



Células-tronco pluripotentes induzidas (células iPS) em animais domésticos e a possibilidade de geração *in vitro* de gametas

Induced pluripotent stem cells (iPS cells) in domestic animals and the possibility to generate gametes in vitro

Lucas Simões Machado¹, Aline Fernanda de Souza², Naira Caroline Godoy Pieri³, Ramon Cesar Botigelli², Kaiana Recchia¹, Daniele dos Santos Martins^{1,2}, Flavio Vieira Meirelles^{1,2}, André Furugen Cesar de Andrade³, Fabiana Fernandes Bressan^{1,2,‡}

¹Departamento de Cirurgia, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.

²Departamento de Medicina Veterinária, Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.

³Departamento de Reprodução Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.

Resumo

Células-tronco são conhecidas pela característica de alto potencial de auto-renovação e podem ser classificadas segundo seu estágio de indiferenciação e perfil epigenético. Células-tronco embrionárias (CTEs) e células-tronco adultas são bastante estudadas e caracterizadas, principalmente nos modelos humano e em camundongos por apresentarem novas possibilidades tanto para a medicina regenerativa quanto para o entendimento do desenvolvimento inicial dos mamíferos. Contudo, a derivação e a manutenção de CTEs em espécies domésticas é desafiadora e apresenta resultados inconsistentes em relação à manutenção da pluripotência *in vitro*. Nesse contexto, a geração das células pluripotentes induzidas *in vitro* (células iPS ou iPSCs) é imprescindível para a geração de novas possibilidades na medicina veterinária regenerativa e reprodutiva devido à capacidade de diferenciação destas em uma variedade de outros tipos celulares, inclusive em animais. Assim, esta revisão apresenta a geração das células iPS em animais domésticos, e em especial, recentes estudos sobre as etapas necessárias para a possibilidade de geração de gametas funcionais *in vitro*, uma importante contribuição na correção de infertilidades, conservação de espécies ameaçadas de extinção e geração de indivíduos geneticamente superiores ou modificados para aplicações agropecuárias ou biomédicas.

Palavras-chave: células iPS, medicina regenerativa, gametas *in vitro*.

Abstract

Stem cells are widely known for their high potential for self-renewal, being classified according to their stage of undifferentiation and epigenetic profile. Embryonic stem cells (ES) and adult stem cells are already well studied and characterized, mainly in human and mouse models, once they present new possibilities both for regenerative medicine and for understanding the initial development of mammals. However, the derivation and maintenance of ES in domestic species is challenging and presents inconsistent results regarding maintenance of in vitro pluripotency. In this context, the derivation of in vitro induced pluripotent cells (iPS cells or iPSCs) enables new possibilities in regenerative and reproductive veterinary medicine due to their ability to differentiate into a variety of other cell types. Therefore, this review presents the generation of iPS cells in domestic animals, and focuses on recent studies on the steps necessary for the generation of functional gametes in vitro, an important contribution of stem cells aiming the correction of infertility, the conservation of species in risk of extinction and for the generation of genetically superior or modified organisms for agricultural and biomedical applications.

Keywords: iPS cells, regenerative medicine, in vitro gametes.

Células-tronco e pluripotência nos animais domésticos

As células-tronco apresentam propriedades únicas de auto-renovação a longo prazo e capacidade de se diferenciar em tipos celulares mais especializados. Elas são geralmente classificadas em três tipos: as células-tronco embrionárias (CTEs) que são pluripotentes, derivadas do isolamento da massa celular interna de blastocistos; as células-tronco adultas que são multipotentes, como as células-tronco mesenquimais (MSCs, do inglês *mesenchymal stem cells*); e as células-tronco pluripotentes induzidas (iPSCs, do inglês *induced pluripotent stem cells*).

