Aline Fernanda de Souza

*Estudo biológico das células germinativas
embrionárias caninas*

São Paulo

2012

ALINE FERNANDA DE SOUZA

Estudo biológico das células germinativas caninas

São Paulo
2012

ALINE FERNANDA DE SOUZA

Estudo biológico das células germinativas caninas

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Departamento:

Cirurgia

Área de Concentração:

Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientadora:

Prof^ª. Dr^ª. Daniele dos Santos Martins

São Paulo
2012

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo)

T.2742
FMVZ

Souza, Aline Fernanda de
Estudo biológico das células germinativas caninas / Aline Fernanda de Souza. -- 2012.
87 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária
e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2013.

Programa de Pós-Graduação: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Orientador: Profa. Dra. Daniele dos Santos Martins.

1. Célula tronco germinativa. 2. Embriões caninos. 3. Embriologia. I. Título.

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

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – ÁREA: ANIMAL

Processo USP nº: 2012.1.891.74.0

Data de entrada: 31/08/2012

Pesquisadores: Profa. Dra. Daniele dos Santos Martins

Curriculo(s) do(s) pesquisador(es): Mencionar se todos os pesquisadores envolvidos possuem currículo LATTES.

PARECER

Título do Projeto: Estudo da Biologia das Células Germinativas Caninas.

Apreciação Geral: A proposta está adequadamente estruturada e é pertinente.

Introdução: As bases teóricas são adequadas. A proposta tem como objetivo isolar e caracterizar as células germinativas embrionárias caninas.

Metodologia: O projeto prevê a obtenção de embriões caninos em diferentes fases de desenvolvimento através de ovário-salpingo-histerectomia eletivas de cadelas gestantes. Após a obtenção dos embriões, estes serão utilizados para obter/derivar células germinativas, as quais serão posteriormente caracterizadas por técnicas laboratoriais, e por testes de formação de teratomas através de inoculação em camundongos imunodeficientes

Aspectos Éticos: A proposta segue as normas e recomendações da Resolução Nº 592, do CFMV de junho de 1992 e dos Princípios éticos na experimentação animal, do COBEA.

Outros Comentários: Caso seja notada alguma outra situação que não se enquadra nos itens anteriores.

Esclarecimentos Necessários: Descrever com clareza o que deve ser corrigido ou modificado na proposta.

Pelo Comitê de Ética:

- ☒ Referendado.
☐ Não referendado.
☐ Retirado de pauta.

Pirassununga, 13 de setembro de 2012.

Notifique-se o interessado.

Prof. Dr. Marco Antonio Trindade - Presidente do CEP/FZEA

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: SOUZA, Aline Fernanda de

Título: Estudo biológico das células germinativas caninas

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: ____/____/2013

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____
Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____ Julgamento: _____

Dedicatória

A minha família, por todo o apoio, carinho, amor e paciência:

Aos meus pais, Lúcia Helena Cazarini de Souza e Paulo Fernando de Souza.

Ao meu irmão Lucas de Souza

E principalmente aos meus avós, Augusta Rodrigues Cazarini e Angelo Cazarini

AGRADECIMENTOS

Acima de tudo a Deus, pela força, saúde e benção.

A CAPES pelo apoio financeiro concedido a este experimento.

A Prof^ª. Daniele dos Santos Martins, ao Prof. Carlos Eduardo Ambrósio e a Prof^ª. Maria Angélica Miglino por ter me concedido a oportunidade de realizar o mestrado, no departamento de cirurgia, no setor de Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

A Prof^ª.Daniele dos Santos Martins, pelos ensinamentos transmitidos, estando sempre do meu lado, tendo muita paciência, confiança, conhecimento e principalmente amizade.

À Juliana Cassals pela ajuda essencial, pela extraordinária dedicação em me fornecer material para a pesquisa, e acima de tudo agradeço pela sua confiança, que ao longo do tempo se tornou uma amiga muito especial.

À Dra. Celina, agradeço por ter me acolhido como uma mãe e pela a amizade construída ao longo desses anos.

À Dra. Lilian pela imensa ajuda na citometria de fluxo, western blotting e ao longo do meu mestrado, me auxiliando, palpitando (rsrs), me dando o apoio e força nos momentos difíceis e acima de tudo pela sua amizade.

À Ms. Fabiana (Martini) pela sua ajuda nas análises de PCR e no auxílio aos meus resultados.

À Dra. Rose pela ajuda na análise em microscopia de varredura e transmissão.

Ao Dr. Gaspar por todo auxílio e dedicação e pela ajuda na microscopia eletrônica de transmissão.

Ao Ms. Nilton dos Santos por todo apoio, ensinamentos e amizade.

A todos os meus amigos de pós-graduação do LMMD-FZEA, que ao longo destes dois anos posso considerá-los como amigos de coração, em especial a Dr^a. Celina, Dr^a. Lilian, Helena, Vanessa, Lidia, Arina, Cury, Lindsay, Gabriela, Juliano, Rafael, Carolina, Fernanda, Ramom, Hugo, Fabiana, Laís, Natália.

Ao pessoal da secretaria de pós-graduação da FMVZ e do programa de anatomia dos animais domésticos e silvestres, em nome de Maicon Silva e Jaqueline, por toda orientação.

As minhas grandes amigas e companheiras Naira (Pink) e Kelly, e ao meu mais que especial amigo Rodrigo, por me acompanharem nos momentos de desespero, delírio e por terem mais que paciência em todo o processo de construção deste trabalho.

As minhas amigas de longa data, Carolina Moraes Gimenes, Mariana Alberto da Silva e a Lariça Galhardo, pelo imenso apoio nos momentos difíceis.

Ao meu querido amigo Charles, que com toda a dedicação me ajudou nesta dissertação.

Ao pessoal de pós-graduação de São Paulo, em especial ao André , Thaís e Franceliusa (Natal) por toda a hospitalidade em receber em suas casas.

As minhas companheiras de casa e trabalho, Vanessa e Dr^a. Celina que ao longo destes dois anos juntas, me acompanharam em todos os momentos, tanto os de alegria, quanto os de tristeza.

Ao mineiro Gerson, por estar do meu lado nos momentos mais difíceis, por me apoiar desejando sempre o melhor.

Aos meus pais e avós por me transformarem no que hoje eu sou, pelos constantes ensinamentos, pelo suporte nas minhas mais loucas escolhas e pelos inúmeros esforços.

A minha madrinha Márcia pelo amor e incentivo, para a realização desta pesquisa.

A todos aos amigos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização dessa dissertação e pelo apoio moral que sempre me concederam

*“Há uma força motriz mais poderosa que o vapor, a eletrecidade e a energia atômica: a
VONTADE!”
(Albert Einsten)*

RESUMO

SOUZA, A.F. de. **Estudo biológico das células germinativas caninas**. [Biological research in primordial canine germ cells]. 2013. 87 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Células germinativas embrionárias são células pluripotentes derivadas das células germinativas primordiais que surgem no período do desenvolvimento embrionário. Sendo precursoras na maturação dos gametas sendo para a proliferação e formação de novas gerações de células germinativas. Estudos em modelos animais com células troncos embrionárias pluripotentes têm sido realizados com sucesso no tratamento de muitas doenças genéticas, principalmente em modelos caninos devido a homologia com humanos. Portanto, objetivamos estabelecer um estudo da biologia das células germinativas caninas para futuras pesquisas, visando sua viabilidade terapêutica. Foram utilizadas fêmeas de cães sem raça definida (SRD), foram submetidas à ovariio-salpinge-histerectomia, oriundas de campanhas de castração realizadas por associações e/ou organizações não governamentais na cidade de Pirassununga. Os embriões coletados foram analisados através de um cronograma histológico e também mensurados através da medida Crown-Rump(CR), em seguida em condições ésteres micro-dissecados na região paramesonéfrica próximo a região dos somitos. Os fragmentos foram isolados e colocados em cultivo com meio apropriado para o desenvolvimento e propagação das células germinativas primordiais (PGCs). Obteve-se sucesso nos cultivos com embriões em idades gestacionais próximas a 24 á 32 dias de gestação, nos quais demonstraram uma morfologia arredondada, pequena. Na microscopia eletrônica de varredura e transmissão observamos tamanhos variados entre as células aderidas umas as outras, mostrando um núcleo bem evidente e em seu citoplasma observou-se diversos tipos de organelas celulares, principalmente mitocôndrias. A análise imunohistoquímica revelou a presença de marcadores Oct4, sugerindo a presença de células pluripotentes e germinativas. Imunofenotipicamente as células através da citometria de fluxo revelou baixa expressão para o marcador Oct4 enquanto que para os marcadores CD 34, C-Kit houve expressão. RT-PCR mostrou expressão do marcador para pluripotencialidade Oct4 e Sox2 e pela técnica de Western Blotting identificou a expressão da proteína específica para Oct4. Portanto estes achados sugerem com sucesso o estabelecimento de cultivo e proliferação e desenvolvimento das células germinativas primordiais caninas.

Palavras-chave: Célula tronco germinativa. Embriões caninos. Embriologia.

ABSTRACT

SOUZA, A.F. de. **Biological research in primordial canine germ cells**. [Estudo biológico das células germinativas caninas]. 2013. 87 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Embryonic germ cells are pluripotent cells derived from primordial germ cells which arise during embryonic development. These cells are precursors in the maturation of gametes and for proliferation and formation of new generations of germ cells. Studies using animal models for pluripotent embryonic stem cells have been conducted successfully in the treatment of many genetic diseases, especially using canine models, due the homology between canine and humans. Therefore, we aimed to establish a study of canine biology of germ cells for future research, aiming viability therapy. For this study, we used female mongrel dogs (SRD), which underwent ovary- salpingo- hysterectomy, arising from castration campaigns run by associations and/or NGOs in Pirassununga city. The embryos collected were analyzed using histology methods following the timeline and measure by measuring Crown-Rump (CR) then in an environment without contaminants (sterile) the embryos were micro-dissected focusing in the paramesonephric region near the region of somite where the germ cells are. The fragments were isolated and placed in culture with a specific media for the development and spread of primordial germ cells (PGCs). Success was achieved in cultures with embryos at a gestational age close to 22 to 30th days of gestation, in which the cells showed a rounded morphology and small. In electron microscopy and transmission analyses, sizes were observed between the cells attached to each other, showing a conspicuous nucleus and in the cytoplasm was observed several types of cell organelles, especially mitochondria. Immunohistochemical analysis revealed the positive immunolabeling for Oct4, suggesting the presence of pluripotent cells and germ cells. The analyses using immunophenotyping by flow cytometry showed low expression for Oct4 while for CD34 and C-kit markers had positive expression. RT-PCR showed expression of the pluripotency markers Oct4 and Sox2. By the technique of Western Blotting identified protein expression specific for Oct4. Thus these findings suggest the successful establishment of culture, proliferation and development of primordial germ cells canine.

Keyword: Germ stem cell.Canine embryos.Embryology.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fotomicrografia de esfregaços vaginais em cadelas, demonstrando as características celulares do ciclo estral. Em A Estro células superficiais anucleadas; B Proestro células superficiais anucleadas e nucleadas. C e D Anestro células parabasais e intermediárias	36
Figura 2 - Fotomicrografia de embriões caninos	51
Figura 3- Fotomicrografias de cortes longitudinais de embriões caninos de 24 (A) e 26 (B) dias de idade	52
Figura 4 - Fotomicrografias de cortes longitudinais de embriões caninos de 32 (A) e 35 (B) dias de idade	53
Figura 5 - Fotomicrografia das células germinativas caninas.....	56
Figura 6 - Fotomicrografia das células germinativas caninas.....	57
Figura 7 - Fotomicrografia das células germinativas embrionárias caninas de embriões com idade gestacional aproximada de 25 dias	58
Figura 8 - Fotomicrografia das células germinativas embrionárias caninas após o descongelamento.....	59
Figura 9- Fotomicrografia de células fibroblásticas caninas obtidas de embriões com aproximadamente 30 dias de gestação.....	60
Figura 10- Microscopia eletrônica de varredura e transmissão das células germinativas embrionárias caninas.....	61
Figura 11 - Fotomicrografia de cortes longitudinais de embrião canino de aproximadamente 24, 32 e 35 dias de gestação	63
Figura 12 - Fotomicrografias das colônias derivadas das células germinativas embrionárias caninas com 15 dias de cultivo	64
Figura 13 - Histograma da imunofenotipagem por citometria de fluxo, embrião com gestação aproximada de 26 dias de idade e com 14 dias de cultivo	65
Figura 14 - Gráfico representando a expressão de Oct4 e SOX2 em linhagens germinativas embrionárias caninas.....	66
Figura 15- Análises por western blotting com células germinativas embrionárias caninas com aproximadamente 15 dias de cultivo	67

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Tabela 1 -	Dados relacionados a quantidade de embriões caninos, número de embriões caninos utilizados e idade gestacional das cadelas	35
Quadro 2 -	Descrição da natureza e procedência dos anticorpos primários utilizados nas provas moleculares de citometria de fluxo	44
Quadro 3 -	Descrição da natureza e procedência dos anticorpos secundários utilizados nas provas moleculares de citometria de fluxo	45
Quadro 4-	relação dos pares de primers, sequência, temperatura para anelamento e tamanho do fragmento aplicado	46

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	OBJETIVOS	20
2.1	OBJETIVO GERAL	20
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
3	REVISÃO DE LITERATURA	22
3.1	CÉLULAS TRONCOS.....	22
3.2	FERTILIZAÇÃO E DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO CANINO	24
3.3	CÉLULAS GERMINATIVAS EMBRIONÁRIAS: MIGRAÇÃO, ORIGEM E CONSIDERAÇÕES MORFOLÓGICAS	26
3.4	CÉLULAS GERMINATIVAS PRIMORDIAS: ASPECTOS MOLECULARES E SUA APLICAÇÃO E MEDICINA REGENERATIVA	28
4	MATERIAL E MÉTODOS	34
4.1	LABORATÓRIO E COLETA DO MATERIAL	34
4.2	CITOLOGIA VAGINAL	35
4.3	OBTENÇÃO DOS EMBRIÕES CANINOS.....	36
4.4	PADRONIZAÇÃO DO CULTIVO CELULAR DAS CÉLULAS GERMINATIVAS EMBRIONÁRIAS CANINAS.....	37
4.5	CULTIVO, PROPAGAÇÃO E CRIOPRESERVAÇÃO DAS CÉLULAS DE FIBROBLASTO EMBRIONÁRIOS CANINOS	38
4.6 -	PROPAGAÇÃO EM CULTURA DAS CÉLULAS GERMINATIVAS EMBRIONÁRIAS CANINAS	39
4.6.1	Criopreservação	39
4.6.2	Monocamadas de fibroblastos embrionários caninos (MEFs).....	40
4.7	ENSAIOS MICROSCÓPICOS	40
4.7.1	Microscopia eletrônica de varredura e transmissão	40
4.7.2	Análise histológica.....	41

4.7.3	Imuno-histoquímica	41
4.7.4	Fosfatase alcalina	43
5	ANÁLISE MOLECULAR	43
5.1	ANÁLISE DE CITOMETRIA DE FLUXO.....	43
5.2	ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA : EXTRAÇÃO E PCR	45
5.3	WESTERN BLOTTING	46
6	RESULTADOS	49
6.1	ANÁLISE MACROSCÓPICA E HISTOLÓGIA BÁSICA	49
6.2	CULTIVO CELULAR: ISOLAMENTO E ESTABELECIMENTO DAS CÉLULAS GERMINATIVAS EMBRIONÁRIAS CANINAS.....	54
6.3	CRIOPRESERVAÇÃO	59
6.4	CULTIVO, PROPAGAÇÃO E CRIOPRESERVAÇÃO DE FIBROBLASTO EMBRIONÁRIOS CANINOS	59
6.5	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO E VARREDURA	60
6.6	ANÁLISE IMUNOHISTOQUÍMICA	62
6.7	FOSFATASE ALCALINA	63
6.8	CITOMETRIA DE FLUXO	64
6.9	ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA : EXTRAÇÃO E PCR	65
7	WESTERN BLOTTING	67
8	DISCUSSÃO	69
9	CONCLUSÕES	75
	REFERÊNCIAS	78
	ANEXO A	87

Introdução

1INTRODUÇÃO

A existência da capacidade renovadora das células em originar múltiplas linhagens celulares tem sido descrita a mais de uma década, mas a efetivação para caracterizar as células troncos e capitalizar os seus recursos e potenciais ainda são recentes. O termo célula tronco refere-se a células com habilidade em gerar células- filhas com características similares a célula- mãe, bem como diferenciar-se em células especializadas (WENCESLAU, 2009). A descoberta de recentes estudos tem reportado o interesse sobre células troncos embrionárias pluripotentes, devido ao seu grande potencial na capacidade de diferenciação e seu comportamento *in vitro* (GEARHART, 1998).

