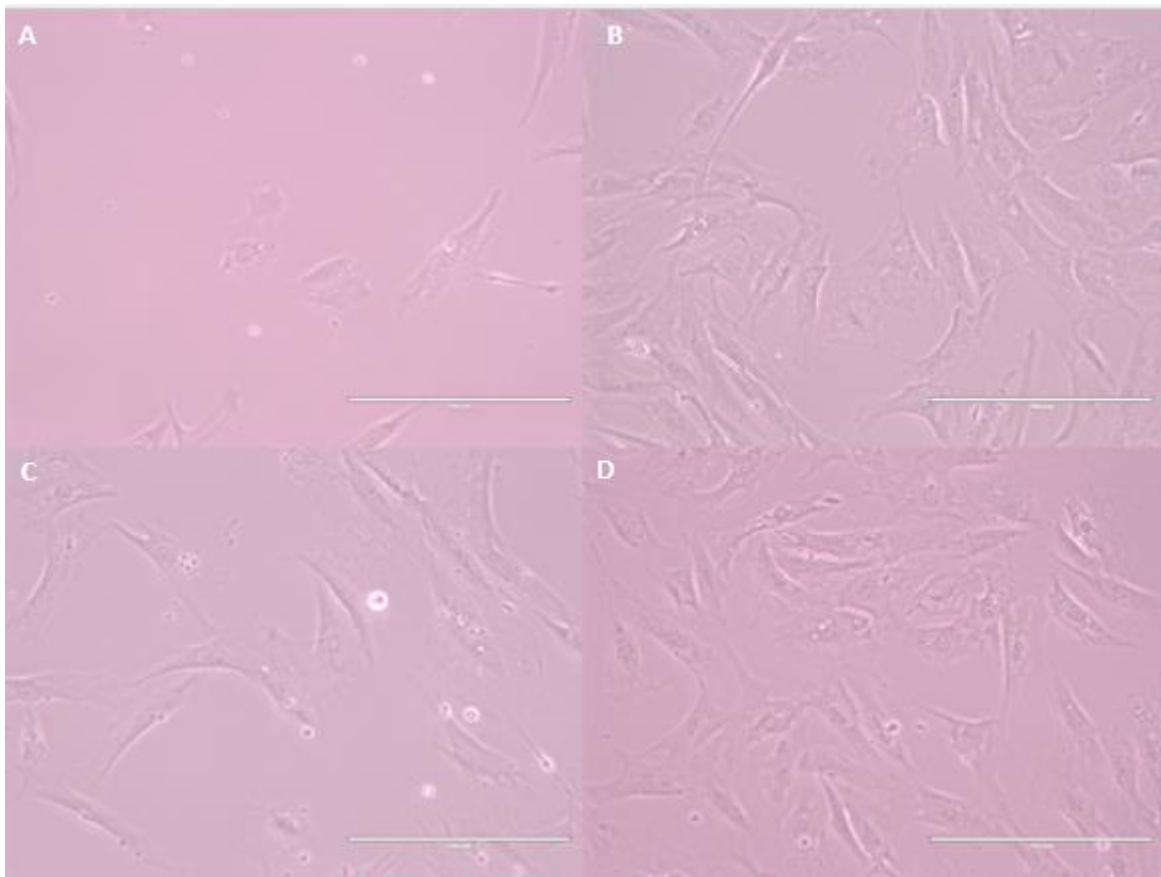


Figura 16: Morfologia de fibroblastos em cultivo *in vitro* de cervo-do-pantanal (*Blastocerus dichotomus*) após dez dias de transdução lentiviral. A. Morfologia das células

controle negativo B. Morfologia das células submetidas a 25 µL da alíquota de partículas lentivirais hTERT. C. Morfologia das células submetidas a 50 µL da alíquota de partículas lentivirais hTERT. D. Morfologia das células submetidas a 100 µL da alíquota de partículas lentivirais hTERT.

Para a estimativa do tempo de duplicação celular, os fibroblastos foram plaqueados antes e após o experimento em placas de 24 poços previamente revestidas por gelatina proveniente de pele bovina a 0,1%, contendo a concentração inicial de 10^4 células por poço com 500 µL de meio IMDM, suplementado com 10% de SFB e 1% de penicilina/estreptomicina.

A contagem celular foi realizada por meio da Câmara de Neubauer em quatro períodos de 24 horas sucessivos, para a estimativa do tempo de duplicação celular antes e após transdução lentiviral (Tabela 1). Desta forma, foi considerada a média de 6 replicadas pelos períodos citados.

Tabela 1: Parâmetros da análise do tempo de duplicação (doubling time) de fibroblastos de três espécimes de cervo-do-pantanal (*Blastocerus dichotomus*) antes e após a transdução com diferentes volumes da alíquota de vetor lentiviral hTERT.