Células-tronco adultas são bem estabelecidas na terapia celular de diversas enfermidades, tanto na medicina humana, quanto na veterinária, sendo exemplos comuns as terapias para injúrias músculo-esqueléticas ou doenças crônicas em equinos (Broeckx et al., 2019), gatos (Vidane et al., 2017) e modelos em roedores (Lessa

[‡]Correspondência: fabianabressan@usp.br

Recebido: 19 de setembro de 2018

Aceito: 18 de fevereiro de 2019



et al., 2012). Os mecanismos de ação destas células vêm sendo melhor elucidados e descritos, revelando que o potencial terapêutico das MSCs consiste na sua habilidade em modular seu microambiente, ou nicho, e não na capacidade de diferenciação em novas células (Caplan, 2015; Meirelles et al., 2009). Tal habilidade de modulação inclui a secreção de fatores de crescimento, citocinas e quimiocinas que modulam vias anti-apoptóticas, imunomodulatórias, angiogênicas, anti-cicatriciais, e quimioatrativas, fornecendo um ambiente regenerativo *in vivo* (Meirelles et al., 2009). Os mecanismos envolvidos nas propriedades regenerativas das células multipotentes, uma vez já bem relacionados aos fatores tróficos, induzem à proposta de redefinição da sigla “MSCs” para o termo em inglês “*medicinal signalling cells*” (células de sinalização medicinal), sendo este mais adequado à sua funcionalidade (Caplan, 2015).

Já as células pluripotentes apresentam o potencial para diferenciação em células derivadas de todas as três linhagens germinativas e são, portanto, passíveis de alcançar objetivos adicionais na medicina regenerativa, como a geração de células funcionais para o transplante e reparo tecidual (Kawamura et al., 2012; Mandai et al., 2017). Além de apresentar um grande potencial para inúmeras aplicações na medicina regenerativa, o estudo de células pluripotentes em animais domésticos pode melhorar nossa compreensão do desenvolvimento inicial de mamíferos (Pieri et al., 2019; Roberts et al., 2017).

As CTEs foram primeiramente geradas a partir do isolamento e cultivo da massa celular interna (MCI) de blastocistos murinos, formando *in vitro* colônias em forma de cúpula quando cultivadas em meio de cultivo contendo fator inibidor de leucemia (LIF - *leukaemia inhibitory factor*) (Evans and Kaufman, 1981). Essas células foram capazes de colonizar a MCI de outros embriões murinos após a injeção de blastocele e formar embriões quiméricos, frequentemente contribuindo para suas células germinativas (Nichols e Smith, 2009). Quando injetados *in vivo*, formam teratomas, que são tumores benignos apresentando derivados de todas as três linhagens germinativas (Nelakanti et al., 2015).

O isolamento, cultivo e caracterização de CTEs humanas foram relatados há 20 anos, e em contraste com as CTEs murinas, as humanas se assemelham a células epiblasticas murinas e são dependentes do fator de crescimento de fibroblastos (bFGF) e não do LIF (Thomson et al., 1998; Nichols e Smith, 2009). Devido às diferenças relatadas entre CTEs de camundongo e humanos, elas foram classificadas em duas categorias, a saber, 'naïve' ou 'primed', respectivamente, sendo relacionadas ao estado de pluripotência (Nichols e Smith, 2009; Weinberger et al., 2016; Ying et al., 2008).

A derivação de CTEs de animais domésticos é altamente desejável, uma vez que contribuiria para o desenvolvimento de protocolos terapêuticos. Durante décadas, vários grupos de pesquisa mostraram dificuldades nas tentativas de manter CTEs de espécies domésticas em cultivo, apresentando ausência de consistência e reprodutibilidade na manutenção do estado pluripotente *in vitro* destas células, seja na expressão de marcadores de pluripotência ou na possibilidade de geração de quimeras. A falta de CTEs bem caracterizadas nessas espécies resulta da incapacidade de compreensão dos mecanismos e as vias de manutenção da pluripotência, na falta de identificação de características *naïve* ou *primed* destas, ou mesmo de identificar outros possíveis estados relacionados à pluripotência. As linhagens celulares estabelecidas até agora são, portanto, referidas como células semelhantes a CTEs, e nenhum progresso terapêutico adicional foi alcançado até recentemente (Blomberg e Telugu, 2012; Brevini et al., 2008; Nowak-Imialek et al., 2011; Telugu et al., 2010).