Em particular as células germinativas embrionárias que são derivadas das células germinativas primordiais (PGCs) e surgem no início do desenvolvimento embrionário, cujos descendentes sobreviventes se tornarão espermatozoides ou óvulos. (SHAMBLOT et al., 1998; McLAREN, 2003; SHAMBLOT et al., 2009). A localização das PGCs pode ser fundamental para a sua especificação preservando a integridade da linhagem das células germinativas enquanto ocorre a programação e o desdobramento das células somáticas. Assim durante a sua embriogênese as células germinativas primordiais em mamíferos, atravessam da parte posterior do epliblasto para a linha primitiva onde permanecem localizadas dentro do mesoderma extra-embrionário na base do alantoide, e serão reorganizados sete dias após o coito onde irão se reorganizar dentro da área de justaposição ao rim. Conforme o desenvolvimento embrionário essas células irão migrar por movimentos ameboides até atingirem as gônadas indiferenciadas, das quais diferenciam-se por mitose em machos e por meiose em fêmeas (CHIQUEINE, 1954; GINSBURG;SONW;McLAREN, 1990; LAWSON; HAGE, 1994).

A linhagem de células germinativa é consagrada por revelar um interessante estudo no sistema de rota de migração, cultivo, proliferação, desenvolvimento e diferenciação *in vitro*. E por serem as únicas capazes de transmitir o material genético ao longo das gerações, é vista como uma importante fonte no tratamento ou “cura” da infertilidade tanto masculina quanto feminina (HAYASHI et al., 2012; HAYASHI et al., 2011). Neste contexto, as células germinativas primordiais são conhecidas imuno-geneticamente por possuírem alta pluripotencialidade e morfológicamente por apresentarem um aspecto arredondado, núcleo e nucléolos bem evidentes. Entretanto, em meio de cultura as PGCs possuem aspectos distintos

de outros tipos de células troncos embrionárias, pois requerem condições de isolamento especiais e meio de cultura específico com suplementos cruciais para seu desenvolvimento. Sendo que mesmo com esses fatores ocorre a demora na proliferação celular quando comparadas com outros tipos de células troncos embrionárias (JUNG et al., 2006; KÜHHOLZER et al., 1999; KIM et al., 2005; LEDDA et al., 2010).

Em análise dos aspirados pesquisas relacionadas as células troncos, vêm descrevendo o comportamento *in vitro* e *in vivo* das células germinativas primordiais e sua eventual diferenciação em espermatozoides e óvulos em várias espécies, particularmente em invertebrados, anfíbios e aves. Porém até a atualidade existem escassos relatos de caracterização dessas células em animais domésticos. Alguns trabalhos relatam com sucesso o isolamento e a caracterização imunogênicas das PGCs em humanos (SHAMBLLOT et al., 1998; LIU et al., 2004), camundongos (OZDZENSKI, 1969; SAITOU; YAMAJI, 2012), faisão (KIM et al., 2005), cabras (KÜHHOLZER et al., 1999), ovinos (LEDDA et al., 2010), mini-suínos Yucatan (PETKOV et al., 2011), coelhos (KAKEGAWA et al., 2008), galinhas (JUNG et al., 2006; CHOINACKA- PUCHTA et al., 2012) e Zebrafish (RAZ, 2003). Porém, escassos trabalhos são referentes a carnívoros, principalmente com células germinativas embrionárias, sendo que Martins et al. (2006) realizou uma pesquisa com este modelo animal, a qual demonstrou o cultivo das células germinativas embrionárias caninas.

Assim, devido ao modelo carnívoro ser facilmente manipulado e constituir um ótimo modelo para o estudo de disfunções ou doenças que acometem os seres humanos. Os canídeos e o cão doméstico (*canis lúpus familiares*) apresentam-se como um modelo ideal nos estudos de células troncos em geral, pois possuem inúmeras similaridades com algumas doenças em humanos de ordem genéticas crônicas e degenerativas; e em muitas partes sua bioquímica e fisiologia são homólogas aos humanos (HATOYA et al., 2006; HAYES et al., 2008; WHITWORTH; OVCHINNIKOV; WOLVETAN et al., 2012). Além disso, tem sido instrumento de aplicação médica no transplante de medula óssea e no desenvolvimento de terapias cardiovasculares e doenças ortopédicas (MOISE, 1999; EGERMANN; GOLDHAHAN; SCHNEIDER, 2005; PONDER, 2006; PEARCE et al., 2007). Sendo possível transpor e aplicar esses conhecimentos da medicina veterinária para a medicina humana. Portanto, o presente estudo tem como objetivo fundamental isolar e caracterizar as células germinativas primordiais em modelos caninos com vistas para o desenvolvimento de competências na medicina veterinária regenerativa como uma viabilidade na terapia celular de doenças reprodutivas.

Objetivos

2OBJETIVOS

O presente estudo visa testar a seguinte hipótese:

A linhagem de células embrionárias germinativas caninas possuem a mesma localização e características típicas de outras linhagens presentes em mamíferos.

2.1 OBJETIVO GERAL

Isolar, cultivar e caracterizar as células germinativas embrionárias caninas para sua posterior aplicação em futuras terapias na medicina veterinária.

2.2 O BJETIVOS ESPECÍFICOS

- Extrair e isolar células germinativas embrionárias de cães no período gestacional entre 15^a à 30^a semana;
- Testar diferentes métodos de cultivo;
- Avaliar a expansão das células germinativas embrionárias caninas;
- Cultivo e obtenção de fibroblastos fetais caninos;
- Identificar as células germinativas embrionárias caninas, utilizando marcadores específicos para a sua detecção, através da imunohistoquímica, citometria de fluxo, expressão gênica (PCR), western blotting;
- Caracterizar morfolologicamente as células germinativas através da microscopia eletrônica de varredura e transmissão.

Revisão de Literatura

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 CÉLULAS TRONCOS

Nas últimas décadas os conhecimentos sobre células-tronco evoluíram significativamente, em particular sobre sua capacidade de expansão, diferenciação e auto-regeneração. Essas propriedades tornam as células-tronco únicas, como potencial ferramenta na terapia de doenças que não podem ser tratadas de maneira tradicional.

Em geral as células troncos são definidas como células que possuem a capacidade de diferenciação e auto-renovação por períodos indefinidos durante toda a vida de um indivíduo e que em condições apropriadas e sinais corretos de microambiente podem diferenciarem-se em várias linhagens com características e funções especializadas como miócitos, neurônios e hepatócitos (KERKIS et al., 2001; VERFAILLIE; PERA; LANSDORP, 2002; HWANG, 2004; McBEATH et al., 2004; PARDO, 2005; SEMB, 2005; WANG et al., 2005; ARCE et al., 2007; BREVINI et al., 2007; KUIJK et al., 2010).

As células troncos podem ser classificadas de acordo com a plasticidade que elas possuem, ou seja, de qual origem de tecido embrionária essas diferentes células surgem. Portanto podemos classificá-las em: totipotentes, pluripotentes, multipotentes e unipotentes.

O termo totipotentes refere-se ao potencial que estas células têm de gerar um organismo totalmente funcional, ou seja, correspondem a um embrião completo com o potencial de originar células do tecido embrionário e extra-embrionário. As células-tronco pluripotentes são utilizadas para descrever as células com a capacidade de dar origem a progenitores que formam quaisquer folhetos germinativos embrionários: mesoderme, endoderme e ectoderme. Devido a sua linhagem, este tipo celular é amplamente utilizado em pesquisas para fins terapêuticos, aplicações clínicas e comerciais (MARTIN, 1981; EVANS et al., 2003; WANG et al., 2005; ARCE et al., 2007; BREVINI et al., 2007; YU et al., 2008; KUIJK et al., 2010). As classificadas como células-tronco multipotentes são as que estão presentes no indivíduo adulto, que possuem seu potencial limitado, pois apenas podem dar origem a precursores relacionados com somente um dos três folhetos embrionários: por exemplo, células-tronco que dão origem a tecidos derivados exclusivamente da endoderme como tecido pancreático ou pulmonar (PARDO, 2005; WANG et al., 2005; ARCE et al.,

2007). E por último a categoria que corresponde as células-tronco unipotentes, que correspondem as células que somente podem gerar células-filhas que se diferenciam ao longo de uma única linhagem celular, ou seja, produzem somente um único tipo celular maduro (KUIJK et al., 2010).

Quanto a origem da extração das células-tronco, podem-se obter a partir de dois tecidos: células-tronco embrionárias (ES cells ou ESCs) e células-tronco adultas (ASCs). Assim, as células-tronco adultas foram as primeiras a serem bem caracterizadas, a partir da década de 60 quando estudos demonstraram que organismos adultos têm a capacidade de auto-regenerar determinados tecidos como: a pele, o epitélio intestinal e principalmente as células sanguíneas onde suas células são constantemente destruídas e renovadas, porém limitando a sua capacidade de diferenciação (FRIEDENSTEIN; GORSKAJA; KALAJINA, 1974; ORLIC et al., 2001; VERFAILLIE; PERA; LANSDORP, 2002; BAKSH; SONG; TUAN, 2004; WAGERS; WEISSMAN, 2004; ARCE et al., 2007). Enquanto que as células-tronco embrionárias são classificadas como totipotentes ou pluripotentes devido a sua capacidade de se diferenciar em outros tecidos celulares e podem ser obtidas a partir das primeiras etapas de formação do embrião quando o óvulo fecundado é uma esfera compacta ou mórula (ODORICO; KAUFMAN; THOMSON, 2001; SMITH, 2001; VERFAILLIE; PERA; LANSDORP, 2002; ARCE et al., 2007).

De acordo com a linhagem, as células-tronco embrionárias são derivadas do blastocisto e as células embrionárias germinais derivadas após implantação do blastocisto, são similares em muitos aspectos. Ambas são capazes de replicar-se e dividir-se em cultivos sem demonstrar alterações cromossômicas, ademais expressa uma série de marcadores característicos de progenitores totipotenciais que facilitam sua identificação. A única diferença é que as células embrionárias germinativas possuem seu potencial mais limitado do que as células-tronco embrionárias por estarem em um estágio um pouco mais avançado (SHAMBLOTT et al., 1998; ODORICO; KAUFMAN; THOMSON, 2001; SAITO et al., 2002; VERFAILLIE; PERA; LANSDORP, 2002; SEMB, 2005; ARCE et al., 2007).

Uma das vantagens da utilização de células-tronco embrionárias em investigações, tratamentos e terapias é a habilidade que possuem de proliferar-se indefinidamente, sendo capazes de gerar uma vasta variedade de grupos celulares quando estimuladas por mecanismos controladores de diferenciação, permitindo uma ampla manipulação *in vitro* (WEISSMAN, 2000; VERFAILLIE; PERA; LANSDORP, 2002; ARCE et al., 2007). Em contrapartida, por tratar-se de células altamente indiferenciadas, podem induzir a formação de certas neoplasias como teratomas, além de várias implicações éticas

correlacionadas a sua utilização, sendo esse um ponto muito importante a ser considerado. (PERA et al., 2000; DOSS et al., 2004).

3.2 FERTILIZAÇÃO E DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO CANINO

Os mamíferos apresentam fecundação interna, ou seja, a união dos gametas (masculino e feminino) ocorre no interior do aparelho feminino. A gestação canina e seus acontecimentos iniciais apresentam algumas dificuldades, devido não ter ciência do período correto da ovulação do primeiro oócito ovulado (MIGLINO, 2006).

A fertilização provavelmente ocorre concomitantemente com o surgimento do pico de pré-ovulação do hormônio luteinizante (LH), aproximadamente entre 24 a 96h do pico do hormônio. Os ovócitos liberados são imaturos e se encontram na primeira divisão da meiose. A ovulação é um processo longo, ou seja, os ovócitos vão sendo liberados de forma gradativa, possibilitando a fertilização por espermatozoides de vários animais. Os espermatozoides do cão são depositados no interior do útero e rapidamente percorrem todo o oviduto. Eles podem sobreviver no trato genital da fêmea por um período de seis a sete dias, com isto um único acasalamento é capaz de resultar em fertilização. Além disso, os espermatozoides são capazes de penetrar no ovócito imaturo, aguardando a liberação do segundo corpúsculo polar e conseqüentemente, a maturação deste. Com isso, ocorre a formação do pró-núcleo feminino e a fusão com o pró-núcleo masculino, a migração destas células embrionárias caninas em fase de segmentação pela tuba uterina pode ter duração de 8 a 10 dias, sendo que cada processo de segmentação e clivagem ocorre de maneira diferentes para cada espécie, pois depende da quantidade de vitelo presente no ovo (CHRISTIANSEN, 1988; MaGEADY et al., 2008; MACHADO;ALMEIDA;AMANO, 2011).