Animal	Doubling time (antes da transdução)	Doubling time pós-transdução (25 uL Htert)	Doubling time pós-transdução (50 uL Htert)	Doubling time pós-transdução (100 uL Htert)
A1	34 h	37 h e 51 min	33 h e 56 min	32 h
A2	25 h e 12 min	41 h	41 h	40 h
A3	21 h e 51 min	39 h	60 h	32 h

Para a análise de integração viral, os fibroblastos foram ressuspensos e homogeneizados em PBS para passagem na citometria de fluxo. Para isso, foi selecionada uma população celular sugestiva de fibroblastos, e foi comparada a emissão de luz em células submetidas à proteína GFP ao grupo controle negativo. Todas as amostras obtiveram uma boa porcentagem de aceitação à integração viral, conforme visto na Figura 20, com média de 86,5%. Destaque para o animal A1, que apresentou 99% de integração.

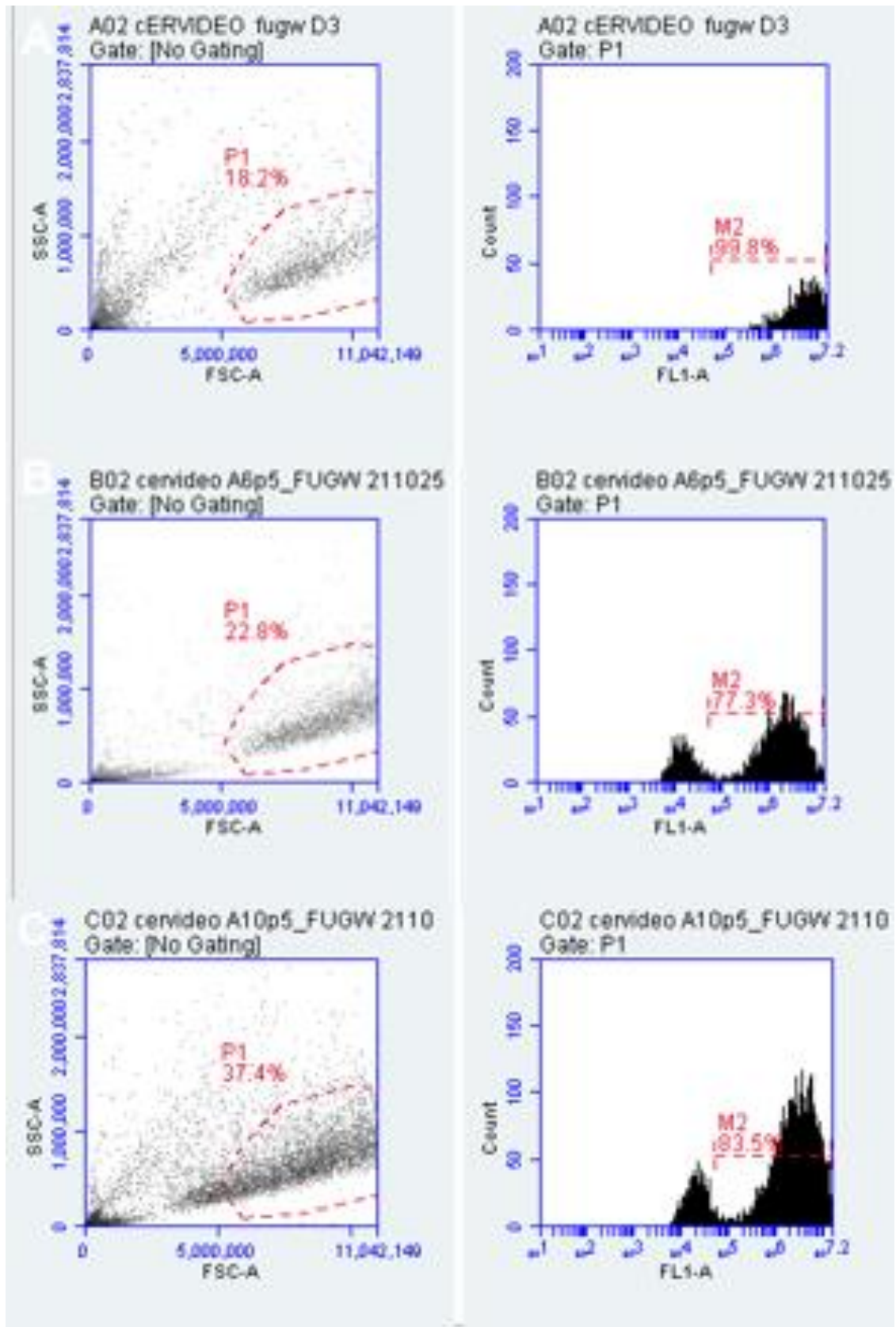


Figura 17: Citometria de fluxo para análise de fluorescência de fibroblastos de cervo-do-pantanal (*Blastocerus dichotomus*) transduzidos com o vetor lentiviral FUGW. A. análise do animal A1 demonstrando 99,8% de eficiência de integração viral. B. Análise do animal A2 demonstrando 77,3% de eficiência de integração viral. C. Análise do animal A3 demonstrando 83,5% de eficiência de integração viral.

Durante o repique celular do primeiro animal A1 no sexto dia pós-transdução, foi realizada, adicionalmente, uma avaliação da manutenção da cultura. Para isso, foi realizado um teste de integridade da membrana celular por meio do corante azul de tripan. Este corante tingem de azul as células que sofreram ruptura na membrana, distinguindo o citoplasma de células apoptóticas de células viáveis. Com isso, foi observado que, conforme aumentou a carga viral, também aumentou a viabilidade dos fibroblastos (Tabela 2).