Em 2018, Bogliotti e colaboradores mostraram que células embrionárias bovinas poderiam ser cultivadas a longo prazo mantendo as características de pluripotência *in vitro*, e ainda produziam blastocistos quando utilizadas como doadoras de núcleo na clonagem por transferência nuclear. Tal achado é devido, principalmente, pelo estabelecimento de condições de cultivo propícias à manutenção da pluripotência, com a suplementação com fator básico de fibroblastos (FGF2) e inibidor da via canônica de sinalização Wnt-B-catenina (Bogliotti et al., 2018). De maneira mais importante, o estudo mostrou que apesar de décadas de estudos, muito há ainda a ser desvendado sobre a aquisição e pluripotência das células embrionárias nas diversas espécies domésticas, e os resultados apresentados pelo grupo podem servir como base para o avanço de importantes áreas da medicina veterinária, como o desenvolvimento embrionário, a medicina regenerativa e a produção animal.

Indução *in vitro* à pluripotência

Em 2006, Takahashi e Yamanaka, e posteriormente diversos outros grupos, reportaram um avanço significativo na compreensão da aquisição do estado pluripotente *in vitro* quando relataram a reprogramação de fibroblastos de camundongos (e depois de humanos) em células pluripotentes semelhantes às CTEs via expressão exógena de uma combinação de fatores de transcrição específicos - originalmente os genes OCT4, SOX2, KLF4 e c-MYC (OSKM). As células resultantes foram denominadas células-tronco de pluripotência induzida (iPSCs, do inglês *induced pluripotent stem cells*) e foram caracterizadas como pluripotentes de acordo com as características similares às CTEs: formação de corpos embrioides, diferenciação *in vitro*, formação de teratomas *in vivo* e capacidade de gerar embriões quimeras (Picanço-Castro et al., 2011; Takahashi et al., 2007; Takahashi and Yamanaka, 2006; Wernig et al., 2007).

Neste contexto, a geração de células pluripotentes induzidas *in vitro* em animais domésticos apresenta a possibilidade de revolucionar as áreas de medicina regenerativa e mesmo reprodutiva na veterinária, uma vez que a pluripotência já foi induzida em células de ovinos (Bao et al., 2011; Li et al., 2011), caprinos (Song et al., 2013), equinos (Nagy et al., 2011; Whitworth et al., 2014), bovinos (Cao et al., 2012; Sumer et al., 2011), cães (Gonçalves et al., 2017; Koh and Piedrahita, 2015; Nishimura et al., 2017) e felídeos silvestres (Verma et al., 2013, 2012). Nesse cenário, a produção eficiente de células-tronco de espécies ameaçadas cria uma oportunidade única para a conservação de espécies por meio da produção de gametas, clonagem por transferência nuclear, complementação de embriões ou até mesmo o surgimento de novas tecnologias (Verma et al., 2013; Verma and Verma, 2014).

Embora a geração de iPSCs geradas em animais domésticos seja mais relatada do que a geração e manutenção das CTEs, os relatos e protocolos ainda não são consistentes ou facilmente reproduzíveis. Em bovinos, Sumer e colaboradores, em 2011, utilizaram os vetores retrovirais murinos pMX-OCT4, pMX-SOX2, pMX-c-MYC, pMX-KLF4 e pMX-NANOG para a indução à pluripotência de fibroblastos bovinos adultos. Neste estudo, foi verificado que a presença de NANOG é fundamental para a reprogramação das células bovinas (Sumer et al., 2011). Já Huang et al. (2011) demonstraram a produção das células com a utilização de um vetor policistrônico não integrativo contendo os cDNAs bovinos para OCT4, SOX2, KLF4 e c-MYC, sendo cada um controlado por um promotor independente. Assim, foram utilizados LIF e inibidores de MEK1/2 e GSK3 ('2i'). Neste estudo, porém, as células em cultivo adquiriram uma característica quiescente, ou seja, as células bovinas semelhantes às iPSC não foram capazes de expansão *in vitro*. Outro exemplo é a derivação de iPSCs caninas, onde já foram reportados estudos com suplementação de bFGF, LIF, ou ambos, e produzidas com 4 fatores (OSKM) ou 6 (OSKM mais NANOG e Lin28 - OSKMNL) (Baird et al., 2015; Goncalves et al., 2017; Koh e Piedrahita, 2015; Luo et al., 2011; Shimada et al., 2009; Whitworth et al., 2014).

Em síntese, enquanto a geração de iPSCs de animais domésticos tem sido relatada e é extremamente promissora para medicina veterinária e translacional, as condições exatas necessárias para reprogramar células somáticas de cada espécie e manter um estado pluripotente estão longe de serem totalmente compreendidas.