O intervalo da fertilização ocorre entre 24 a 48h, onde o gameta masculino e feminino formarão o zigoto, que contém uma combinação de cromossomos, metade paterno e a outra materna. Durante o processo de segmentação ocorre a clivagem do zigoto em que esse entra em sucessivas divisões mitóticas resultando em um aumento celular até a formação de células conhecidas por blastômeros. O aumento celular dos blastômeros irá resultar na formação da mórula, assim uma cavidade blastocística se forma na mórula, convertendo-a então ao estágio de blastocisto, que é formado por: embrioblasto, cavidade blastocística (um espaço

preenchido por fluido) e trofoblasto uma delgada camada celular externa (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004; MOORE; PERSAUD, 2004).

Após este segmento ocorrerá a gastrulação, que consiste no estágio de desenvolvimento embrionário dos tecidos e órgãos, durante a qual a camada única blástula é convertida em três estruturas trilaminares denominadas: por camada exterior ectodérmica, intermediária mesodérmica e interior endodérmica (McGEADY et al 2008; HYTTEL, 2010).

Essas alterações irão ocorrer durante todo o conjunto ordenado de migração das células da superfície da blástula em seu interior, originando essas específicas formações dos folhetos. O desenvolvimento nos mamíferos se assemelha ao desenvolvimento das aves, com a formação da linha e do nó primitivo. A linha primitiva atua como o local da iniciação para a gastrulação, com o seu aparecimento podem ser identificados os eixos craniocaudal do futuro embrião, suas faces ventro-dorsais e seu lado direito e esquerdo (MOORE; PERSAUD, 2004; McGEADY et al., 2008).

Nos mamíferos em geral o ectoderma é a capa superficial externa que originará a epiderme, tecido nervoso especificamente ao sistema nervoso central e periférico, alguns tecidos conjuntivos e esqueléticos da cabeça, como a retina. O endoderma forma-se através da migração e delimitação das células mais profundas do embrioblasto e da discoblástula. Este folheto embrionário formará o revestimento interno dos aparelhos digestivos e respiratórios dos órgãos associados com a digestão, incluindo as células glandulares. Enquanto que pela linha e pelo nó primitivo irão migrar células que formarão o mesoderma. A capa mesodérmica, será o precursor da formação da maior parte dos tecidos musculares e esqueléticos, parte do sistema urogenital, órgãos reprodutores, bem como a maior parte do sistema cardiovascular, assim como o coração e vasos sanguíneos (NODEN; LAHUNTA, 1990; SANTOS; AZOUBEL, 1996; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

Em carnívoros domésticos, especificamente em embriões caninos, o desenvolvimento embrionário a partir dos 15 dias de gestação o embrião apresenta perfeita característica primitiva. A formação ectodérmica do tubo neural e a parte do segmento da espinha dorsal embrionária ocorre aos 16 dias de gestação, sendo que aos 17 dias de gestação as três primárias vesículas cerebrais estão presentes. Em relação aos anexos embrionários, a formação do alantoide ocorre aos 18 dias de gestação. Enquanto que aos 22 dias de gestação o âmnio está completamente formado. E nesta mesma idade embrionária encontra-se presente o terceiro arco laríngeo, forma-se a cavidade olfatória, os membros torácicos e pélvicos, é nesta fase que temos o início do embrião propriamente dito (EVANS; SACK, 1973).

3.3 CÉLULAS GERMINATIVAS EMBRIONÁRIAS: MIGRAÇÃO, ORIGEM E CONSIDERAÇÕES MORFOLÓGICAS

Células embrionárias possuem uma inerente capacidade de diferenciar todos os tipos celulares necessários para formar tecidos, órgãos e sistemas. Após a implantação do zigoto, sucessivas divisões do blastômero dão origem as células com capacidade totipotentes. Porém, com sua continua divisão as células são progressivamente restringidas à linhagens específicas, no qual irá contribuir com células de linhagens embrionárias ou extra-embrionárias. Durante esse período as células derivadas do epiblasto formam as células germinativas primordiais (PGCs) (LAWSON, 1994). Em uma fase precoce do desenvolvimento embriológico, com os somitos formados, as células germinativas primordiais migram através da linha primitiva e em seguida, dirigem-se para o saco vitelino e alantoide no mesentério primitivo e se movem ao longo da parede intestino posterior à crista genital, onde irá formar uma estrutura destinada a ser a gônada indiferenciada (Mc GEADY et al., 2008; HYTTEL, 2010).

Assim, ativa ou passivamente, as células germinativas primordiais multiplicam-se mitoticamente ao longo da migração aumentando sua população celular até o desenvolvimento das gônadas. Logo após a entrada do desenvolvimento das gônadas, as células germinativas começam a se fechar em compartimentos específicos, cordões seminíferos no embrião masculino e folículos primordiais no embrião feminino (McGEADY et al., 2008; HYTTEL, 2010). Contudo, a origem das células somáticas das gônadas ainda é ambígua, três fontes têm sido citadas: no local das células mesenquimais, no epitélio coleômico e células derivadas dos túbulos mesonéfricos. Porém, a proposta mais consistente é de que as gônadas indiferenciadas derivam-se das células germinativas primordiais e células da mesoderma, sendo que as células mesonéfricas dos túbulos mesonéfricos são as principais colaboradoras para a sua formação (McGEADY et al., 2008).

Quanto aos primeiros relatos, das células germinativas foram de fato visualizados em humanos, fora do embrião no endoderma da parede dorsal do saco vitelino, situado na base do desenvolvimento alantoide (McKAY et al., 1953; MOTTA, 1997). Na espécie *Drosophila melanogaster* as células germinativas primordiais derivam do plasma da pole e são incorporadas nas células poles. Enquanto que na espécie *C.elegans*, as células germinativas primordiais em desenvolvimento são segregadas muito cedo, durante a primeira clivagem do

embrião e são marcadas pela deposição de ribonucleoproteína P-grânulos componentes (PGL-1) (McLAREN; LOPES, 2003; CRITTENDEN; KIMBLE, 2008).

Vários estudos feitos em camundongos e ratos mostraram que as células germinativas primordiais são identificadas muito cedo no embrião entre os estágios do quinto ao sexto dia de nascimento, localizadas em uma pequena população de células no epiblasto proximal do ectoderma primitivo embrionário (YABUTA, 2006; LEDDA, 2010). Chiquoine (1954) descreveu em camundongos que as primeiras reorganizações das células germinativas primordiais ocorrem aproximadamente com oito dias de gestação no embrião e são visíveis e dispersas entre a região caudal e a linha primitiva na raiz do mesoderma e subjacente ao saco vitelino. Enquanto que em embriões de nove dias pode-se observar que as células estão migrando da região extra-embrionária para o embrião propriamente dito, próximo a face lateral e caudal do intestino médio para o grosso. E em aproximadamente 11 a 12 dias, aumenta a quantidade de células germinativas, sendo que a grande maioria estará concentrada no cume genital.

Em humanos as células germinativas primordiais são reconhecidas pela primeira vez no endoderma do saco vitelino, no início do desenvolvimento embrionário e conforme a passagem dos dias do embrião elas migram para as gônadas. As primeiras populações de PGCs formam-se durante a terceira semana de desenvolvimento. Durante a quarta semana de desenvolvimento as células germinativas primordiais são reconhecidas próximo ao epitélio do intestino grosso, onde estão bem demarcadas pelas suas células vizinhas. Enquanto que na quinta semana elas começam a migrar para dentro do embrião, sendo que na sexta semana entram nas gônadas e ocorre uma expansiva proliferação das PGCs (FUJIMOTO; MIAYAYAMA; FUJITA, 1977; KURILO, 1981).

Nos bovinos as células germinativas primordiais podem ser detectadas no cume genital por volta de 28 dias de gestação. Enquanto que em ovinos essas podem ser vistas no embrião por volta de 20 a 22 dias, onde ocorre a migração dessas células, enquanto no período de 23 a 28 dias as PGCs foram encontradas em grande parte nas cordilheiras genitais (LEDDA et al., 2010). Em um estudo realizado com caprinos foram retiradas PGCs das gônadas de fetos de gestação aproximada de 32 dias e pode-se perceber que essas células ainda estão presentes no mesentério dorsal no início da quinta semana de gestação (KÜHHOLZER et al., 1999).

Em coelhos isolaram células germinativas primordiais de embriões em vários estágios de desenvolvimento entre 9.5, 10.5 e 11.5 depois do coito (dpc), onde obtiveram com sucesso a formação de colônias, enquanto que no estágio 8.5 não alcançaram o mesmo resultado

positivo (KAKEGAWA et al., 2008). Em suínos foi relatado o surgimento das PGCs no cume genital a partir de 18 dias de gestação, sendo que em um estudo realizado com raças de mini-suínos Yucatan foi relatado com sucesso o cultivo celular de PGCs com embriões em idade gestacional aproximada de 20 dias (PETKOV et al., 2011).

Quanto as suas características morfológicas, de acordo com um estudo dirigido por Fujimoto, Miyayama e Fujita (1977) realizado em humanos, observou-se que essas células possuem estreitas relações com as células somáticas e morfológicamente são caracterizadas pelo seu grande tamanho, com o núcleo amplo e redondo com nucléolos bem evidentes. Associados a eles verificou-se partículas de glicogênio abundante e numerosas gotículas lipídicas em seu citoplasma. Ribossomos, bem desenvolvido complexo de Golgi, retículo endoplasmático rugoso, grande número de mitocôndrias e poucos microtúbulos e microfilamentos presentes. Características essas supracitadas acima também foram observadas por Petkov et al. (2011) em mini-suínos Yucatan, no qual também observou grande presença de células ciliadas. Contudo, algumas dessas características podem mudar conforme o estágio de desenvolvimento do embrião, como por exemplo: o conteúdo do glicogênio e o desenvolvimento de organelas celulares, variando assim o número e a quantidade de organelas e partículas encontradas.

3.4 CÉLULAS GERMINATIVAS PRIMORDIAS: ASPECTOS MOLECULARES E SUA APLICAÇÃO E MEDICINA REGENERATIVA

O termo célula germinativa primordial (PGCs) é estritamente aplicado aos precursores de células germinativas diplóides que transitoriamente existem no embrião, antes delas entrarem em associação com as células somáticas das quais irão se desenvolverem nas gônadas, assim tornando-se irreversivelmente comprometidas como células germinativas (MARSHAK;GARDNER;GOTTLIEB2001).

Os destinos das células germinativas são especificados por moléculas de sinalização, ambos os aspectos de proliferação e diferenciação das células germinativas primordiais em particular a localização é fortemente influenciada por fatores de secreção de genes específicos (McGEADY et al., 2008).

Na grande maioria dos organismos estudados, com exceções de mamíferos e aves, a segregação das células germinativas pluripotentes, acontece a partir de células somáticas

envolve fatores maternos ou determinantes (DIXON, 1994). Contudo em mamíferos e aves acreditasse que as PGCs são induzidas no embrião por sinais produzidos por células adjacentes extra-embrionárias (GINSBERG, 1994; MARSHAK;GARDNER;GOTTLIEB,2001).

Entretanto pesquisas com células germinativas sugerem que essas induzem fatores que estão presentes perto de junções entre o trofoplasto e da massa celular interna (ICM) ou com células extra-embrionárias ectodérmicas e do epiblasto (MARSHAK;GARDNER;GOTTLIEB,2001). Além disso, há experimentos que descrevem que a proteína morfogenética do osso (BMP4 e BMP8b) influencia na produção das células germinativas, funcionando como colaboradora para seu desenvolvimento. A BMP4 e BMP8b são altamente expressas no ectoderma extra-embrionário e também são expressas nas células mesoderma e alantoide e posteriormente na linha primitiva ao redor das PGCs (LAWSON et al., 1999; SHAMBLOTT et al., 2009). Johnson et al. (2005) sugerem que a medula óssea é fonte de produção de células germinais em adultos (JOHNSON et al., 2005), porém ainda não pode-se afirmar que tais descobertas são fidedignas.

As interações das PGCs e seus desenvolvimentos e rota de migração podem ser identificadas através de específicos marcadores moleculares antes e depois do movimento das células germinativas para as cristas gônadais. Primeiramente as células germinativas primordiais, no qual constituem as primeiras populações de células de linhagem germinal, podem ser identificadas simplesmente com atividade de fosfatase alcalina (TNAP) (Mac GREGOR et al., 1995; YABUTA et al., 2006). A TNAP é altamente expressa em vários tipos de tecidos, mas em células germinativas elas são intensamente expressas ao redor das células somáticas no período primordial (McLAREN; LOPES, 2003).

Marcadores específicos podem detectar as linhagens celulares germinais, como por exemplo, o fator de transcrição Oct4 (ou POU5F1). O gene Oct4 está localizado, em humanos, no cromossomo 6p21 e consiste em cinco exons que codifica uma proteína da família dos octameros; a sequência é reconhecida por elevada carga de POU contidas em fatores de transcrição da proteína Oct4, explicando uma alternativa para o nome proposto (STURM; HERR, 1988). Um estudo dirigido por Cauffman et al. (2006) descreve que a proteína Oct4 possui duas isoformas, Oct4A e Oct4B. Em humanos, o Oct4A (isoforma 1, NP_ 002692.2) está claramente relacionado a pluripotencialidade, tendo sua expressão nuclear, e traduzida a partir da variante 1 do Oct4 humano (NM _ 002701.4). Enquanto que o Oct4B (isoforma 2, NP _ 001167002.1) está envolvido na resposta ao estresse celular, expresso essencialmente no citoplasma, e é igualmente traduzida pelas variantes 2 (NM _

203289.4) e 3 (NM_ 001173531.1) do gene (LEE et al., 2006). Entretanto, em caninos, é descrita somente uma variante de mRNA (XM_ 538830.1), assim como de proteína (XP_ 538830.1).

Este fator de transcrição, Oct4, atua como chave reguladora no fenótipo de pluripotencialidade. É expresso na embriogênese mais especificamente no compartimento do epiblasto; em células embrionárias do carcinoma; células de linhagens estaminais; e após a gastrulação sua baixa regulação diminui restringindo sua expressão nas células germinativas (PESCE et al., 1998; NICHOLS et al., 1998; PESCE; SCHOLER, 2000). Alguns estudos mostram que a expressão de Oct4 também pode ser visualizada em células germinativas femininas no estágio final da prófase da meiose, nos oócitos dentro dos folículos primários e no início do crescimento e foliculogênese (PESCE et al., 1998;).

Outros marcadores usualmente difusos para as PGCs são: Sox2, SSEA1 e Nanog que carregam um importante papel no processo da pluripotencialidade; Cxcr4 e C-Kit que são expressos ao longo da migração, no qual o último interage na sobrevivência, migração e proliferação das células germinativas primordiais e do intestino grosso; $\beta 1/2$ integrina, que possui um importante papel na matriz extracelular; e finalmente ao entrar na gônada, as PGCs começam expressar Dazl, Vasa, Gcna, que interagem com as células somáticas das gônadas e mais tarde irão determinar os sexos específicos (MANOVA; BACHVAROVA, 1991; PELOSI et al., 2011). Recentemente dois marcadores foram isolados para expressar especificamente células germinativas, estes são denominados fragilis (ou Ifitm3/Mill) e Stella (ou Dppa3/Pgc7). O primeiro é expresso próximo a região do epiblasto, ou seja, quando ocorre mudanças das células do epiblasto para a linha primitiva. Assim, quando as PGCs começam a migrar para longe ocorre a baixa regulação de fragilis, porém depois ele começa a produzir novamente. Enquanto que Stella é um gene, que produz sinal nuclear, no qual é altamente expresso na região do cluster onde fragilis é fortemente ativo. Este marcador (Stella) ajuda a manter a expressão específica das PGCs durante a migração para o cume genital (McLAREN; LOPES, 2003).