Tabela 2: Parâmetro de viabilidade por azul de tripan demonstrando a porcentagem de células vivas no total de células da amostra em cultivo *in vitro* da primeira espécie de cervo-do-pantanal (*Blastocerus dichotomus*) submetidos a transdução lentiviral de hTERT.

GRUPOS	VIABILIDADE CELULAR POR AZUL DE TRIPAN
CONTROLE	63%
25uL hTERT	73%
50uL hTERT	88%
100uL hTERT	93%

A amplificação do material genético ocorreu por meio da reação em cadeia da polimerase pelo método convencional. Utilizaram-se as células não transduzidas como controle negativo e o plasmídeo do gene como controle positivo.

Para a reação, foram utilizados os primers forward GCCGATTGTGAACATGGACTA e reverse TCGTAGTTGAGCACGCTGAA, ambos adaptados de CHEN *et al.*, 2024, com tamanho molecular de 119 pares de bases.

Uma vez obtido o produto das reações, foi corrido no gel de agarose para a visualização de bandas positivas para a presença de integração como também para a expressão do hTERT, confirmando a immortalização dos fibroblastos por meio da inserção exógena conforme verificado na figura 18.

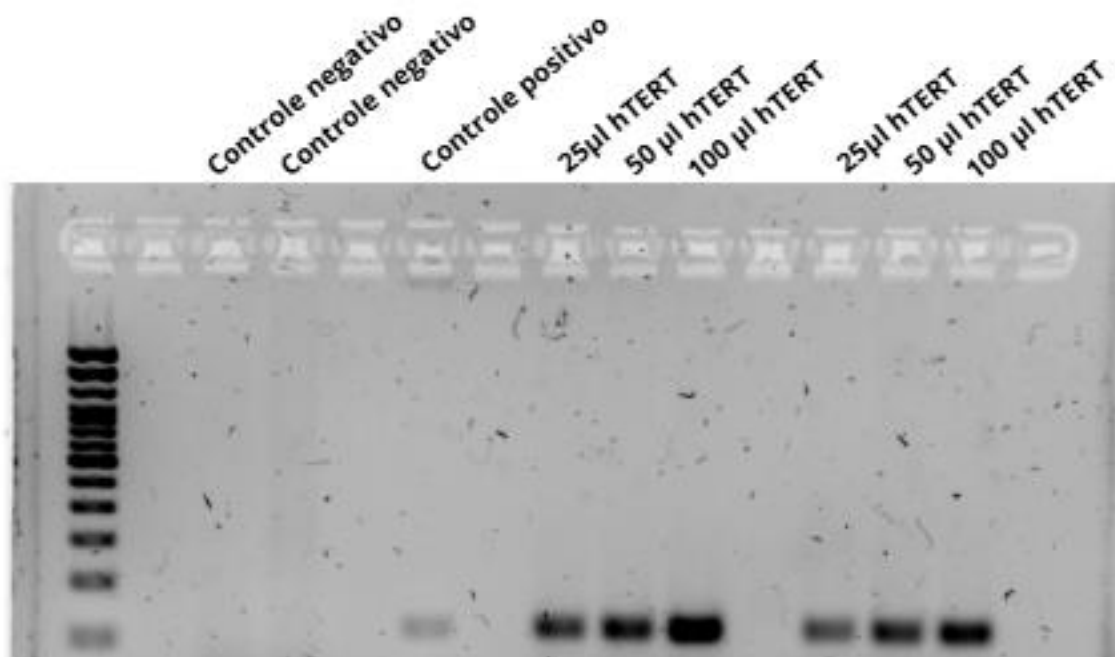


Figura 18: Eletroforese em gel de agarose para demarcação de banda positivas ao PCR de cDNA correspondente ao hTERT.

Para a análise de integridade e quantidade cromossômica, parte das células imortalizadas foram destinadas à fixação pela solução de metanol e ácido acético. Para a visualização de metáfases, foram confeccionadas lâminas pelo método convencional e coradas por Giemsa, e visualizadas sob microscópio de luz, sendo tiradas fotomicrografias para contagem. Nas metáfases analisadas, não houve alteração no número de cromossomos da espécie ($2n=66$).