Possibilidade de geração de células precursoras germinativas e gametas *in vitro*

Células germinativas são extremamente especializadas e essenciais para a continuação e evolução das espécies, e a geração destas células *in vitro* pode representar uma nova era na reprodução animal como, por exemplo, por permitir a seleção de animais fundadores e a geração de prole em curto intervalo de tempo. Diversos estudos foram realizados em humanos e animais com o objetivo de induzir a diferenciação de CTEs ou células multipotentes em células germinativas (Clark et al., 2004; Hübner et al., 2003; Nayernia et al., 2006; Neupane et al., 2008). Células derivadas da pele, provavelmente multipotentes, foram induzidas a células similares a primordiais germinativas (PGCLs, do inglês *primordial germ cells-like*) em suínos, apresentando a expressão de marcadores de células germinativas (Vasa, Dazl, Stella) e meiose (proteínas do complexo sinaptonêmico), morfologicamente semelhantes a oócitos (Dyce et al., 2011; Dyce and Li, 2006; Linher et al., 2009); porém, sem relatos de geração de prole nascida.

A geração de células germinativas a partir de células somáticas é um processo complexo, no qual as semelhanças entre a indução *in vitro* e o processo *in vivo* estão começando a ser esclarecidas, principalmente no modelo murino (Hayashi et al., 2012, 2011; Pelosi et al., 2011). A correta reprogramação epigenética, e em especial dos genes *imprinted*, parece ser uma barreira a ser superada. Nestes estudos no modelo murino, foi reportado que a geração de células germinativas *in vitro* de fato competentes para a geração de novos indivíduos saudáveis a termo precisa ser acompanhada pelo apagamento do *imprinting*, por exemplo, no locus H19/IGF2 durante a migração das células primordiais germinativas (PGCs), sendo seguido pela correta re-aquisição durante a gametogênese (Hayashi et al., 2011; Nayernia et al., 2006; Oliveros-Etter et al., 2015).

Os protocolos para geração de PGCs usando CTEs ou iPSCs mostraram ser possível a geração de gametas iniciais, ou seja, oócitos e espermatogônias expressando VASA e DAZL após indução *in vitro* com ácido retinoico, BMP4 ou ainda suplementação com fluido folicular, citocinas ou extratos de células germinativas (Castrillon et al., 2000; Kee et al., 2009; Panula et al., 2010; Park et al., 2009). Um grande avanço foi relatado em 2011 por Hayashi e colaboradores, que descreveram a geração de PGCLs funcionais a partir de CTEs e iPSCs após a pré-indução em células similares ao do epiblasto (EpiLCs, do inglês *epiblast-like cells*) em camundongos. Estas células foram capazes de passar pela meiose, e após transplantadas *in vivo*, completaram a espermatogênese ou a oogênese e deram origem a proles normais (Hayashi et al., 2012, 2011).

Mais recentemente, em 2016, o mesmo grupo mostrou, em camundongos, que a reconstituição inteira do ciclo germinativo feminino é possível *in vitro* por meio da diferenciação de PGCLs, produzidas a partir de CTEs e iPSCs, em oócitos primários, sendo requisito para tal o co-cultivo com células somáticas gonadais (Hikabe et al., 2016). Grandes avanços também já foram descritos na geração *in vitro* de PGCLs em humanos, sendo estas derivadas de CTEs e induzidas à PGCLs (Irie et al., 2015) ou então hiPSCs pré-induzidas a células similares às mesodermais (mesoderm-like cells, iMeLCs), e então também em PGCLs (Sasaki et al., 2015).



Em animais domésticos, a geração de PGCLs a partir de iPSCs foi descrita em suínos (Wang et al., 2016), e está sendo estudada em bovinos e em suínos pelo nosso grupo, que conseguiu produzir iPSCs bovinas com OSKM murinos e suplementação com bFGF, e iPSCs suínas com ambos OSKM murinos ou humanos e suplementação com LIF ou bFGF, sendo estas ainda em processo de caracterização (dados não publicados). Os relatos de geração de células germinativas *in vitro* em animais domésticos ainda são restritos devido à baixa eficiência da reprogramação induzida em pluripotência, bem como à falta de conhecimento sobre o real status pluripotente das células iPSCs. Portanto, estudos devem ser continuados para esclarecer os mecanismos moleculares envolvidos na reprogramação nuclear.