Com a migração das células germinativas primordiais para o cume genital, começa o processo de formação das gônadas indiferenciadas em machos e fêmeas. Estudos em camundongos demonstram que o gene ácido retinoico (*Stra8*), produzido in vivo pelos mesonefros em ambos os sexos, é responsável pela indução da meiose nos ovários. Enquanto que em contraste no cume genital de machos acreditasse que sua formação é induzida pelas células somáticas, no qual a expressão de Cyp26b1 bloqueia provavelmente a entrada da meiose, degradando o ácido retinoico. Apesar da expressão Cyp26b1 ocorrer cedo nas

gônadas em ambos os sexos, nos machos ela é mais altamente expressa, devido talvez pelo gene Sry (Y-cromossomo), influenciar em sua alta-regulação (Mc LAREN; LOPES, 2003; WANG; TILLY, 2010).

Assim com o desenvolvimento da gônada indiferenciada num arranjo testicular pode ser identificada por genes que determinam o sexo incluindo Sry, Sox-9 e Sf-1 promove o desenvolvimento das células de Sertoli e das células de Leydig. Ambos participam na alta regulação para determinação de linhagens masculinas. Sendo que para o desenvolvimento da gônada indiferenciada em ovários é diretamente influenciada por Dax-1 e Wnt-4 e o fator de crescimento Wnt-4 contribuem para o desenvolvimento do ovário indiferenciado e para o ducto paramesonéfrico (McGEADY et al., 2008).

Para a evolução do cultivo *in vitro* das células germinativas primordiais fatores tem sido identificados como chaves reguladoras na transmissão e recepção de sinais celulares. Três principais ligantes para a proliferação e sobrevivência são necessários, estes são: fator de crescimento de células troncos (células fibroblásticas como “feeder layers”) e receptor tirosine kinase (*C-Kit*); bFGF e FGF receptor, no qual ainda é um incógnito sua ação, porém *Fgf3,4,5* e 8 são genes validamente expressos no epiblasto, posterior a linha primitiva e ao longo do mesoderma na rota de migração das PGCs.; e por último o fator de leukemia inibitória (LIF), mundialmente conhecido por promover a sobrevivência e a proliferação *in vitro*, faz-se necessário, pois promove indiferenciação da pluripotencialidade celular em cultura (CHENG et al., 1994; SHAMBLOTT et al., 2009). Porém, as PGCs não só dependem prontamente de fatores de citocinas exógenas ou de fatores de suplementação, apesar de auxiliarem eficazmente, essas células estão em contínua e espontânea diferenciação, o paradigma é tentar sempre enriquecer e purificar a população do cultivo celular, mais especificamente entender sua biologia celular.

A aplicação celular na medicina regenerativa tem avançado em uma larga escala, focando progressivamente para suprir as necessidades específicas de cada paciente. Na ciência reprodutiva, o sucesso do método de cultivo e produção das células germinativas primordiais é essencial para possível transplante e tratamento da infertilidade. Estudos recentes têm demonstrado a formação de espermatozoides e oócito *in vitro* e a partir de células germinativas primordiais (HAYASHI et al., 2011; HAYASHI et al., 2012). Outra característica aliciente é o fato das PGCs serem uma importante fonte de células troncos pluripotentes, por apresentarem semelhança com células tronco embrionárias em níveis moleculares e biológicos (PIROUZ et al., 2012). Além disso as PGCs são as únicas capazes de transmitir o material genético ao longo das gerações, pois serão as precursoras na formação

das gônadas indiferenciadas, apresentando linhagens femininas ou masculinas. Sendo assim as células germinativas primordiais constituem uma importante fonte na medicina reprodutiva regenerativa e no desenvolvimento biológico(PELOSI et al., 2011).

Material e Métodos

4 MATERIAL E MÉTODOS

Todos os experimentos e procedimentos foram realizados estão de acordo com os princípios de ética em investigação animal, aprovado pelo comitê de ética da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, processo USP número: 2012.1.891.74.0

4.1 LABORATÓRIO E COLETA DO MATERIAL

O presente estudo foi realizado no setor de Anatomia dos Animais Domésticos da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo – Campus de Pirassununga/SP. Embriões caninos provenientes de úteros gravídicos de fêmeas sem raça definida (SRD) oriundas de programas de castrações nas clínicas das cidades nos arredores de Pirassununga-SP ou também através de um cadastramento de proprietários interessados em esterectomizar suas cadelas. Clinicamente cadelas sadias apresentando ciclo estral normal, foram colocadas para acasalar no primeiro dia do estro e os embriões foram coletados com 15 a 20 dias após o acasalamento, através de ovário-salpingo-histerectomia eletiva. No total foram castradas 100 fêmeas sem raça definida (SRD), sendo que o número total de embriões utilizados foram de 58. Porém alguns embriões apresentavam mal formação, ocorrendo reabsorção destes nos cornos uterinos infeccionados ou idade inferior aos 15 dias e superior aos 35 dias tornando-se inviável a coleta do material (Tabela 1).

Abaixo segue as metodologias que foram desenvolvidas:

Tabela1 - Dados relacionados a quantidade e número de embriões caninos utilizados e idade gestacional das cadelas

Fêmeas	Número de Embriões	Número de Embriões Utilizados	Idade Gestacional Aproximada
01	02	01	21
02	10	07	32
01	10	03	32
01	07	06	26
04	-----	-----	-----
01	04	-----	45
03	-----	-----	-----
10	12	-----	45
03	04	04	21
01	-----	-----	-----
02	05	03	22
06	08	-----	45
	04	-----	45
01	08	03	22
03	-----	-----	-----
01	09	06	24
01	07	06	25
01	06	05	25
02	04	-----	45
01	06	-----	45
02	14	12	24/ 26
Total	51	56	
Média			28

4.2 CITOLOGIA VAGINAL

As 51 cadelas foram submetidas a um exame clínico geral e a um exame reprodutivo através da inspeção visual de vulva, vagina e palpação das mamas. Foram realizados exames citológicos para identificação da fase do ciclo estral e após a confirmação de estro, houve o acasalamento por monta natural, para futura coleta dos embriões.

Para a verificação do ciclo estral foi realizada o esfregaço vaginal, e as lâminas foram imediatamente fixadas e coradas com coloração rápida Panótico (Laborclin) (Figura 1)., para análise em microscópio óptico das superfícies celulares baseando-se na porcentagem de células encontradas, os critérios adotados foram fundamentos de acordo com Johnston et al. (2001).

Figura 1 - Fotomicrografias de esfregaços vaginais em cadelas, demonstrando as características celulares do ciclo estral. Em **A** Estro células superficiais anucleadas; **B** Proestro células superficiais anucleadas e nucleadas. **C** e **D** Anestro células parabasais e intermediárias

4.3 OBTENÇÃO DOS EMBRIÕES CANINOS

Os embriões foram coletados por método cirúrgico de ovário-salpingo-histerectomia eletiva. Os úteros e os cornos uterinos foram lavados com solução PBS 1X com penicilina/estreptomicina objetivando a retirada de muco ou *debris* celulares. Após este procedimento foram dissecados e incisos os cornos uterinos e as membranas extra-embrionárias foram rebatidas até a exposição e retirada do embrião. Os quais foram analisados e mensurados através das medidas de Crown- Rump (CR) seguindo a metodologia determinada por Evans e Sack (1973).

Com o auxílio de um paquímetro o embrião foi mensurado da distância da cabeça até a última vértebra sacral, este foi fotografado com uma câmara digital Sony Mavica 3.2 MP.

Para a descrição da análise macroscópica e cultivo celular das células germinativas seguiu-se a cronologia do desenvolvimento embrionário e fetal, descrito por Concannon et al. (2001) e Machado, Almeida e Amano(2001).

4.4 PADRONIZAÇÃO DO CULTIVO CELULAR DAS CÉLULAS GERMINATIVAS EMBRIONÁRIAS CANINAS

Em fluxo laminar e sobre condições estéreis seguiu-se o protocolo de isolamento das células-tronco embrionárias germinativas conforme descrito por Martins (2006).

Após a retirada do embrião, na região paramesonéfrica, próximo a região dos somitos entre a porção 20 a 25, foram isoladas e dissociadas a gônada primitiva em formação. Os fragmentos coletados foram lavados em solução de PBS-L(tampão fosfato salino, pH 7.4) e em seguida macerados manualmente (fragmentação mecânica), com auxílio de uma lâmina de bisturi até a obtenção de um macerado de fragmentos do tecido.

Os fragmentos das foram submetidos em meio de cultivo composto por: 96% de DMEM (Sigma cat. # 11966) suplementado com 1% L-Glutamina (Sigma cat. # G7513), 1% aminoácidos não essenciais (Sigma cat. # M-7145), 1% 2-mercaptoethanol (Invitrogen, cat.# 21985-023), 1% antibióticos penicilina/estreptomicina (Invitrogen, cat. # 15140-122). Em seguida o conteúdo foi filtrado em filtro de malhas estéreis (BD-Falcon, cell strainer 22µm nylon, cat. # 352340), colocados em tubo tipo falcon de 50ml e adicionados nas placas de cultivos de 24 poços. Após este procedimento o cultivo celular foi mantido em incubadora de 38,5° C com umidade relativa próxima de 80% e atmosfera gasosa de 5% de CO₂.

Algumas células foram testadas o perfil de crescimento celular sobre a adição de: Monocamadas de fibroblastos (Mefs), e dos suplementos 1ul/ml de LIF (Leukemia inhibitory factor) e 1ul/ml de bFGF (recombinante básico) seguido o protocolo elaborado por Kakegawa et al. (2008), em coelhos.

4.5 CULTIVO, PROPAGAÇÃO E CRIOPRESERVAÇÃO DAS CÉLULAS DE FIBROBLASTO EMBRIONÁRIOS CANINOS

Para o isolamento e cultivo dos fibroblastos fetais caninos, utilizou-se as estruturas cabeça, e membros torácicos e pélvicos. O tecido foi manualmente macerado (fragmentação mecânica) em placas de petri estéreis, com o recurso da lâmina de bisturi e em seguida os fragmentos foram transferidos para a placa de cultivo (100mm) com o meio apropriado composto por: DMEM/Ham's F12 (1:1, LGC Biotecnologia, cat. # 30004-05) suplementado, com 10% de soro fetal bovino (v/v), 1% estreptomicina/penicilina e levados para a estufa numa atmosfera de 5% de CO₂ em ambiente a 38,5°C.

Após a propagação celular, quando atingiram confluência de 80% realizou-se repique celular, todo o meio da placa foi retirado e em seguida foi acrescido de 1-4ml de tripsina a 0,25% (Tryple Express – Gibco) e incubadas durante 5-8 minutos a 38,5°C. Ao atingirem a total desagregação o conteúdo da placa foi transferido para tubos tipo Falcon de 15ml para centrifugação durante 5 minutos a 1500rpm, o sobrenadante foi descartado e o “pellet” ressuspensionado com o meio apropriado e cultivadas sob as mesmas descrições anteriores.

O congelamento iniciou-se pela aspiração do meio existente; após esse processo a garrafa foi tripsinizada (1 a 4ml) e inativada com meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino, as células foram transferidas para tubos de centrífuga tipo Falcon com capacidade de 15ml e centrifugadas a 1.500rpm por 5 minutos. O sobrenadante formado foi retirado e o “pellet” ressuspensionado em meio para congelamento, previamente preparado e distribuído em criotubos. Os criotubos permaneceram alocados em dispositivos próprios para congelamento (Mr.Frosty), no qual permite o congelamento de -1°C por minuto e armazenadas no freezer a -80°C “over night”. Por fim, imersas em nitrogênio líquido, no qual permanecem armazenados por tempo indeterminado, até o seu devido uso.

4.6 - PROPAGAÇÃO EM CULTURA DAS CÉLULAS GERMINATIVAS EMBRIONÁRIAS CANINAS

Quando as células atingiram uma confluência de 80%, todo o meio foi cuidadosamente removido da placa e realizou-se a desagregação das células aderentes manualmente e por remoção enzimática acrescida de Tripisina Express (Tryple Express: Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) ou Colagenase tipo IV 0,1% (Sigma, cat # C2674-100MG). Após a completa desagregação das células todo o conteúdo da placa foi transferido para um tubo tipo eppendorf para a posterior centrifugação durante 5 minutos a 1500 rpm. O sobrenadante foi descartado o “pellet” ressuspensionado em meio de cultivo e posteriormente transferido para a placa de cultivo e mantidas sob as mesmas condições descritas anteriormente.

4.6.1 Criopreservação

A cultura de células germinativas foi centrifugada e o “pellet” celular ressuspensionado em meio de congelamento composto por 80% de meio DMEM (Sigma cat. # 11966), suplementado com 20% de SFB (Invitrogen cat. # 12657-029), 10% de DMSO (Sigma cat. # 34943) e 1% estreptomicina/penicilina, sendo posteriormente distribuídas em criotubos (1ml contendo da solução formada). Os criotubos foram submetidos em dispositivos próprios para congelamento (Mr. Frosty) e transportados para o freezer -80°C, após 24 horas as amostras foram transferidas para um botijão de nitrogênio líquido, onde permaneceram armazenadas a uma temperatura de -196°C por tempo indeterminado.

Para o descongelamento e a determinação da viabilidade celular seguiu-se com a retirada dos criotubos do tambor de nitrogênio líquido e descongelados em temperatura ambiente sob o fluxo laminar. Em seguida as células foram, colocadas em tubos tipo eppendorfs e centrifugadas a 1500 rpm durante cinco minutos o sobrenadante foi descartado, e o “pellet” ressuspensionado em 1 ml de meio de cultivo juntamente com a coloração de Trypan blue (Sigma cat. # 15250-061). A contagem celular foi realizada em câmara de Neubauer 0.1mm (Bright-Line – N.Y. USA), no qual observou-se a porcentagem de células vivas em relação as células senescentes. Após este procedimento as células foram transferidas para

placas de cultivo, com o meio de cultivo celular apropriado e acondicionadas na estufa a 38,5°C com umidade relativa próxima de 100% e atmosfera gasosa de 5% de CO₂.