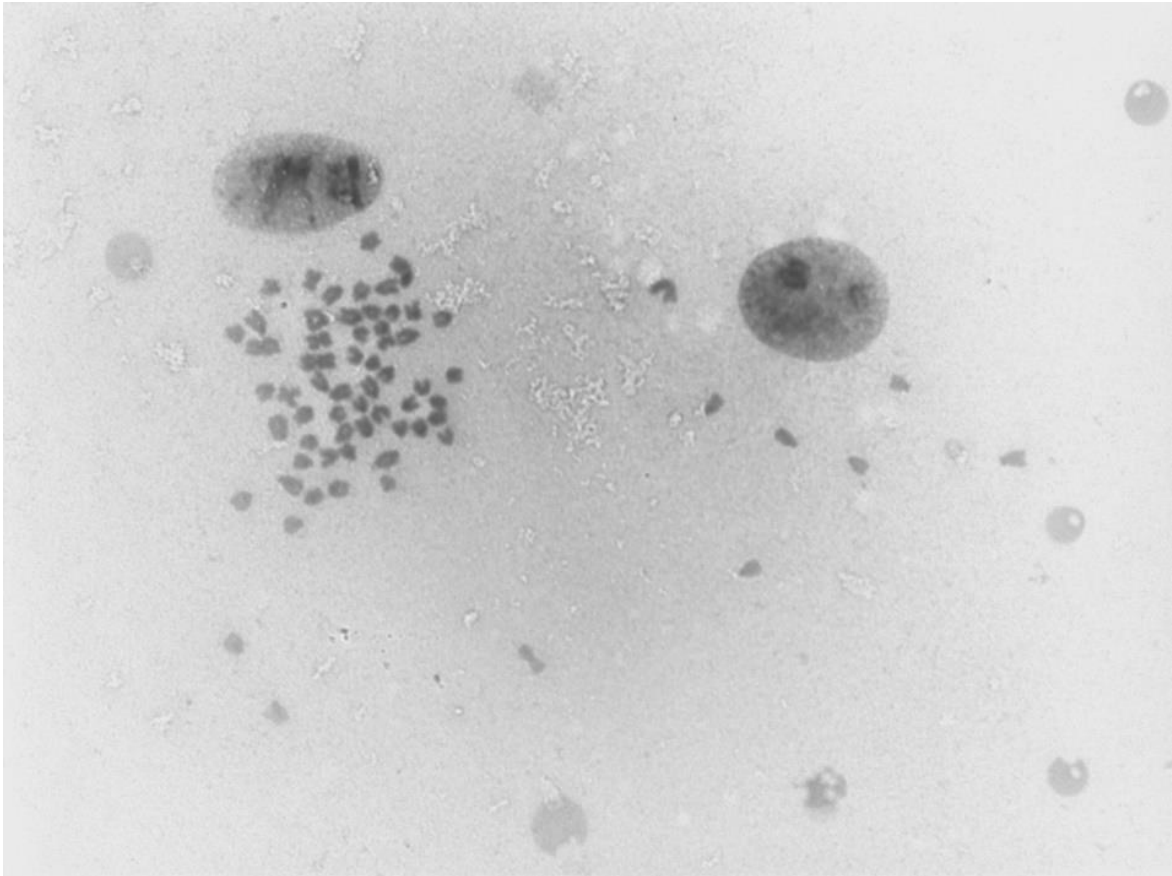


Figura 19: Metáfase para a visualização de cromossomos provenientes de fibroblastos imortalizados de cervo-do-pantanal (*Blastocerus dichotomus*) coradas com Giemsa(60X). Fonte: Arquivo pessoal (2025).

4. Discussão

Fibroblastos submetidos ao cultivo por tempo prolongado apresentam a problemática da senescência replicativa devido ao encurtamento de telômeros, o que acarreta perda de recurso biológico (REGULSKI *et al.*, 2017). Essa limitação é especialmente relevante, uma vez que biópsias de pele são valiosas devido à dificuldade de obtenção em populações de animais selvagens em vida-livre (CHALAK *et al.*, 2024; SANTOS *et al.*, 2022).

Desta forma, o objetivo deste relato foi estabelecer fibroblastos imortalizados utilizando o gene hTERT como único promotor, abordagem validada em estudos recentes com outras espécies de animais (LIU ET AL.,2025; PETKOV *et al.*,2018; YAN *et al.*,2023).

Para a imortalização ser bem-sucedida, os fibroblastos devem manter-se semelhantes às células de origem, com exceção da maior capacidade proliferativa *in vitro* (MACDONALD, 2008). Neste aspecto, ainda não há um consenso científico

quanto ao aspecto celular após a inserção do hTERT, embora seja conhecido que células que apresentam morfologia arredondada devem ser descartadas por conta de alterações em cultivo e cariótipo aberrantes (XIE *et al.*, 2016).

Neste estudo, não houve alteração morfológica considerada, apenas um discreto alongamento do citoplasma, semelhante ao formato de agulha descrito por Petkov e colaboradores em 2018

Em relação à proliferação celular, contraditoriamente, a maioria das amostras após 10 dias de imortalização demonstraram maior tempo para a duplicação celular.

O fato pode ser explicado pela taxa de eficácia relatada na literatura científica de aproximadamente 10% para integração e expressão gênica eficazes na transdução lentiviral para o gene hTERT (SHITOVA *et al.*, 2024). Portanto, a população celular ao final décimo dia ainda era heterogênea, pois continha fibroblastos que incorporaram, incorporaram e expressaram o gene e células selvagens.

Diante disso, a maioria dos estudos realiza essa análise somente após aproximadamente 50 dias com diversas passagens celulares, devido à homogeneização da cultura ser obtida através do mecanismo natural de senescência replicativa em células não transduzidas (LIN *et al.*, 2022). Caso que demandaria mais tempo do que o período de estágio curricular da aluna.