Considerações finais

Esta revisão apresenta conceitos e avanços na pesquisa de células pluripotentes em animais domésticos, enfatizando o potencial uso destas na medicina reprodutiva e regenerativa. Estudos com células-tronco pluripotentes em animais ainda carecem de consistência e reprodutibilidade, mas é inquestionável sua importância para possibilitar uma nova era nos campos da medicina reprodutiva e regenerativa veterinária, incluindo a conservação de raças e espécies raras e até a produção de gametas viáveis a partir de PGCLs.

Agradecimentos

Os autores agradecem à CAPES (AUXPE 23038.006964/2014-43) e à FAPESP (processos 2013/08135-2 e 2015/26818-5).

Referências

- Baird A, Barsby T, Guest D.** Derivation of Canine Induced Pluripotent Stem Cells. *Reprod Domest Anim*, v.50, p.669-676, 2015.
- Bao L, He L, Chen J, Wu Z, Liao J, Rao L, Ren J, Li H, Zhu H, Qian L, Gu Y, Dai H, Xu X, Zhou J, Wang W, Cui C, Xiao L.** Reprogramming of ovine adult fibroblasts to pluripotency via drug-inducible expression of defined factors. *Cell Res*, v.21, p.600-608, 2011.
- Blomberg LA, Telugu B.** Twenty Years of Embryonic Stem Cell Research in Farm Animals. *Reprod Domest Anim*, v.47, p.80-85, 2012.
- Bogliotti YS, Wu J, Vilarino M, Okamura D, Soto DA, Zhong C, Sakurai M, Sampaio RV, Suzuki K, Izpisua Belmonte JC, Ross PJ.** Efficient derivation of stable primed pluripotent embryonic stem cells from bovine blastocysts. *Proc Natl Acad Sci*, v.115, p.2090-2095, 2018.
- Brevini T, Antonini S, Pennarossa G, Gandolfi F.** Recent Progress in Embryonic Stem Cell Research and Its Application in Domestic Species. *Reprod Domest Anim*, v.43, p.193-199, 2008.
- Broeckx SY, Seys B, Suls M, Vandenberghe A, Mariën T, Adriaensen E, Declercq J, Van Hecke L, Braun G, Hellmann K, Spaas JH.** Equine allogeneic chondrogenic induced mesenchymal stem cells are an effective treatment for degenerative joint disease in horses. *Stem Cells Dev*, scd.2018.0061, 2019. doi: 10.1089/scd.2018.0061.
- Cao H, Yang P, Pu Y, Sun X, Yin H, Zhang Y, Zhang Y, Li Y, Liu Y, Fang F, Zhang Z, Tao Y, Zhang X.** Characterization of bovine induced pluripotent stem cells by lentiviral transduction of reprogramming factor fusion proteins. *Int J Biol Sci*, v.8, p.498-511, 2012.
- Caplan AI.** Adult mesenchymal stem cells and women's health. *Menopause*, v.22, p.131-135, 2015.
- Castrillon DH, Quade BJ, Wang TY, Quigley C, Crum CP.** The human VASA gene is specifically expressed in the germ cell lineage. *Proc Natl Acad Sci*, v.97, p.9585-9590, 2000.
- Clark AT, Bodnar MS, Fox M, Rodriguez RT, Abeyta MJ, Firpo MT, Pera RAR.** Spontaneous differentiation of germ cells from human embryonic stem cells in vitro. *Hum Mol Genet*, v.13, p.727-739, 2004.
- Dyce PW, Li J.** From skin cells to ovarian follicles? *Cell Cycle*, v.5, p.1371-1375, 2006.
- Dyce PW, Liu J, Tayade C, Kidder GM, Betts DH, Li J.** In vitro and in vivo germ line potential of stem cells derived from newborn mouse skin. *PLoS One*, v.6, p.e20339, 2011.
- Evans MJ, Kaufman MH.** Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*, v.292, p.154-156, 1981.
- Goncalves NJN, Bressan FF, Roballo KCS, Meirelles F V Xavier PLP, Fukumasu H, Williams C, Breen M, Koh S, Sper R, Piedrahita J, Ambrosio CE.** Generation of LIF-independent induced pluripotent stem cells from canine fetal fibroblasts. *Theriogenology*, v.92, p.75-82, 2017.
- Hayashi K, Ogushi S, Kurimoto K, Shimamoto S, Ohta H, Saitou M.** Offspring from oocytes derived from in vitro primordial germ cell-like cells in mice. *Science*, v.338, p.971-5, 2012.
- Hayashi K, Ohta H, Kurimoto K, Aramaki S, Saitou M.** Reconstitution of the mouse germ cell specification pathway in culture by pluripotent stem cells. *Cell*, v.146, p.519-32, 2011.