4.6.2 Monocamadas de fibroblastos embrionários caninos (MEFs)

Para o preparo de monocamadas de fibroblastos caninos (MEFs) utilizou-se células fibroblastoides caninas nas passagens P3/P4, com aproximadamente de seis a oito dias de cultivo. Quando a propagação celular atingiu aproximadamente 50% de confluência, o total meio da placa (100mm) foi aspirado e acrescentou-se a solução de mitomicina C (Sigma cat. # M4287-2MG). Em seguida a placa de cultivo foi incubada por três horas a 38,5°C. Após este período todo o meio da placa foi retirado e transferido para tubos tipo falcon de 15ml para sua posterior centrifugação durante 5 minutos a 1500rpm. O sobrenadante foi descartado e o pellet ressuscitado com o meio apropriado. Para a posterior distribuição do conteúdo celular nas placas de cultivo, realizou-se a contagem celular em câmara de Neubauer 0.1mm (Bright-Line – N.Y. USA) e aplicado a seguinte fórmula:

$$\frac{\text{nº de células contadas} \times \text{volume do "pellet" ressuscitado}}{4}$$

As placas de 24 poços receberam uma proporção de 2×10^5 de células fibroblásticas caninas para a produção das MEFs, em que receberam o meio de cultivo celular apropriado e acondicionadas na estufa a 38,5° C com umidade relativa próxima de 100% e atmosfera gasosa de 5% de CO₂.

4.7 ENSAIOS MICROSCÓPICOS

4.7.1 Microscopia eletrônica de varredura e transmissão

A análise de microscopia eletrônica de varredura das células germinativas embrionárias caninas, foram realizadas com células em sua terceira passagem;

aproximadamente 12 dias de cultivo, provenientes de embriões com idade gestacional aproximada de 22 dias. As células foram fixadas diretamente na placa de cultivo com 2,5% de glutaraldeído durante 2h e posteriormente foi adicionado 2% de ósmio por 2h. Em seguida as placas foram lavadas com água destilada duas vezes por 5 minutos e desidratadas em álcool 70% e 100% por 5 minutos. Transcorrido esse procedimento, as amostras foram submetidas à estufa deixando a seco para a metalização com ouro, e colocadas no metalizador (EMITECH – K 550) para o banho de ouro, para a análise e as eletromicrografias utilizou-se o microscópio eletrônico de varredura (LEO – 435 VP).

As amostras para a transmissão por microscopia eletrônica de transmissão foram desidratadas em etanol, embutido em Epon usando propileno óxido como um intermediário, e seccionadas em secções (2mm), coradas com azul de toluidina para microscopia de luz (LM). Seções selecionadas foram posteriormente preparadas em coletadas em grades de cobre, contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo, e examinadas no aparelho de microscopia eletrônica de transmissão.

4.7.2 Análise histológica

Os embriões caninos entre as idades embrionárias aproximadas 24 á 35 dias de gestação foram dissecados cuidadosamente, fixados em solução de formol tamponado á 10%, pH 7.0. Os embriões foram submetidos á técnica de histologia rotineira assim, o material foi desidratado com séries de álcoois em concentrações crescentes (de 70, 80, 90 e 100%) diafanizado em xilol e incluído em parafina histológica. Os cortes apresentavam 5µm e corados com HE – Hematoxilina-Eosina de Harris .

4.7.3 Imuno-histoquímica

Para a realização do protocolo de imuno-histoquímica futilizaou-se os embriões nos períodos aproximados entre 24 á 35 dias de gestação, os quais foram processados rotineiramente através das técnicas de inclusão em parafina (BEHMER, 1976) e emblocados em planos transversais e horizontais. Em seguida os blocos foram cortados sequencialmente

(3-5 μ m) e colocados em lâminas previamente sinalizadas, (Sigma 3 - aminoproyltriethoxy-silane) com dois cortes por lâmina sendo um para controle negativo. Seguindo o protocolo (VEJSTED et al., 2006). Em seguida as lâminas foram imersas em uma solução de EDTA pH 8.0 á 37°C, durante 30 minutos para a recuperação antigênica. Prosseguiu-se com as lavagens das lâminas em PBS 1x acrescido de Twen (Usb cat. # 20605) 0,3% durante três lavagens de cinco minutos. Após este procedimento foi realizada o bloqueio da peroxidase endógena durante 15 minutos em temperatura ambiente. Novamente ocorreram as lavagens em PBS 1x/Twen três vezes durante cinco minutos. Para o bloqueio de ligação específica usou-se solução de leite a 5%, durante uma hora em temperatura ambiente. As lâminas foram lavadas três vezes em PBS 1X/Twen durante cinco minutos. Depois, retiradas do PBS, o excesso foi retirado com papel absorvente, os cortes foram circundados com caneta histológica para a incubação do anticorpo primário Oct4 rabbit polyclonal diluído á 1:300 (Abcam cat. # 18976).

Nos controles, foi usado IgG rabbit polyclonal (Abcam cat. # 27478) diluído conforme o recomendado pelo data-sheet. As lâminas foram deixadas “over night” (20h) em câmara úmida e fria (5° C).

Após o período recomendado as lâminas foram lavadas três vezes em PBS 1x/ Twen durante cinco minutos. Em seguida os cortes receberam uma gota do Anticorpo secundário (ABC Kit Vectastain- PK-4001) e foram levados para câmara úmida a temperatura ambiente durante 30 minutos. Após esta incubação os cortes foram lavados em PBS 1x/ Twen para serem submetidos à Esprectovidina.(ABC Kit Vectastain- PK-4001) por 30 minutos Após e lavadas novamente com PBS/Twen e para revelação deu-se através da utilização do Kit Dako (K346811-2). Os cortes receberam gotas do revelador e em seguida as lâminas foram lavadas duas vezes em água destilada e uma vez em água corrente circulante por cinco minutos para retirada do excesso do revelador. Os cortes foram corados pela hematoxilina de Harris durante um minuto (coloração de fundo) e lavadas em água corrente durante cinco minutos, seguiu-se a hidratação nos alcoóis 70%, 95%, 100% e no xilol por duas vezes.

Para montagem foi colocada sobre a lâmina uma gota de Permount (Fisherchemicals, cat. # 096403) e sobre esta, uma lamínula. Em seguida os cantos das lamínulas foram limpados e levados à geladeira por 24 horas para secar.

4.7.4 Fosfatase alcalina

As análises com fosfatase alcalina foram realizados com células germinativas embrionárias caninas de embriões com idade aproximada de 24 á 26 dia de gestação. As células foram mantidas em cultivo por aproximadamente 11 dias, no qual realizou os ensaios para sua expressão. Utilizou o kit Detecção da Fosfatase Alcalina Fluorescência (Leukocyte Alkaline Phosphatase Kit, Sigma, cat. # 86R) de acordo com o Data-Sheet do protocolo do fabricante.

5 ANÁLISE MOLECULAR

5.1 ANÁLISE DE CITOMETRIA DE FLUXO

Para a análise de citometria de fluxo foram utilizadas embriões em idade gestacional aproximada de 26 dias e as amostras com aproximadamente 14 (P2) dias de cultivos.

Foi testado o padrão de expressão dos marcadores de superfície e marcador nuclear, abaixo seguiu-se dois protocolos distintos.

- Protocolo de marcador citoplasmático:

As células germinativas embrionárias caninas foram coletadas e separadas mecanicamente com auxílio de pipetas e distribuídas em tubos para citometria de fluxo para cada um dos marcadores a serem analisados. Em cada tubo foi colocado 1 mL de tampão FACS DBPS (Dubelco's Phosphate Buffer Solution) contendo 0,1% de BSA, centrifugadas a 600G por oito minutos para lavagem. As células foram incubadas com o anticorpo primário (diluído a 1:100) por 30 minutos em temperatura ambiente e seguidamente foram lavadas uma vez com 1 mL tampão FACS para a retirada do excesso de anticorpo e incubadas com anticorpo secundário (diluído a 1:300) por 30 min. Posteriormente as células foram lavadas com tampão FACS e fixadas com solução 4% de paraformaldeído tamponado.e as amostras foram analisadas utilizando um citômetro de fluxo contendo dois lasers ("blue e red laser")

Attune (Applied Biosystems). As populações foram estimadas pela porcentagem das células expressando cada um de marcadores em relação ao total de células adquiridas. Para realizar este procedimento foram utilizados um painel de 2 anticorpos primários e 2 anticorpos secundários (Quadros 1 e 2).

- **Protocolo de marcador nuclear:**

Para este protocolo as células utilizadas foram coletadas e separadas mecanicamente com auxílio de pipetas, foram distribuídas em tubos para citometria de fluxo para cada um dos marcadores a serem analisados. Os tubos foram permeabilizados com solução de PBS1X acrescentado com Tween 20%, BSA 0,1% (PBST-BSA) e centrifugados por oito minutos a 600G á 25°C. Seguiu-se com a fixação em Paraformol 0,25% por 10 minutos a 37°C, após este procedimento a amostra foi centrifugada e lavada com PBST-BSA. Seguidamente fez-se a em methanol 88% diluído em 12% de dPBS a -20°C durante 30 minutos, após esse período a amostra foi centrifugada e lavada com PBST-BSA duas vezes em temperatura ambiente. Para a permeabilização do núcleo desnaturou-se o DNA com solução de ácido clorídrico a 2M por 30 minutos. Prosseguiu-se com a neutralização com solução Borate Buffer á 0,1M por cinco minutos, lavou-se em PBST-BSA duas vezes e realizou o bloqueio com PBST-BSA acrescentando 2% de SFB por 20 minutos. As células foram incubadas com os anticorpo primário Oct4 rabbit polyclonal (Abcam cat. # 18976) diluído conforme as instruções do Data-Sheet, por 30 minutos em temperatura ambiente. Após a incubação as células foram lavadas duas vez com PBST-BSA para a retirada do excesso de anticorpo, seguida da incubação com anticorpo secundário (diluído a 1:300) por 30 min, prosseguindo com a lavagem das células com solução PBST-BSA. As amostras foram analisadas utilizando um citômetro de fluxo contendo dois lasers ("blue e red" laser) Attune (Applied Biosystems). As populações foram estimadas pela porcentagem das células expressando cada um de marcadores em relação ao total de células adquiridas. Para realizar este procedimento utilizou-se um painel de 1 anticorpo primário e 1 anticorpo secundário (Quadros 1 e 2).

Quadro 1 - Descrição da natureza e procedência dos anticorpos primários utilizados nas provas moleculares de citometria de fluxo

ANTICORPO	HOST	IMUNOGLOBULINA	MONO/POLICLONAL	EMPRESA
CD34	GOAT	IGG	POLICLONAL	SANTA-CRUZ (SC-7045)

CD117	HUMAM	IGG1	MONOCLONAL	CHEMICON (MAB1162)
OCT4	RABBIT	IGG	POLICLONAL	ABCAM (AB18976)

Quadro 2 -Descrição da natureza e procedência dos anticorpos secundários utilizados nas provas moleculares de citometria de fluxo

ANTICORPO	ESPÉCIE	EMPRESA
ANTI-GOAT IGG	RABBIT	INVITROGEN (11075)
ANTI-MOUSE IGG2A	GOAT	Dako FITC (F0474)
ANTI-RABBIT IGG	GOAT	ALEXA-FLÚOR (488)

5.2 ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA : EXTRAÇÃO E PCR

Análises dos genes expressos foram realizadas com cultivos de embriões caninos em idades gestacionais aproximadas de 22 a 25 dias de gestação. Para a análise de expressão gênica foi estabelecido dois padrões de cultivo celular: uma em cultivo em estados iniciais (com dois dias de cultivo) e a outra com cultivo em passagens mais avançadas (com 15 dias). Todos os cultivos foram realizadas de acordo com o protocolo supracitado anteriormente. As amostras foram submetidas a expressão dos genes relacionados de pluripotencialidade Oct4 e Sox2. Para estes procedimentos desagregaram-se as células das placas através de pipetagem, as quais foram transferidas para tubo tipo ependorf e centrifugadas a 1500rpm. O sobrenadante descartado e novamente as células foram lavadas com PBS 1X para total retirada do meio de cultivo e centrifugadas. Após este procedimento o sobrenadante retirado e o “pellet” armazenado a -80°C até o momento de extração.

O RNA total das amostras foram extraídos utilizando-se o kit Trizol (Invitrogen), tratado com acrilamida linear (Ambion). A quantificação dos ácidos nucleicos e ribonucleicos foi realizada através da leitura em espectrofotômetro Nanodrop.

Após a extração do RNA este foi convertido em cDNA com o Kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems), segundo recomendações do fabricante. A quantificação do cDNA foi realizada utilizando-se a metodologia de PCR quantitativo (qPCR) no equipamento OneStep (Applied Biosystems). Os *primers* utilizados foram desenhados com o programa Primer Express (Applied Biosystems) a partir de seqüências obtidas do banco de

dados do GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov). Os gene Oct4 é essencial para na pluripotencialidade e na reprogramação das células germinativas, enquanto que o Sox2 também possui um papel fundamental na pluripotencialidade.

A quantificação e a eficiência de cada gene foi analisada, e a quantificação de cDNA das amostras foi avaliada utilizando o método $2^{-\Delta\Delta CT}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001), baseado em duplicatas. Abaixo encontram os seguintes pares de “primers” desenhados para os transcritos (Quadro 3).

Quadro 3- Relação dos pares de “primers”, sequência, temperatura para anelamento e tamanho do fragmento aplicado

PRIMER	SEQÜÊNCIA FWD	SEQÜÊNCIA REV
OCT4	CAGGCCCGAAAGAGAAAGC	CGGGCACTGCAGGAACA
SOX2	TGCGAGCGCTGCACAT	TCATGAGCGTCTTGGTTTTCC

5.3 WESTERN BLOTTING

A técnica de Western Blotting foi realizada no cultivo das células germinativas embrionárias caninas de embriões comidades gestacionais próximas entre 22 a 26 dias de gestação. As células germinativas embrionárias caninas permaneceram em cultivo por 15 dias, aonde foram coletadas para o processamento das amostras, foi adicionado tampão de amostra (TRIS-HCL 125 Mm (pH 6,8) contendo 10% Dodecil sulfato de sódio (SDS), 20% de sacarose e 5% de 2-mercaptoetanol) às células. Em um primeiro ensaio, as amostras foram desnaturadas a 100° C por 5 minutos; enquanto que no segundo as amostras foram desnaturadas a 100°C e congeladas em nitrogênio líquido por várias vezes, até completa solubilização das proteínas.