Uma alternativa a essa possibilidade seria o uso de droga seletora, como a higromicina, à qual o plasmídeo utilizado possui uma sequência de gene de resistência, acarretando que somente as células transfectadas sobrevivessem em cultura. No entanto, essa ação foi questionável, pois poderia haver alteração indesejada na expressão gênica (RYU *et al.*, 2017).

Por fim, a reação de cadeia de polimerase possibilitou analisar a resposta celular satisfatória em todos os grupos testados, indicando que o gene hTERT, além de ser integrado, também estava sendo expresso pela maquinaria celular. De forma que o cDNA sintetizado a partir do RNAm celular, é o agente diretamente envolvido a abundância de transcritos do gene de interesse. A fim de padronizar as características observadas durante a revelação da eletroforese, as concentrações de cDNA iniciais em cada uma das reações de PCR partiram de igual valor, a fim de que a intensidade das bandas refletisse valores comparáveis, conforme pôde ser observado através de diferenças quanto a intensidade de demarcação das bandas em gel de agarose das diferentes amostras de interesse.

Uma possível explicação para esse fenômeno ocorreu porque, ao aplicar uma maior carga viral em uma mesma área, um maior número de células foram transfectadas, as quais se sobrepõem àquelas que não tiveram hTERT integrado, revelando uma população com maior abundância de transcritos para o gene de interesse.

Em relação à integridade cromossômica, não houve alteração no número de cromossomos da espécie, com $2n=66$, conforme descrito por Duarte em 1992 (DUARTE; GIANNONI, 1992). Uma vez que o uso do hTERT isolado possui como vantagem manter o número diploide e a estabilidade cromossômica (BODNAR *et al.*, 1998; SHAY, 2016; ROBERTSON *et al.*, 2005).

Sendo assim, os resultados obtidos indicaram que os fibroblastos de cervo-do-pantanal foram responsivos pela integração e expressão exógena da transcriptase reversa da telomerase humana por vetores lentivirais, mantendo a integridade genética, sendo a transdução uma boa alternativa para a inserção exógena do gene, favorecendo o cultivo *in vitro* prolongado de fibroblastos da espécie.

5. Considerações finais

Além de demonstrar a eficácia em imortalizar fibroblastos de passagens tardias *in vitro*, o estudo também foi o primeiro a imortalizar células oriundas de uma espécie de grande importância dentro dos cervídeos neotropicais, utilizando o hTERT como único promotor. Fato de extrema relevância para a manutenção de material biológico em centros de conservação e pesquisa, viabilizando inúmeros trabalhos científicos, além de fornecer subsídios para tecnologias de reprodução visando à reintrodução e recuperação de espécies vulneráveis à extinção em massa.

6. Referências

ANDRIOLO, A. et al. Severe population decline of marsh deer, *Blastocerus dichotomus* (Cetartiodactyla: Cervidae), a threatened species, caused by flooding related to a hydroelectric power plant. **Zoologia (Curitiba)**, v. 30, n. 6, p. 630–638, dez. 2013.

BARDET, J. C. et al. Cell immortalization: In vivo molecular bases and in vitro techniques for obtention. **Biotech**, v. 12, n. 1, p. 14–14, 28 jan. 2023.

BEN-PORATH, I.; WEINBERG, R. A. The signals and pathways activating cellular senescence. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 37, n. 5, p. 961–976, maio 2005.

BODNAR, A. G. et al. Extension of Life-Span by Introduction of Telomerase into Normal Human Cells. **Science**, v. 279, n. 5349, p. 349–352, 16 jan. 1998.

BRESSAN, F. F. et al. Generation of induced pluripotent stem cells from large domestic animals. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 11, n. 1, 25 jun. 2020.

BRESSAN, F.F.; et al.,. In vitro generation of primordial germ cells (PGCs) from induced pluripotent stem cells (iPSCs) in cattle. *Animal Reproduction*, v. 13, n. 3, p. 671, jul.–set. 2016. Proceedings of the 30th Annual Meeting of the Brazilian Embryo Technology Society (SBTE) and 32nd Meeting of the European Embryo Transfer Association (AETE).

CASTRO , C. T. BOTELHO; SOUZA, G. ANDRADE ROCHA DE; SANTOS, P. B. Telomerase no processo de rejuvenescimento: a ação da enzima telomerase. **DELOS Desarrollo Local Sostenible**, v. 17, n. 61, p. e2652–e2652, 12 nov. 2024.

CASTRO, R. C. F. et al. Emerging Contributions of Pluripotent Stem Cells to Reproductive Technologies in Veterinary Medicine. **Journal of developmental biology**, v. 12, n. 2, p. 14–14, 7 maio 2024.

CHALAK, M.; et al., Cell immortality: in vitro effective techniques to achieve and investigate its applications and challenges. *Life (Basel)*, v. 14, n. 3, art. 417, 21 mar. 2024.

CHAPMAN, S. C. et al. **Improved method for chick whole-embryo culture using a filter paper carrier.** Disponível em: <[https://doi.org/10.1002/1097-0177\(20010301\)220:3%3C284::AID-DVDY1102%3E3.0.CO;2-5](https://doi.org/10.1002/1097-0177(20010301)220:3%3C284::AID-DVDY1102%3E3.0.CO;2-5)>.