- Hikabe O, Hamazaki N, Nagamatsu G, Obata Y, Hirao Y, Hamada N, Shimamoto S, Imamura T, Nakashima K, Saitou M, Hayashi K.** Reconstitution *in vitro* of the entire cycle of the mouse female germ line. *Nature*, v.539, p.299-303, 2016.
- Huang B¹, Li T, Alonso-Gonzalez L, Gorre R, Keatley S, Green A, Turner P, Kallingappa PK, Verma V, Oback B.** A virus-free poly-promoter vector induces pluripotency in quiescent bovine cells under chemically defined conditions of dual kinase inhibition. *PLoS One*, v.6, p.e24501, 2011.
- Hübner K, Fuhrmann G, Christenson LK, Kehler J, Reinbold R, De La Fuente R, Wood J, Strauss JF, Boiani M, Schöler HR.** Derivation of oocytes from mouse embryonic stem cells. *Science*, v.300, p.1251-1256, 2003.
- Irie N, Weinberger L, Tang WWC, Kobayashi T, Viukov S, Manor YS, Dietmann S, Hanna JH, Surani MA.** SOX17 is a critical specifier of human primordial germ cell fate. *Cell*, v.160, p.253-68, 2015.
- Kawamura M, Miyagawa S, Miki K, Saito A, Fukushima S, Higuchi T, Kawamura T, Kuratani T, Daimon T, Shimizu T, Okano T, Sawa Y.** Feasibility, Safety, and Therapeutic Efficacy of Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocyte Sheets in a Porcine Ischemic Cardiomyopathy Model. *Circulation*, v.126, p.S29-S37, 2012.
- Kee K, Angeles VT, Flores M, Nguyen HN, Reijo Pera RA.** Human DAZL, DAZ and BOULE genes modulate primordial germ-cell and haploid gamete formation. *Nature*, v.462, p.222-225, 2009.
- Koh S, Piedrahita JA.** Generation of Induced Pluripotent Stem Cells (iPSCs) from Adult Canine Fibroblasts. *Methods Mol Biol*, v.1330, p.69-78, 2015.
- Lessa TB, Carvalho RC, Rezende Francioli AL, de Oliveira LJ, da Nunes Barreto RS, Feder D, Bressan FF, Miglino MA, Ambrosio CE.** Muscle reorganisation through local injection of stem cells in the diaphragm of mdx mice. *Acta Vet Scand*, v.54, p.73, 2012.
- Li Y, Cang M, Lee AS, Zhang K, Liu D.** Reprogramming of sheep fibroblasts into pluripotency under a drug-inducible expression of mouse-derived defined factors. *PLoS One*, v.6, p.e15947, 2011.
- Linher K, Dyce P, Li J.** Primordial germ cell-like cells differentiated *in vitro* from skin-derived stem cells. *PLoS One*, v.4, p.e8263, 2009.
- Luo J, Suhr ST, Chang EA, Wang K, Ross PJ, Nelson LL, Venta PJ, Knott JG, Cibelli JB.** Generation of leukemia inhibitory factor and basic fibroblast growth factor-dependent induced pluripotent stem cells from canine adult somatic cells. *Stem Cells Dev*, v.20, p.1669-78, 2011.