Posteriormente, as amostras foram separadas em um gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 12% em solução de TRIS-HCL, por eletroforese, e transferidas para uma membrana de PVDF (Polyvinylidene difluoride membrane) com o uso do aparelho iBlot (iBlot – seven minute system, Life Technologies, cat. # IB1001) de acordo com recomendações o fabricante. As membranas foram bloqueadas com leite em pó desnatado a 5% em TTBS (Tris-HCL, pH 7,2 1M, com adição de 2% de Tween-20) durante 1h. Em seguida, foram incubadas com o

anticorpo primário anti-Oct4 humano policlonal (Abcam, cat. # 18976) na concentração de 1:1000 diluído em TTBS com 2% leite em pó desnatado. A membrana foi lavada três vezes durante cinco minutos com TTBS e incubada com o anticorpo secundário policlonal anti-IgG de coelho (Cell Signaling cat. # 7074S) diluído 1:2500 por 1h. Após a incubação as membranas foram lavadas três vezes durante cinco minutos com TTBS e reveladas com o Kit de quimiluminescência (GE Healthcare cat.# RPN2132).

Resultados

6 RESULTADOS

6.1 ANÁLISE MACROSCÓPICA E HISTOLÓGIA BÁSICA

Os embriões caninos coletados foram separados das membranas basais e medidas conforme descrito por Evans e Sack (1973). Entretanto, neste estudo as amostras mostraram-se incongruentes com o modelo proposto Crown- Rump (CR), devido alguns embriões apresentarem medidas superiores. Estes demonstraram organogênese em desenvolvimento inicial, por esta razão as idades cronológicas dos embriões foram estabelecidas a partir da descrição dos morfogênese dos órgãos .

Macroscopicamente os embriões com 21 dias de gestação apresentaram em média 0,7cm, formato “C”, três depressões que sugerem os arcos branquiais, uma esfera representando o coração, a linha primitiva que dará origem a notocorda e o saco vitelino longilíneo (Figura 3 A e B).

Embriões em idades gestacionais entre 24 e 25 dias apresentavam 1,02 a 1,04 cm, nesta fase foi possível visualizar os somitos caudais e cranias, os botões dos membros torácicos e pélvicos em formação, sendo que os membros torácicos em maior grau de desenvolvimento e o coração bem evidente (Figura 3 B e C).

Animais com 26 dias de gestação (2cm). Notou-se o início do desenvolvimento dos brotos torácicos e pélvicos. os olhos com início de pigmentação e uma grande conexão do intestino primitivo à membrana vitelínica (Figura 3 E).

Embrião com aproximadamente 32 dias (2,2 cm) .Formação da cabeça visível e vesícula óptica aparente e olhos com pigmentação da retina. Os membros torácicos e pélvicos com a presença dos sulco entre os dígitos, região cefálica proeminente. São visíveis: o coração pulsátil, fígado, intestino primitivo, broto pulmonar e rins primitivos; e grande conexões de vasos com o cordão umbilical (Figura 3 F).

Microscopicamente descrevemos os principais órgãos de cada idade embrionária e para tal dividimos os embriões por idades gestacional. Microscopicamente em embriões de aproximadamente 24 e 26 dias visualizamos o aparecimento das três cavidades encefálicas: mesencéfalo, diencéfalo e miencéfalo (Figura 3A e B (1-4)). A medula espinhal encontrou-se caudalmente aos somitos, o qual formará a coluna vertebral (Figura 3A e B(17)).

Em relação aos órgãos, o sistema cardiovascular, esta dividido em duas câmaras, atrial e ventricular que diferem pela forma e espessura da parede. Observamos que a cavidade atrial encontra-se disposta cranialmente a câmara ventricular.e apresenta divisões em seu interior, enquanto que a ventricular encontra-se em um arranjo mais definido e denso (Figura 3A e B (9.1 e 9.2)). Visualizamos a formação do broto pulmonar e do broto secundário, que se expande no sentido caudal ao sistema cardiovascular alongando-se longitudinalmente (Figura 3A e B(13 e 13.1)).

O sistema digestório e urogenital mostraram grandes diferenças em relação as idades embrionárias; o embrião de aproximadamente 24 dias apresenta estômago primitivo (Figura 3A (15)), fígado como um brotamento do tubo intestinal (Figura 3A (14)). Enquanto, que no embrião de 26 dias o intestino primitivo apresentava a formação da luz intestinal (Figura 3B (15) e localizava-se caudalmente ao fígado, sendo este maior quando comparado com o embrião anterior. (Figura 3B (15)).

O rim primitivo, denominado de glomérulos mesonefros, inicia-se na região medial do embrião e prolonga-se em direção a cauda. Este possui inúmeras formações tubulares, como ductos e os tubulos mesonéfricos (Figura 3A (16)). No embrião de aproximadamente 26 dias notamos a presença do metanefro e os mesonefros modificados (Figura 3A (16)).

O embrião de 32 e 35 dias, visualizamos um aumento da massa encefálica preenchendo as cavidades, o aparecimento de três cavidades encefálicas: mesencéfalo, diéncéfalo e miencéfalo (Figura 4A e B (1-4)). Nestas idades a medula espinhal e os somitos são facilmente identificados, pois estão quase formados (Figura 4A e B (16)) e no embrião de 32 dias notamos a formação da vesícula óptica (Figura 4A (2)) como um sulco raso e a vesícula telencéfala (Figura 4A (3)).

O embrião de 32 dias microscopicamente, no sistema cardiaco evidenciamos o começo da separação do ventriculo direito do esquerdo e a aorta (Figura 4A e B (9.1 e 9.2)); no sistema respiratório ocorre a comunicação do broto pulmonar com o processo aritenóide da laringe. Evidenciamos os brotos do brônquios principais (Figura 4A e B (10)) e notamos o intestino primitivo, com seus compartimentos gástricos (Figura ?B (12)) e o fígado embrionário (Figura ?B (11)). Enquanto, que no embrião de aproximadamente 35 dias de gestação encontramos o fígado, como o maior órgão presente neste, visualizando a veia porta (Figura ?B (11 e 11.1)).

No sistema urogenital do embrião de 32 dias notamos a divisão do metanefro e mesonefro para a formação da gônada primitiva; destacamos a formação de inumeros túbulos e dos cordões testiculares (Figura 4A (13 e 14)). Contudo, no embrião de 35 dias

visualizamos a total separação do mesonefro e a formação da gônada primitiva (Figura 4B (13 e 15)).

Figura 2 -Fotomicrografias de embriões caninos.

Legenda: **A e B** evidenciamos um embrião de aproximadamente 21 dias de gestação, nota-se a presença dos arcos branquiais (círculos), coração (co), linha primitiva (seta) e o saco vitelino (sv). Em **C e D** evidenciamos embrião de aproximadamente 25 e 24 dias de gestação, observa-se a curvatura em forma de “c”, botões dos membros cilíndricos (círculos), coração (co) e seus anexos placentários (seta). Em **E** evidenciamos o embrião de aproximadamente entre 26 dias de gestação, observa-se o início da formação dos membros pélvicos (mp) e torácicos (mt), olhos quase pigmentados (círculos) e intestino primitivo (ip) em conexão com a membrana vitelínica (seta). Em **F** embrião de aproximadamente 32 dias, observa-se sulco entre os dígitos (seta) olhos pigmentados com o início da formação das pálpebras (círculo) e conexões dos vasos com o cordão umbilical (cu).

Figura 3- Fotomicrografias de cortes longitudinais de embriões caninos de 24 (A) e 26 (B) dias de idade

Legenda: Evidenciamos em ambos os cortes a evolução das estruturas de acordo com a idades, em 1. cavidade do diencéfalo; 2.tubérculo posterior; 3. cavidade do mesencéfalo; 4. cavidade do miencéfalo; 5. língua; 6. arco mandibular; 7. processo aritenóide da laringe; 8. traqueia; 9. camaras cardíacas, 9.1 cavidade atrial, 9.2 ventrículo; 13. broto pulmonar secundário, 13.1 broto pulmonar; 14. fígado; 15. intestino primitivo; 16. mesonefro; 17. somito; 18. celoma extra-embriônico. coloração.HE

Figura 4 - Fotomicrografias de cortes longitudinais de embriões caninos de 32 (A) e 35 (B) dias de idade

Legenda: Evidenciamos em ambos os cortes a evolução das estruturas de acordo com a idade, em 1 a cavidade do diencéfalo; 2. vesícula óptica; 3. vesícula telencefálica; 4. cavidade do mesencéfalo; 5. cavidade do miencéfalo; 6. língua; 7. arco mandibular; 8. esboço da narina; 9. camaras cardíacas, 9.1 cavidade atrial, 9.2 ventrículo; 10. broto pulmonar; 11. fígado, 11.1 veia porta; 12. intestino primitivo; 13. mesonefro; 14. metanéfro; 15. gônada primitiva.; 16. somito coloração HE

6.2 CULTIVO CELULAR: ISOLAMENTO E ESTABELECIMENTO DAS CÉLULAS GERMINATIVAS EMBRIONÁRIAS CANINAS

Os resultados da derivação das células germinativas embrionárias foram realizados conforme a idade gestacional, através da medida de Crown-rump e também pela a cronologia do desenvolvimento embrionário e fetal. Inicialmente após a coleta, os envoltórios fetais foram removidos restando apenas o embrião. Em seguida procedeu-se com a micro-dissecação do embrião na região paramesonéfrica, onde as células germinativas encontram-se em migração para a formação da gônada indiferenciada.

O cultivo inicial foi monitorado a cada 24 horas, no qual visualizamos grande proliferação celular ao redor dos fragmentos, uma grande proporção apresentou aderência nas placas de cultivos e outras continuam em suspensão com aglomerados celulares ao redor do fragmento celular (Figura 5A e B). Sendo que após 72h, 80% das células permaneceram aderentes com uma morfologia celular arredondada e com grandes formações de colônias e após 10 dias de cultivo estavam no auge na proliferação celular(Figura 5C-F).

A troca de meio de cultura procedeu-se somente por retirada e reposição de 1500ul do meio nas placas de cultivo. Quando as células atingiam 80%de confluência (+/-72h) realizou-se a passagem celular prosseguindo pela total desagregação mecânica das células através da pipeta, os métodos de desagregação enzimático por tripsina ou collagenase foram testados, porém não foi viável para este tipo celular, pois ambas metodologias induziram a degeneração celular.

A formação de culturas primárias com embriões em idade gestacional entre 15 e 21 diasapresentaram sugestiva morte celular após 10 dias de cultivo. No entanto, culturas com embriões em idades gestacionais aproximadas 24, 25 e 26 dias após, 72h desenvolveram-se e multiplicaram-se formando numerosas e compactas colônias com proliferação ativa, podemos evidenciar características morfológicas típicas as germinativas primordiais, aderentes a superfície de cultivo, com descrição arredondada e pequena, essas células mantiveram-se viáveis por um período aproximado de 15 dias. Após este, período visualizamos a apoptose celular, pois as células apresentavam tamanhos reduzidos e citoplasma enegrecidos (Figura 6 A- F).

O meio de cultivo usado juntamente com os seus suplementos influenciou em grande parte a sobrevivência e a proliferação celular a longo prazo das células germinativas caninas. Observamos que quando adicionado ao cultivo as monocamadas de fibroblasto juntamente

com os suplementos bFGF e fator de Leukemia Inibitoria (LIF) aumentou consideravelmente a quantidade celular e o número de colônias formadas, mantendo as células indiferenciadas. Outro elemento adicionado ao meio de cultivo, que proporcionou um efeito benéfico, quando adicionado em pequena quantidade, foi o antioxidante 2 mercaptoetanol, pois visualizamos um melhor desenvolvimento celular (Figura 7A- F).

Figura 5 - Fotomicrografias das células germinativas caninas.

Legenda: Em **A** células cultivadas em 24h horas, notar presença de fragmentos e células mononucleares indiferencia dispersas (seta). Em **B** colônias celulares movimentando-se livremente pela placa de cultivo, com aproximadamente 2 dias de cultivo (48h). Em **C** e **D** células com aproximadamente três dias cultivo (72h), destaque células aderentes e com morfologia arredondada (setas). Em **E** e **F** células com aproximadamente 10 dias de cultivo.

Figura 6 - Fotomicrografias das células germinativas caninas.

Legenda: Em **A** e **B** células obtidas com embrião de aproximadamente 24 dias de gestação. Nota-se em **A** presença de células livre(p0), enquanto que em **B** elucida a presença de formação de colônias (p4) em **C** e **D** células obtidas com embrião de aproximadamente 25 dias de gestação; visualiza-se em **C** a presença de fragemento e células monucleares indiferenciadas desprendendo-se (seta)(p0) e em **D** células aderidas a placa de cultivo (p4). Em **E** e **F** células obtidas com embrião de aproximadamente 26 dias de gestação; observa-se em **E** a formação de colônias e células ao seu redor(p0); **F** células e colônias movimentando livremente pela placas(p4).

Figura 7 - Fotomicrografias das células germinativas embrionárias caninas de embriões com idade gestacional aproximada de 25 dias

Legenda: Em **A** e **B** destacamos a proliferação celular através da adição do suplemento bFGF, em **C** e **D** visualizamos a expansão celular através da adição de LIF e em **E** e **F** demostramos a formação de colônias e sua proliferação sob a monocamada de fibroblastos juntamente com a adição de bFGF e LIF (setas).

6.3 CRIOPRESERVAÇÃO

Após o descongelamento celular as células foram contadas na câmera de Neubauer e a porcentagem de células viáveis foi determinada pela coloração com Azul de Tripán (Sigma cat.# 15250-061), dos quais podem-se evidenciar pouquíssimas células viáveis (2×10^4). O resultado após o descongelamento não foi significativo, pois as células não mantiveram as mesmas características das células anteriormente cultivadas no momento do congelamento (Figura 7).

Figura 8 - Fotomicrografias das células germinativas embrionárias caninas após o descongelamento

Legenda: Evidenciamos em **A** pouca quantidade celular após o descongelamento, células com aproximadamente 2 dias após a criopreservação e em **B** depois de 4 dias de cultivo, nota-se grande quantidade celular fragmentada e sobrenadantes.

6.4 CULTIVO, PROPAGAÇÃO E CRIOPRESERVAÇÃO DE FIBROBLASTO EMBRIONÁRIOS CANINOS

A produção dos fibroblastos caninos deu-se de forma satisfatória e eficiente. O cultivo foi monitorado a cada 24h, onde as células apresentaram intensas atividades confluindo com 80% em 48h de cultivo. Assim, as células foram tripsinizadas e recultivadas em várias passagens para analisar seu comportamento fenotípico, as quais apresentavam-se aderentes as placas de cultivos e morfologicamente possuíam citoplasma abundante com muitos prolongamentos e seu núcleo bastante evidente, com formato ovóide (Figura 8).

Agregações celulares foram comumente vistas indicando ótimo processo celular. Após o descongelamento as células fibroblastoides mostraram-se 100% viáveis, através da contagem em câmara de Neubauer e pela coloração de Azul de Tripán (Sigma cat.# 15250-061), indicando que as células apresentavam as mesmas características de cultivo no momento anterior.

Figura9- Fotomicrografias de células fibroblásticas caninas obtidas de embriões com aproximadamente 30 dias de gestação

Legenda: **A** e **B** evidenciam os prolongamentos celulares característicos e o núcleo evidente deste tipo celular (setas). em **C** nota-se o aumento da proliferação celular. Células com aproximadamente 8 dias de cultivo em sua segunda passagem.