CHEN, X. et al. Human mesenchymal stem cells. **Cell Proliferation**, v. 55, n. 4, 22

dez. 2021.

CHEN, Z. et al. Inhibition of hTERT/telomerase/telomere mediates therapeutic efficacy of osimertinib in EGFR mutant lung cancer. **Journal of Experimental Medicine**, v. 221, n. 11, 19 set. 2024.

CHEN, Z.; et al., Deer antler stem cells immortalization by modulation of hTERT and the small extracellular vesicles characters. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 11, art. 1440855, 4 out. 2024.

CHOMCZYNSKI, P.; SACCHI, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. **Analytical Biochemistry**, v. 162, n. 1, p. 156–159, abr. 1987.

COHEN, S. B. et al. Protein Composition of Catalytically Active Human Telomerase from Immortal Cells. **Science**, v. 315, n. 5820, p. 1850–1853, 30 mar. 2007.

CONG, Y.; WEN, J.; BACCHETTI, S. The human telomerase catalytic subunit hTERT: organization of the gene and characterization of the promoter. **Human Molecular Genetics**, v. 8, n. 1, p. 137–142, 1 jan. 1999.

DUARTE, J. M. B. et al. **Skin Freezing Technique for Living Cell Bank**. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/356508155_Skin_Freezing_Technique_for_Living_Cell_Bank>. 2021

DUARTE, J. M. B. et al. **Vista do Avaliação do risco de extinção do cervo-do-Pantanal *Blastocerus dichotomus* Illiger, 1815, no Brasil**. Disponível em: <<https://revistaeletronica.icmbio.gov.br/index.php/BioBR/article/view/233/154>>. Acesso em: 19 ago. 2025.

DUARTE, J. M. B.; GIANNONI, M. L. Cytogenetic analysis of the Marsh Deer, *Blastocerus dichotomus* (Mammalia, Cervidae). **Rev. Brasil. Genet.**, v. 18, n. 2, p. 245–248, 1 jan. 1992.

DUARTE, J.M.B. Aspectos taxonômicos e citogenéticos de algumas espécies de cervídeos brasileiros. 153 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento Animal) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, 1992.

DUARTE, J.M.B. Avaliação do risco de extinção do cervo-do-Pantanal, *Blastocerus dichotomus* Illiger, 1815, no Brasil. 2012.

EVANGELISTA, C.R.; OLIVEIRA, H.; SALVARANI, F. Biobancos de animais selvagens: revisão de literatura. **Revista Sociedade e Desenvolvimento**, v. 11, n. 8, 2022.

FANG, E. F. et al. Nuclear DNA damage signalling to mitochondria in ageing. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 17, n. 5, p. 308–321, 9 mar. 2016.

FERNANDES, A. P. ;et al.,. Strategies for the establishment of fibroblastic lines for the conservation of wild mammals. **Veterinary Medicine and Science**, IntechOpen, 2025.

FERNANDES, I. R. et al. Fibroblast sources: Where can we get them? **Cytotechnology**, v. 68, n. 2, p. 223–228, 25 jul. 2014.

FRESHNEY, R. I. **Culture of Animal Cells**. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2010.

GASPARINNI, R.L.; DUARTE, J.M.B.; NUNES, A.L.V. Manejo em cativeiro. In: DUARTE, J.M.B. (ed.). *Biologia e conservação de cervídeos sul-americanos: Blastocerus, Ozotoceros e Mazama*. Jaboticabal: Funep, 1997. p. 126–140.

GAO, X.; KIM, K.-S.; LIU, D. Nonviral gene delivery: What we know and what is next. **The AAPS Journal**, v. 9, n. 1, p. E92–E104, mar. 2007.

GUO, D. et al. Establishment methods and research progress of livestock and poultry immortalized cell lines: A review. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 9, 2 set. 2022.

GONZÁLEZ, S.; DUARTE, J.M.B. Speciation, evolutionary history and conservation trends of neotropical deer. **Mastozoología Neotropical**, v. 27, n. 27, p. 37–47, 2020.

HAHN, W. C.; MEYERSON, M. Telomerase activation, cellular immortalization and cancer. **Annals of medicine**, v. 33, n. 2, p. 123–9, 2001.

HARLEY, C.; FUTCHER, A.; GREIDER, C. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. **Nature**, v. 345, p. 458–460, 1990.

HAYFLICK, L.; MOORHEAD, P. S. The serial cultivation of human diploid cell strains. **Experimental Cell Research**, v. 25, n. 3, p. 585–621, dez. 1961.

HAYFLICK, L. The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. **Experimental Cell Research**, v. 37, n. 3, p. 614–636, abr. 1965.

IUCN 2025. **The IUCN Red List of Threatened Species**. Disponível em: <<https://www.iucnredlist.org/assessment/updates>>.

JAMIESON, I.G. Significance of population genetics for managing small natural and reintroduced populations in New Zealand. **New Zealand Journal of Ecology**, v. 39, n. 1, p. 1–18, 2015.