- Mandai M, Watanabe A, Kurimoto Y, Hirami Y, Morinaga C, Daimon T, Fujihara M, Akimaru H, Sakai N, Shibata Y, Terada M, Nomiya Y, Tanishima S, Nakamura M, Kamao H, Sugita S, Onishi A, Ito T, Fujita K, Kawamata S, Go MJ, Shinohara C, Hata K, Sawada M, Yamamoto M, Ohta S, Ohara Y, Yoshida K, Kuwahara J, Kitano Y, Amano N, Umekage M, Kitaoka F, Tanaka A, Okada C, Takasu N, Ogawa S, Yamanaka S, Takahashi M.** Autologous Induced Stem-Cell-Derived Retinal Cells for Macular Degeneration. *N Engl J Med*, v.376, p.1038-1046, 2017.
- Meirelles L da S, Fontes AM, Covas DT, Caplan AI.** Mechanisms involved in the therapeutic properties of mesenchymal stem cells. *Cytokine Growth Factor Rev*, v.20, p.419-27, 2009.
- Nagy K, Sung H-K, Zhang P, Laflamme S, Vincent P, Agha-Mohammadi S, Woltjen K, Monetti C, Michael IP, Smith LC, Nagy A.** Induced Pluripotent Stem Cell Lines Derived from Equine Fibroblasts. *Stem Cell Rev Reports*, v.7, p.693-702, 2011.
- Nayernia K, Nolte J, Michelmann HW, Lee JH, Rathsack K, Drusenheimer N, Dev A, Wulf G, Ehrmann IE, Elliott DJ, Okpanyi V, Zechner U, Haaf T, Meinhardt A, Engel W.** *In Vitro*-Differentiated Embryonic Stem Cells Give Rise to Male Gametes that Can Generate Offspring Mice. *Dev Cell*, v.11, p.125-132, 2006.
- Nelakanti RV¹, Kooreman NG, Wu JC.** Teratoma formation: a tool for monitoring pluripotency in stem cell research. *Curr Protoc Stem Cell Biol*, v.32, p.1-17, 2015.
- Neupane M, Chang C-C, Kiupel M, Yuzbasiyan-Gurkan V.** Isolation and Characterization of Canine Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Tissue Eng Part A*, v.14, p.1007-1015, 2008.
- Nichols J, Smith A.** Naive and Primed Pluripotent States. *Cell Stem Cell*, v.4, p.487-492, 2009.
- Nishimura T, Hatoya S, Kanegi R, Wijesekera DPH, Sanno K, Tanaka E, Sugiura K, Hiromitsu Tamada NK, Imai H, Inaba T.** Feeder-independent canine induced pluripotent stem cells maintained under serum-free conditions. *Mol Reprod Dev*, v.84, p.329-339, 2017.
- Nowak-Imialek M, Kues W, Carnwath, JW, Niemann H.** Pluripotent Stem Cells and Reprogrammed Cells in Farm Animals. *Microsc Microanal*, v.17, p.474-497, 2011.
- Oliveros-Etter M, Li Z, Nee K, Hosohama L, Hargan-Calvopina J, Lee SA, Joti P, Yu J, Clark AT.** PGC Reversion to Pluripotency Involves Erasure of DNA Methylation from Imprinting Control Centers followed by Locus-Specific Re-methylation. *Stem Cell Reports*, v.5, p.337-349, 2015.
- Panula S, Medrano JV, Kee K, Bergstrom R, Nguyen HN, Byers B, Wilson KD, Wu JC, Simon C, Hovatta O, Reijo Pera RA.** Human germ cell differentiation from fetal- and adult-derived induced pluripotent stem cells. *Hum Mol Genet*, v.20, p.752-762, 2010.
- Park TS, Galic Z, Conway AE, Lindgren A, van Handel BJ, Magnusson M, Richter L, Teitell MA,**