6.5 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO E VARREDURA

Para as análises realizadas através do microscópio eletrônico de transmissão e de varredura foram utilizados embriões com idade gestacional aproximada de entre 24 dias em sua terceira passagem, aproximadamente 12 dias de cultivo. O meio de cultura não se encontrava com a adição de MEFs e nem com os suplementos bFGF e LIF.

Observamos no microscópio eletrônico de varredura tamanhos variados de células, nas quais apresentavam pequenos grupos celulares aderentes uma às outras realizando ligações entre umas e outros tipos celulares, formando múltiplas colônias (Figura 10).

Através da técnica de microscopia eletrônica de transmissão pode-se evidenciar diversas populações celulares, mas revelou-se uma população de células morfologicamente redondas com um núcleo proeminente e irregular, envolvido pelo nucleolo ampliado, com alguns granulos dispersos. O citoplasma mostrou-se bem desenvolvido, muitas vezes fragmentados em seu interior. Em relação as organelas encontradas, foi possível visualizar:

ampla quantidade de mitocôndrias com aspectos esféricos e alongados distribuídas ao longo do citoplasma; a presença do retículo endoplasmático com aparência de vesículas achatadas empilhadas; lisossomos agregadas ao retículo endoplasmático e grande quantidade de vesículas (Figura 10).

Figura 10- Microscopia eletrônica de varredura e transmissão das células germinativas embrionárias caninas

Legenda: **A** vista do formato arredondado das PGCs caninas; em **B** e **C** nota-se pequenos agrupamentos celulares, formando comunicações entre elas (setas). Observar em **D** vista das células PGCs com seu formato arredondado; e núcleo das células com formato irregular; **F** observa-se grande quantidade de mitocôndrias com formato esférico; **G** visualizamos muitas vesículas (v), lisossomos (l) e **H** nota-se grande quantidade de vesículas(v), retículo endoplasmático rugoso(rer), lisossomos (l), mitocôndrias (m).

6.6 ANÁLISE IMUNOHISTOQUÍMICA

A análise imunohistoquímica foi conduzida para avaliar a expressão do marcador Oct4 associado a pluripotencialidade e as células germinativas embrionárias caninas. Visualizamos a reação imuno-positividade nuclear e citoplásmica nos órgãos que compõe o sistema urogenital dos embriões com idades gestacionais aproximadas 24, 32 e 35 dias.

Nos embriões de 24 e 32 dias a imunomarcção ocorreu nos glomérulo mesonéfrico, principalmente no cordão epitelial dos túbulos mesonéfricos e nas capsulas glomerulares, da qual irá formar as cristas genitais (Figura 11 A-B, D-E e G-H). Enquanto que no embrião de 35 notamos a imunopositividade na gônada primitiva e no cordão que liga ao mesonefro (Figura 11 C, F e I).

Figura 11 - Fotomicrografias de cortes longitudinais de embrião canino de aproximadamente 24, 32 e 35 dias de gestação

Legenda: **A, D, e G** observamos os glomérulo mesonéfrico e células germinativas primordiais imunopositivas para oct4,(setas); Em **B, E e H**, fotomicrografiafia de cortes longitudinais de embrião canino de aproximadamente 32 dias de gestação. observa-se em **B** mesonefro em separação para a formação da gônada primitiva (seta fina) e o metanéfro (seta grossa); em **E e H** maior aumento a gônada primitiva em formação e as células germinativas primordiais imunopositivas para oct4 (setas).. Em **C, F e I**, fotomicrografiafia de cortes longitudinais de embrião canino de aproximadamente 35 dias de gestação. observa-se em **C** a gônada primitiva imunopositiva para oct4 (seta) e **F e I** células germinativas primordiais imunopositivas para oct4 (setas).

6.7 FOSFATASE ALCALINA

Visualizamos positividade para o marcador em questão nas colônias celulares coradas em avermelhados, as quais expressaram fortemente atividade para fosfatase alcalina. A técnica de coloração por fosfatase alcalina foi conduzida para avaliar a expressão de marcador associado as células germinativas embrionárias caninas e sua pluripotencialidade (Figura 12).

Figura 12 - Fotomicrografias das colônias derivadas das células germinativas embrionárias caninas com 15 dias de cultivo

Legenda: Nota-se em **A**, **B**, **C** e **D** a reação positiva para a atividade de fosfatase alcalina.

6.8 CITOMETRIA DE FLUXO

Ao realizar a análise de citometria de fluxo da expressão dos marcadores Oct4, CD34 e C-Kit (CD117) nos cultivos com os embriões 1, 2 e 3 demonstrou grandes diferenças de marcação mesmo sendo essas amostras de idades aproximadas iguais, da mesma gestação e do mesmo tempo de cultivo. O marcador Oct4 demonstrou valores não significativos. Para ambos os embriões., enquanto que o marcador de membrana CD34, C-Kit (CD117) obtiveram diferenças de expressão(Figura 13).

Figura 13 -Histograma da imunofenotipagem por citometria de fluxo, embrião com gestação aproximada de 26 dias de idade e com 14 dias de cultivo

Legenda: Observe-se no embrião 1 e 2 expressão positiva para os marcadores CD34, C-Kit, Oct4; enquanto que para o embrião 3 somente a expressão de CD34.

6.9 ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA : EXTRAÇÃO E PCR

Utilizando os fibroblastos embrionários caninos como células calibradora, encontramos nas células germinativas embrionárias caninas expressão do gene Oct4 e SOX2.

Observamos que o embrião de aproximadamente 21 dias de gestação e 20 dias de cultivo obteve maior índice expresso para ambos os genes. O embrião de idade gestacional aproximada de 23 dias e com 10 dias de cultivo teve também expressão para os dois genes. Enquanto que o embrião de aproximadamente 25 dias de gestação com dois dias de cultivo houve baixa expressão de Oct4, quando comparado com o gene SOX2, contudo aos 15 dias de cultivo ambos as expressões dos genes foram similares (Figura 14).

Figura 14 - Gráficos representando a expressão de Oct4 e SOX2 em linhagens germinativas embrionárias caninas

7 WESTERN BLOTTING

Identificamos no cultivo de células germinativas embrionárias caninas a expressão da proteína específica transcrita pelo gene Oct4. Quando não foi realizada a solubilização das proteínas (ensaio 1) identificamos a formação de uma banda específica com aproximadamente 64 kDa, e duas bandas acessórias com aproximadamente 85 kDa e 26 kDa, respectivamente (Figura 15). Com a solubilização das proteínas das amostras (ensaio 2) obtivemos duas bandas na região entre 60 kDa e 50 kDa, o que corresponderia as duas isoformas da proteína Oct4 (Figura 15).

Figura 15- Análises por western blotting com células germinativas embrionárias caninas com aproximadamente 15 dias de cultivo

Legenda: No ensaio 1, visualizamos uma banda 64 k da e duas bandas acessórias com de 85 k da e 26 k da sem solubilização da proteína e no ensaio 2 destacamos duas bandas na região entre 60 kda e 50 kda, com solubilidade da proteína.

Discussão

8 DISCUSSÃO

Baseado nos conhecimentos descrito até o momento, as células germinativas primordiais surgem a partir do epiblasto; essas células migraram e diferenciam em uma estrutura destinada a ser a gônada indiferenciada ou primitiva. Neste presente estudo reportamos o desenvolvimento do cultivo das PGCs nos estágios antes e durante a formação das gônadas primitivas, aproximadamente entre os estágios 21 à 32 dias de gestação.

Os resultados histológicos descreveram que a morfogênese e a organogênese do desenvolvimento embrionário em cães com idade aproximada de 24 á 35 dias de gestação apresentaram desenvolvimento dos órgãos do sistema respiratório, digestivos e urogenital, segundo descrito os descritos por Machado, Almeida e Amano (2001), Concannon, Tsutsui e Shille (2001). Entretanto nossos resultados descrevem que a partir de 24 dias de idade ocorre a presença dos ductos e túbulos mesonéfricos o qual dará, origem as gônadas primitivas e ao rim, contrapondo os resultados descritos por Martins (2006), em que verificou a presença da gônada e do rim partir de 23 dias de idade.em cães.

Obteve-se sucesso no cultivo das células fibroblásticas de embriões caninos para a produção de monocamadas fibroblásticas (MEFs). Os fibroblastos sintetizam as proteínas colágeno e elastina, além das glicosaminoglicanas, proteoglicanas e glico-proteínas multiadesivas, das quais fazem parte da membrana celular (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004). Por estas razões este tipo celular é comumente utilizado em cultivos celulares na produção de monocamadas celulares (MEFs) e também na reprogramação celular, pois está envolvido na produção de fatores de crescimento, que controlam o crescimento e a diferenciação celular (KOH et al.,2012).

De acordo com os nossos resultados seguindo o protocolo descrito por Martins (2006), obtivemos sucesso no isolamento, cultivo e propagação das célulasgerminativas embrionárias caninas com embriões superiores a idade gestacional de 24 dias, diferentemente da literatura proposta por Felici e McLaren (1982) não utilizamos os métodos enzimáticos devido ao baixo rendimento celular quando utilizada esta técnica. Características similares as observadas foram descritas em cultivos de células blastocísticas caninas por Hatoya et al. (2005).

Segundo Shambloott et al.(2009) e Mc Laren e Lopes (2003) para o sucesso do cultivo das PGCs requerem suplementos e fatores que auxiliam em seu desenvolvimento e proliferação. Portanto como estabelecido em cultivos com camundongos por Runian et al.

(2006), Matsui, ZSsebo e Hogan 1992) e Resnick et al. (1992) condições particulares foram testadas para a co-cultura, onde foram utilizados as MEFs (monocamadas de fibroblastos, inativadas com mitomicina C), com adição do LIF e bFGF. No experimento realizado primeiro demonstramos a adição ao meio de cultivo somente com o fator bFGF, de acordo com os nossos resultados este suplemento promoveu a proliferação e a intensa formação de colônias. Isto foi muito bem reportado nos cultivos com em coelhos por Kakegawa et al. (2008) e em camundongos por Resnick et al. (1998) em que o bFGF estimula a proliferação das células e a multiplicação dos tecidos, tendo um importante papel na reprogramação e proliferação das PGCs. Entretanto quando adicionado somente o LIF, observamos que as células permaneceram por um período maior de cultivo, promovendo sua sobrevivência e indiferenciação igualmente sugerido em cultivos com camundongos por Hara et al. (1998) e Cheng et al. (1994). O LIF é essencial para manter a pluripotencialidade reduzindo os níveis de apoptose, em que permite a renovação da célula. Este suplemento permite a renovação celular, pois aumenta os níveis de CAMP intracelular estimulando o ciclo adimilato da proteína Kinase A, promovendo a auto-renovação (DE FELECI et al., 1993; DOLCI et al., 1993). Todavia quando combinado estes três elementos MEFs, bFGF, LIF mais o antioxidante 2 Mercaptoetanol foi visualizado tanto a formação de colônias quanto a melhor proliferação e desenvolvimento celular, valores similares também foi reportado em camundongos por Durcova-Hills, Hustin e McLaren (2001); e em suínos por Lee e Piedrahita (2000).

A microscopia eletrônica de varredura revelou imagens das superfícies celulares das PGCscaninas em que apresentaram conexões celulares entre uma célula a outra, o qual explica a não desagregação das colônias quando realizadas as passagens celulares pelo processo de pipetagem. Igualmente sugerido na cultura com embriões de mini-porcos Yucatam por Petkov et al. (2011). De acordo com as características celulares descritas em nossos resultados perante a análises de microscopia eletrônica de transmissão, sugerimos que as células germinativas embrionárias caninas mostraram uma morfologia típica de apoptose. Segundo Pesce e De Felici (1994), quando as células apresentam apoptose o nucléolo é ampliado e granuloso, o citoplasma começa a condensar e se fragmentar, enquanto ocorre a aglomeração das organelas e o aumento vacúolos.

Somente a organela mitocondrial permanece intacta. De acordo Pesce et al. (1993) e Miething (1992) é comum a apoptose das células germinativas primordiais, pois a extensão deste processo parece estar ligada estritamente ao processo de diferenciação celular e também quando cultivadas na ausência de monocamadas fibroblásticas e fatores de crescimento.

Nossos resultados, revelaram a expressão positiva para o marcador Oct4, em uma pequena população nas células do cordão epitelial dos túbulos mesonéfricos este padrão de imuno-positividade condizem com os resultados obtidos em cães por Martins et al. (2011), em humanos por McKay et al. (1953). A restrita imuno-positividade ao Oct4, é devido as células germinativas primordiais migrarem ao longo de uma faixa para atingirem sua localização final. Ou seja, estas células estão em continua diferenciação, a qual diminui a expressão do Oct4 conforme o amadurecimento celular. Niwa et al. (2000) e Pesce et al. (1998) relatam que este padrão de marcação é comumente expresso, pois o anticorpo Oct4 é usado como um regulador chave para células pluripotentes, sendo que após a gastrulação do embrião é expresso para as células germinativas primordiais, diminuindo sua expressão durante a diferenciação celular (em oogenese e espermatogenese) e restringindo-se depois sua expressão em oócitos.

Os resultados de imunohistoquímica demonstram nas células germinativas embrionárias caninas o padrão de marcação do anticorpo Oct4 nuclear e citoplasmático. Assim como descrito por Warthemann et al. (2012) com células obtidas do estroma testicular em macaco-sagui (*C. jacchus*) e por Morini (2009) com células cubóides dos túbulos ou ductos mesonéfricos do sistema urogenital de embriões de búfalos, o qual somente apresentou a marcação citoplasmática. Estes achados sustentam as hipóteses de que a proteína Oct4, podem também ser expressa no citoplasma.

Diante disto, realizamos os alinhamentos das sequências de mRNA de Oct4 das variantes do gene humano e canino (Anexo A), o qual revelou uma grande homologia entre a espécie canina e humana, principalmente no fragmento entre os aminoácidos 1 a 14, que corresponde ao epítipo reconhecido pelo anticorpo policlonal anti-Oct4 utilizado. Ambas isoformas (Oct4A – nuclear, e Oct4B - citoplasmática) puderam ser identificadas nos nossos resultados de imunohistoquímica, assim como Chin et al. (2009) e Warthemann et al. (2012).

Para reconfirmação dos resultados, foi realizada análise de Western Blotting, em cultivos de células germinativas embrionárias caninas e novamente as duas isoformas de Oct4 foram identificadas, corroborando com Chin et al. (2009) e Warthemann et al. (2012).

A realização, ou não, de solubilização das proteínas antes do Western Blotting, alterou o peso molecular das bandas, específicas, apresentadas nos dois ensaios. Isto pode ser explicado, pelo fato de modificações pós-translacionais da proteína Oct4 alterarem o peso molecular da mesma, além do processo de solubilização reverter tais modificações. Entre estes mecanismos pós-translacionais pode-se citar a fosforilação (Saxe et al.,

2009), ubiquitinação (WEI et al., 2007), sumolização (ZHANG et al., 2007) e acetilação (CAI et al., 2012).