JANZ, F. DE L. et al. Evaluation of Distinct Freezing Methods and Cryoprotectants for Human Amniotic Fluid Stem Cells Cryopreservation. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2012, p. 1–10, 2012.

KALIDASAN, V. et al. A guide in lentiviral vector production for hard-to-transfect cells, using cardiac-derived c-kit expressing cells as a model system. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 19265, 28 set. 2021.

KANE, N. M. et al. Viral and non-viral gene delivery and its role in pluripotent stem cell engineering. **Drug Discovery Today Technologies**, v. 5, n. 4, p. e107–e115, 27 nov. 2008.

KIM, N. et al. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. **Science**, v. 266, n. 5193, p. 2011–2015, 23 dez. 1994.

KIYONO, T. et al. Both Rb/p16INK4a inactivation and telomerase activity are required to immortalize human epithelial cells. **nature**, v. 396, n. 6706, p. 84–88, 5 nov. 1998.

LEÓN-QUINTO, T. et al. Different cryopreservation requirements in foetal versus adult skin cells from an endangered mammal, the Iberian lynx (*Lynx pardinus*). **Cryobiology**, v. 68, n. 2, p. 227–233, abr. 2014.

LIN, H. et al. Establishment and Characterization of hTERT Immortalized Hutchinson–Gilford Progeria Fibroblast Cell Lines. **Cells**, v. 11, n. 18, p. 2784, 1 jan. 2022.

LIU, BIN. et al. Study on immortalization of Mongolian sheep fibroblast cells. **Animal Biotechnology**, v. 36, n. 1, 7 fev. 2025.

LLOYD, A. C. Limits to lifespan. **Nature Cell Biology**, v. 4, n. 2, p. E25–E27, fev. 2002.

MACDONALD, C. Development of New Cell Lines for Animal Cell Biotechnology. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 10, n. 2, p. 155–178, jan. 2008.

MACHADO, L.C.; et al., Maintenance of Brazilian biodiversity by germplasm bank. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 36, n. 1, p. 62–66, 2016.

MACNEIL, D.; BENSOUSSAN, H.; AUTEXIER, C. Telomerase Regulation from Beginning to the End. **Genes**, v. 7, n. 9, p. 64, 14 set. 2016.

MÁRQUEZ, A. et al. Phylogeography and Pleistocene demographic history of the endangered marsh deer (*Blastocerus dichotomus*) from the Río de la Plata Basin. **Conservation Genetics**, v. 7, n. 4, p. 563–575, 1 mar. 2006.

MATSUMURA, T. et al. ESTABLISHMENT OF AN IMMORTALIZED HUMAN-LIVER ENDOTHELIAL CELL LINE WITH SV40T AND hTERT. **Transplantation**, v. 77, n. 9, p. 1357–1365, 1 maio 2004.

NEITZEL, H. Chromosomen evolution of Cervidae: karyotypic and molecular aspects. In: OBE, G.; BASLER, A. (Eds.). *Cytogenetics: basic and applied aspects*. Berlin: Springer Verlag, 1987. p. 90–112.

OBINATA, M. The immortalized cell lines with differentiation potentials: Their establishment and possible application. **Cancer Science**, v. 98, n. 3, p. 275–283, mar. 2007.

PRAXEDES, É.A.; et al.,. Use of somatic cell banks in the conservation of wild felids. **Zoo Biology**, v. 37, p. 258–263, 2018.

PEREIRA, A.F.; et al.,. Uso da clonagem por transferência nuclear na conservação e multiplicação de mamíferos silvestres. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 43, n. 2, p. 242–247, abr.–jun. 2019.

PEREIRA, A. F. et al. Strategies for the Establishment of Fibroblastic Lines for the Conservation of Wild Mammals. **Veterinary medicine and science**, v. 39, n. 1, 21 dez. 2023.

PETKOV, S. et al. Immortalization of common marmoset monkey fibroblasts by piggyBac transposition of hTERT. **PLoS ONE**, v. 13, n. 9, p. e0204580–e0204580, 27 set. 2018.

REGULSKI, M. J. Cellular Senescence: What, Why, and How. **Wounds: A Compendium of Clinical Research and Practice**, v. 29, n. 6, p. 168–174, 1 jun. 2017.

ROBERTSON, D. M. et al. Characterization of Growth and Differentiation in a Telomerase-Immortalized Human Corneal Epithelial Cell Line. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 46, n. 2, p. 470–478, 1 fev. 2005.

ROGER, L.; TOMAS, F.; GIRE, V. Mechanisms and Regulation of Cellular Senescence. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 23, p. 13173, 6 dez. 2021.

ROLA, L. D. et al. Insights for Deriving Induced Pluripotent Stem Cells in Marsh Deer (*Blastocerus dichotomus*). **Journal of Zoological and Botanical Gardens**, v. 6, n. 3, p. 43–43, 19 ago. 2025.

RYDER, O. A.; ONUMA, M. Viable Cell Culture Banking for Biodiversity Characterization and Conservation. **Annual Review of Animal Biosciences**, v. 6, n. 1, p. 83–98, 15 fev. 2018.