- Mikkola HKA, Lowry WE, Plath K, Clark AT.** Derivation of Primordial Germ Cells from Human Embryonic and Induced Pluripotent Stem Cells Is Significantly Improved by Coculture with Human Fetal Gonadal Cells. *Stem Cells*, v.27, p.783-795, 2009.
- Pelosi E, Forabosco A, Schlessinger D.** Germ cell formation from embryonic stem cells and the use of somatic cell nuclei in oocytes. *Ann N Y Acad Sci*, v.1221, p.18-26, 2011.
- Picanço-Castro V, Russo-Carbolante E, Reis LCJ, Fraga AM, de Magalhães DAR, Orellana MD, Panepucci RA, Pereira LV, Covas DT.** Pluripotent reprogramming of fibroblasts by lentiviral mediated insertion of SOX2, C-MYC, and TCL-1A. *Stem Cells Dev*, v.20, p.169-80, 2011.
- Pieri NCG, de Souza AF, Botigelli RC, Machado LS, Ambrosio CE, dos Santos Martins D, de Andrade AFC, Meirelles FV, Hyttel P, Bressan FF.** Stem cells on regenerative and reproductive science in domestic animals. *Vet Res Commun*, v.43, p.7-16, 2019.
- Roberts RM, Yuan Y, Ezashi T.** Exploring early differentiation and pluripotency in domestic animals. *Reprod Fertil Dev*, v.29, p.101, 2017.
- Sasaki K, Yokobayashi S, Nakamura T, Okamoto I, Yabuta Y, Kurimoto K, Ohta H, Moritoki Y, Iwatani C, Tsuchiya H, Nakamura S, Sekiguchi K, Sakuma T, Yamamoto T, Mori T, Woltjen K, Nakagawa M, Yamamoto T, Takahashi K, Yamanaka S, Saitou M.** Robust In Vitro Induction of Human Germ Cell Fate from Pluripotent Stem Cells. *Cell Stem Cell*, v.17, p.178-194, 2015.
- Shimada H, Nakada A, Hashimoto Y, Shigeno K, Shionoya Y, Nakamura T.** Generation of canine induced pluripotent stem cells by retroviral transduction and chemical inhibitors. *Mol Reprod Dev*, v.77, p.2-2, 2009.
- Song H, Li H, Huang M, Xu D, Gu C, Wan, Z, Dong F, Wang F.** Induced pluripotent stem cells from goat fibroblasts. *Mol Reprod Dev*, v.80, p.1009-17, 2013.
- Sumer H, Liu J, Malaver-Ortega LF, Lim ML, Khodadadi K, Verma PJ.** NANOG is a key factor for induction of pluripotency in bovine adult fibroblasts. *J Anim Sci*, v.89, p.2708-2716, 2011.
- Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S.** Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell*, v.131, p.861-872, 2007.
- Takahashi K, Yamanaka S.** Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, v.126, p.663-676, 2006.
- Telugu BPVL, Ezashi T, Roberts RM.** The Promise of Stem Cell Research in Pigs and Other Ungulate Species. *Stem Cell Rev Reports*, v.6, p.31-41, 2010.
- Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM.** Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*, v.282, p.1145-7, 1998.
- Verma R, Holland MK, Temple-Smith P, Verma PJ.** Inducing pluripotency in somatic cells from the snow leopard (*Panthera uncia*), an endangered felid. *Theriogenology*, v.77, p.220-228.e2, 2012.
- Verma R, Liu J, Holland MK, Temple-Smith P, Williamson M, Verma PJ.** Nanog is an essential factor for induction of pluripotency in somatic cells from endangered felids. *Biores Open Access*, v.2, p.72-76, 2013.
- Verma R, Verma PJ.** Using Stem Cells to Study and Preserve Biodiversity in Endangered Big Cats. *Humana Press Cham*, pp.109-117, 2014.
- Vidane A, Pinheiro A, Casals J, Passarelli D, Hage M, Bueno R, Martins D, Ambrósio C.** Transplantation of amniotic membrane-derived multipotent cells ameliorates and delays the progression of chronic kidney disease in cats. *Reprod Domest Anim*, v.52, p.316-326, 2017.
- Wang H, Xiang J, Zhang W, Li J, Wei Q, Zhong, L, Ouyang H, Han J.** Induction of Germ Cell-like Cells from Porcine Induced Pluripotent Stem Cells. *Sci Rep*, v.6, p.27256, 2016.
- Weinberger L, Ayyash M, Novershtern N, Hanna JH.** Dynamic stem cell states: naive to primed pluripotency in rodents and humans. *Nat Rev Mol Cell Biol*, v.17, p.155-169, 2016.
- Wernig M, Meissner A, Foreman R, Brambrink T, Ku M, Hochedlinger K, Bernstein BE, Jaenisch R.** In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state. *Nature*, v.448, p.318-324, 2007.
- Whitworth DJ, Ovchinnikov DA, Sun J, Fortuna PRJ, Wolvetang EJ.** Generation and characterization of leukemia inhibitory factor-dependent equine induced pluripotent stem cells from adult dermal fibroblasts. *Stem Cells Dev*, v.23, p.1515-23, 2014.
- Ying Q-L, Wray J, Nichols J, Battle-Morera L, Doble B, Woodgett J, Cohen P, Smith A.** The ground state of embryonic stem cell self-renewal. *Nature*, v.453, p.519-23, 2008.
-