RYU, A. H. et al. Use antibiotics in cell culture with caution: genome-wide identification of antibiotic-induced changes in gene expression and regulation. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, 8 ago. 2017.

SAMAVARCHI-TEHRANI, P. et al. 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, jul. 2010.

SERRANO, M.; BLASCOM, A. Putting the stress on senescence. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 13, n. 6, p. 748–753, dez. 2001.

SHAY, J. W. Role of Telomeres and Telomerase in Aging and Cancer. **Cancer Discovery**, v. 6, n. 6, p. 584–593, 30 mar. 2016.

SHAY, J. W; WRIGHT, WOODRING E; WERBIN, HAROLD. **Defining the molecular mechanisms of human cell immortalization**. Disponível em: <Defining the molecular mechanisms of human cell immortalization>.

SHITOVA, M.; ALPEEVA, E.; VOROTELYAK, E. Review of hTERT-Immortalized Cells: How to Assess Immortality and Confirm Identity. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 25, n. 23, p. 13054–13054, 4 dez. 2024.

SOICE, E.; JOHNSTON, J. Immortalizing Cells for Human Consumption. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 21, p. 11660, 1 jan. 2021.

SHIVAJI, S.; et al., Conservation of wild animals by assisted reproduction and molecular marker technology. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 41, p. 710–723, jul. 2003.

SILVA, A.R.; PEREIRA, A.F.; COMIZZOLI, P. Biobanking and use of gonadal tissues – a promising strategy for conserving wildlife from the Caatinga biome. **Animal Reproduction**, v. 19, n. 4, 2022.

STRONEN, A.V.; et al., The use of museum skins for genomic analyses of temporal genetic diversity in wild species. **Conservation Genetics Resources**, v. 11, n. 4, p. 499–503, 2018.

SCHWARTZ, M.K.; LUIKART, G.; WAPLES, R.S. Genetic monitoring as a promising tool for conservation and management. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 22, n. 1, p. 25–33, 2007.

STACE, C. A. Cytology and cytogenetics as a fundamental taxonomic resource for the 20th and 21st centuries. **TAXON**, v. 49, n. 3, p. 451–477, 1 ago. 2000.

STRONEN, A. V. et al. The use of museum skins for genomic analyses of temporal genetic diversity in wild species. **Conservation Genetics Resources**, v. 11, n. 4, p. 499–503, 21 mar. 2018.

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, ago. 2006.

TIEPOLO, L.M.; TOMAS, W.M. Ordem Artiodactyla. In: REIS, N.R.; PERACCHI, A.L.; PEDRO, W.A.; LIMA, I.P. (Eds.). *Mamíferos do Brasil*. Londrina: Universidade Estadual de Londrina, 2006. p. 283–303.

UTIKAL, J. et al. Immortalization eliminates a roadblock during cellular reprogramming into iPS cells. **Nature**, v. 460, n. 7259, p. 1145–1148, ago. 2009.

VERMA, A. S.; SINGH, A. **Animal biotechnology : models in discovery and translation**. Amsterdam: Academic Press, 2020.

VERMA, R. S.; BABU, A. **Human chromosomes : principles and techniques**. New York: Mcgraw-Hill, 1995.

VILLEGAS, J.; MCPHAUL, M. Establishment and Culture of Human Skin Fibroblasts. **Current Protocols in Molecular Biology**, v. 71, n. 1, p. Unit 28.3-Unit 28.3, 1 jul. 2005.

WANG, Y. et al. A prospect of cell immortalization combined with matrix microenvironmental optimization strategy for tissue engineering and regeneration. **Cell & Bioscience**, v. 9, n. 1, 5 jan. 2019.

XIE, F. et al. Reversible Immortalization Enables Seamless Transdifferentiation of Primary Fibroblasts into Other Lineage Cells. **Stem Cells and Development**, v. 25, n. 16, p. 1243–1248, 15 ago. 2016.

YAN, M. et al. Construction and Characterization of Immortalized Fibroblast Cell Line from Bactrian Camel. **Life**, v. 13, n. 6, p. 1337, 7 jun. 2023a.

YAN, M. et al. Construction and Characterization of Immortalized Fibroblast Cell Line from Bactrian Camel. **Life**, v. 13, n. 6, p. 1337, 7 jun. 2023b.

YAO, T.; ASAYAMA, Y. Animal-cell culture media: History, characteristics, and current issues. **Reproductive Medicine and Biology**, v. 16, n. 2, p. 99–117, 21 mar. 2017.

ZHANG, P. et al. Construction and Characterization of Immortalized Skin Fibroblasts from Milu Deer. **Animals**, v. 15, n. 19, p. 2889–2889, 2 out. 2025.

ZHAO, C. Cell culture: *in vitro* model system and a promising path to *in vivo* applications. **Journal of Histotechnology**, v. 46, n. 1, p. 1–4, 24 jan. 2023.

WANG, Y.; CHEN, S.; YAN, Z.; PEI, M. A prospect of cell immortalization combined with matrix microenvironmental optimization strategy for tissue engineering and regeneration. **Cell & Bioscience**, v. 9, art. 7, 5 jan. 2019.