A expressão do gene Oct4 e SOX2, regulador chave para pluripotencialidade, foi detectado nos cultivos das células germinativas embrionárias caninas, corroborando com os nossos resultados pela técnica de Western Blotting. Portanto esta análise demonstra que este tipo celular é pluripotente e potencialmente corresponde a linhagem germinativa. Sugerimos que a sua baixa expressão em cultivo inicial (aproximadamente dois dias) pode ser devido a cultura ser heterogênea. Portanto em cultivo, quando adicionados fatores de crescimento principalmente LIF este promoveu um aumento da população das células germinativas mantendo uma cultura mais homogênea e um estado mais indiferenciado (CHENG et al., 1994). O perfil de expressão de Oct4 e SOX2 foi semelhante, pois eles são heterodímeros, atuando na regulação de vários genes relacionados a pluripotência (BOYER et al., 2005).

Os ensaios de Citometria de Fluxo revelaram elevada expressão para os marcadores de membrana CD34 e C-kit. Ambos os marcadores são comumente expressos em células hematopoiéticas e em medula óssea (TÁRNOK; ULRICH; BOCSI, 2010). Assim marcação significativa destes marcadores pode ser devido a falta de uma purificação das células germinativas embrionárias caninas, pois coletamos próximo a região da linha primitiva onde encontra-se a medula óssea fontes de células hematopoiéticas (RICH, 1995). Através dos nossos resultados podemos observar que houve valores não significativos para o marcador Oct4 nas células. A explicação pode residir no fato de que as células germinativas embrionárias caninas encontravam-se em estados de diferenciação celular e também pelo cultivo possuir pouca quantidade de célula. De acordo com Ovitt e Schöler (1998), a expressão de Oct4 diminui conforme o desenvolvimento celular, sua baixa expressão pode estar associada a um aumento no processo de metilação e nas mudanças na estrutura da cromatina. Quanto a ausência de expressão dos marcadores C-Kit e Oct4 no embrião 3 pode ter ocorrido devido a origem da coleta das amostras ser proveniente de campanhas de castração, aonde se desconhece a data exata da concepção e também a possibilidade dos embriões possuírem origem paterna distintas.

A expressão dos ensaios realizados com o Kit Fosfatase Alcalina demonstrou elevada marcação para as colônias das células germinativas. Fosfatase Alcalina é comumente usado para marcar células pluripotentes e possui um importante papel na identificação das células germinativas primordiais durante a sua migração até seu estabelecimento na formação das gônadas primitivas (MacGREGOR et al., 1995; YABUTA et al., 2006). A semelhança dos achados reportados neste estudo condizem aos publicados em várias pesquisas descrevendo a

expressão nas colônias de células germinativas embrionárias (SHAMBLOTT et al., 1998; KÜHHOLZER et al., 1999; LIU et al., 2004; KAKEGAWA et al., 2008; LEDDA et al., 2010; PETKOV et al., 2010).

Conclusões

9 CONCLUSÕES

As células germinativas constituem um fascinante processo em sua biologia celular. Elas representam a classe de células responsáveis pela perpetuação da espécie, através da sua reprogramação celular. Portanto, assim com o material ora encaminhado e os métodos e as técnicas empregadas até o momento, permitimos as seguintes conclusões:

- O protocolo seguido para o isolamento e cultura de células germinativas caninas procedeu-se de forma satisfatória;
- Através da histologia básica foi possível visualizar o desenvolvimento embrionário canino, em que aproximadamente ao 24º dia de idade gestacional apresentam os glomérulos mesonéfricos. Diferentemente do que encontrado com embriões de aproximadamente 35 dias, no qual obtinha total formação da gônada primitiva;
- A produção de fibroblastos embrionários caninos procedeu-se de forma bastante eficiente para a produção das MEFs;
- Para a propagação em cultivo das células germinativas embrionárias caninas são necessários a adição de suplementos como: LIF e bFGF, incluindo a monocamada de fibroblastos (MEFs);
- Em cultura foi observada a formação de colônias e células mononucleares indiferenciadas;
- Esta linhagem celular reage ao marcador Oct4 através das análises de Imunohistoquímica e Western Blotting;
- Através das análises de PCR obteve-se a expressão de pluripotencialidade do gene Oct4 e SOX2;

- As análises de citometria de fluxo apresentaram expressão significativa para o marcador CD34 e C-Kit e expressão não significativa para Oct4;
- As colônias das PGCs caninas apresentaram marcação positiva para a coloração Fosfatase Alcalina;
- Pela técnica de microscopia eletrônica de varredura e transmissão foi observado tamanhos variados entre as células aderidas umas as outras, mostrando um núcleo e nucléolo evidente e granuloso. Citoplasma fragmentado e diversos tipos de organelas celulares, principalmente mitocôndrias;
- Porém estas células possuem capacidade restrita de propagação celular, sendo difícil manter em cultivo por longos períodos;

O presente estudo incrementa o nosso conhecimento em relação a origem e o potencial das células germinativas caninas. Todavia, ocorre a necessidade de maiores estudos para um melhor entendimento dos mecanismos que mantêm a pluripotencialidade e a diferenciação celular, pois ainda são grandemente inexplorados para este tipo celular.

Referências

REFERÊNCIAS

- ARCE, S. R. A.; MOSQUEDA, M. L. J.; GAONA, H. V.; MAS, M. C. R.; CORTES, M. A. C.; RIOS, M. A. M. Qué son las células troncales o “células madre. **Veterinária México**, V. 38, n. 1, p. 81-104, 2007.
- BAKSH, D.; SONG, L.; TUAN, R. S. Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v.8, n. 3, p. 301-316, 2004.
- BEHMER, O. A.; TOLOSA, E. M. C.; NETO, A. G. F. **Manual de técnicas para histologia normal e patológica**. São Paulo: Edart, 1976.
- BOYER, L. A.; LEE, T. I.; COLE, M. F.; JOHNSTONE, S. E.; LEVINE, S. S.; ZUCKER, J. P.; GUENTHER, M. G.; KUMAR, R. M.; MURRAY, H. L.; JENNER, R. G.; GIFFORD, D. K.; MELTON, D. A.; JAENISCH, R.; YOUNG, R. A. Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. **Cell**, City, v. 122, n. 6, p. 947-956, 2005.
- BREVINI, T. A. L.; TOSETTI, V.; CRESTAN, M.; ANTONINI, S.; GANDOLFI, F. Derivation and characterization of pluripotent cell lines from pig embryos of different origins. **Theriogenology**, v. 67, p. 54-63, 2007.
- CAI, N.; LI, M.; QU, J.; LIU, G.H. Post-translational modulation of pluripotency. **Journal of Molecular Cell Biology**, v.4, p.1-4, 2012.
- CAUFFMAN, G.; VAN DE VELDE, H.; LIEBAERS, I.; VAN STEIRTEGHEM, A. Oct-4 mRNA and protein expression during human preimplantation development. **Molecular Human Reproduction**, v.11, p.173–181, 2005.
- CHENG, L.; GEARING D. P.; WHITE, L. S.; COMPTON D. L.; SCHOOLEY, K. Role of leukemia inhibitory factor and its receptor in mouse primordial germ cell growth. **Development**, v.12, p. 3145-3153, 1994.
- CHIN, H-J.; SHIWAKU, H.; GODA, O.; KOMURO, A.; OKAZAWA, H. Neural stem cells express Oct-3/4. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 388, p.247–251, 2009.
- CHRISTIANSEN, I. B. J. **Reprodução no cão e no gato**. São Paulo: Manole, 1988. 362p.
- CONCANNON, P.; TSUTSUI, T.; SHILLE, V. Embryo development, hormonal requirements and maternal responses during canine pregnancy. **Journal. Reproduction. Fertil.** Suppl, título da revista por extenso v. 57, 169-179, 2001.
- CRITTENDEN, S. L; KIMBLE, J. Analysis of the C.elegans Germline stem cell region. In: HOU, S.X.; SINGH, S.R. **Germline Stem Cells**. 2008. cap.2, p.27-44..
- CHIUQUINE, A. D. The identification, origin, and migration of the primordial germ cells in the mouse embryo. **The Anatomical Record**, v.118, p. 135-146, 1954.

CHOINACKA-PUCHTA, L.; KASPERCZYK, K.; PLUCIENNICZAK, G.; SAWICKA, D.; BEDNARCZYK, M. Primordial germ cells (PGCs) as a tool for creating transgenic chickens. **Polish Journal of Veterinary Sciences**, v.15, n. 1, p. 181-188, 2012.

DE FELECCI, M.; DOLCI, S.; PESCE, M. Proliferation of mouse primordial germ cells in vitro: a Key role for a cAMP. **Development . Biological**, v.157, p.277-280, 1993.

DE FELECI, M.; McLAREN, A. Isolation of mouse primordial germ cells. **Experimental. Cell Research**, título da revista por extenso v.142, p.476-482, 1982.

DIXON, K. E. Evolutionary aspects of primordial germ cell formation. **Ciba Foundation Symposium**, v. 182, p. 92-119, 1994.

DOLCI, S.; PESCE, M.; DE FELECCI, M. Combined action of stem cell factor, leukemia inhibitory factor, and cAMP in vitro, proliferation of mouse primordial germ cells. **Molecular. Reproduction. Development**, v.35, p.134-139, 1993.

DOSS, M. X.; KOEHLER, C. I.; GISSEL, C.; HESCHELER, J.; SACHINIDIS, A. Embryonic stem cells: a promising tool for cell replacement therapy. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 8, n. 4, p. 465-473, 2004.

DURCOVA-HILLS, G.; HUSTIN, F.X.; McLAREN, A.A. Pluripotent stem cells derived from migrating primordial germ cells. **Differentiation**, v. 68, p.220–226, 2001.

EVANS, H.; SACH, W. O Prenatal development of domestic and laboratory mammals: growth curves, external features and selected references. **Anatomy Histology and Embryology**, v.2, p.11-45, 1973.

FRIEDENSTEIN, A. J.; GORSKAJA, J. F.; KALAJINA, N. N. Fibroblast precursor in normal end irradiated mouse hematopoietic organs. **Experimental Hematology**, v. 4, p. 267-274, 1974.

FUJIMOTO, T.; MIYAYAMA, T.; FUJITA, M. The origin, migration and fine morphology of human primordial germ cells. **The Anatomical Record**, v. 188, p. 315-330, 1977.

GEARHART, J. New potential for human embryonic stem cells. **Science**, v. 282, p. 1061-1062, 1998.

GINSBURG, M.; SONW, M. H. L.; McLAREN, A. A primordial germ cell in the mouse embryo during gastrulation. **Development**, v. 110. p. 521-528, 1990.

HARA, T.; TAMURA, K.; De MIGUEL, M.P.; MUKOUYAMA, Y.; KIM, H.; KOGO, H.; DONOVAN, P.J.; MIYAJIMA, A. Distinct roles of oncostatin M and leukemia inhibitory factor in the development of primordial germ cells and sertoli in mice. **Development. Biological**, v.201, p.144-153, 1998.

HATOYA, S.; TORII, R.; KONDO, Y.; OKUNO, T.; KOBAYASHI, K.; WIJEWARDANA, V.; KAWATE, N.; TAMADA, H.; SAWADA, T.; KUMAGAI, D.; SUGIURA, K.; INABA,

T. Isolation and characterization of embryonic stem-like cells from canine blastocysts. **Molecular Reproduction and Development**, v. 73, p. 298-305, 2006.

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 Express**, v.10, p.01-05, 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. 519-532, 2012.

HAYES, B.; FAGERLIE, S. R.; RAMAKRISHNAN, A.; BARAN, S.; HARKEY, M.; GRAF, L.; BAR, M.; BENDORAITE, A.; TEWARI, M.; STORB-TOROK, B. Derivation, Characterization, and In Vitro Differentiation of Canine Embryonic Stem Cells. **Embryonic Stem Cells**, v. 26, p. 465-473, 2008.

HYTEL, P.; SINOWATZ, F.; VEJLSTED, M. **Essentials of domestic animal embryology**. Oxford: Elsevier Limited, 2010. cap.4, p. 32-55.

HWANG, W. S.; RYU, Y. J.; PARK, J. H.; PARK, E. S.; LEE, E. G.; KOO, J. M.; JEON, H. Y.; Lee, B. C.; KANG, S. K.; KIM, S. J.; AHN, C.; HWANG, J. H.; PARK, K. Y.; CIBELLI, J. B.; MOON, S. Y. Evidence of a Pluripotent Human Embryonic Stem Cell Line Derived from a Cloned Blastocyst. **Science**, v. 303, p. 1669-1674, 2006.

JOHNSON, J.; SKAZNIK-WIKIEL, M.; LEE, H. J.; NIKURA, Y.; TILLY, J. C.; TILLY, J. L. Setting the Record Straight on Data Supporting Postnatal Oogenesis in Female Mammals. **Cell Cycle**, v. 4, n. 11, p. 1471-1477, 2005.

JUNG, J. G.; LEE, Y. M.; PARK, T. S.; PARK, S. H.; LIM, J. M.; HAN, J. Y. Identification, culture, and characterization of germline stem cell-like cells in chicken testes. **Biology of Reproduction**, v. 76, p. 173-182, 2006.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 388p.

KAKEGAWA, R.; TERAMURA, T.; TAKEHARA, T.; ANZAI, M.; MITITANI, T.; MASTSUMOTO, K.; SAEKI, K.; SAGAWA, N.; FUKUDA, K.; HOSOI, Y. Isolation and culture of rabbit primordial germ cells. **The Journal of Reproduction and Development**, v. 54, n. 5, p. 352-357, 2008.

KERKIS, A.; SOUKOIAN, M.; KERKIS, I.; MERKEL, C.; MELLO, M. R. B.; PEREIRA, L. V. Células tronco-embrionárias e a geração de modelos animais para doenças genéticas humanas. **Biociência**, v.20, p. 20-25, 2001.

KIM, J. N.; LEE, Y. M.; PARK, T. S.; JUNG, J. G.; CHO, B. W.; LIM, J. M.; HAN, J. Y. Detection and characterization of primordial germ cells in pheasant (*Phasianus colchicus*) embryos. **Theriogenology**, v. 63, p. 1038-1049, 2005.

KOH, S.; THOMAS, R.; TSAI, S.; BISCHOFF, S.; LIM, J.H.; BREEN, M.; OLBY, N.J.; PIEDRAHITA, J. Growth requirements and chromosomal instability of induced pluripotent stem cells (iPSC) generated from adult canine fibroblasts. **Stem Cells Development**, v.00, n.00, p.1-13, 2012.

KÖHHOLZER, B.; BAGUISSII, A.; OVERSTROM, E. W. Long-term culture and characterization of goat primordial germ cells. **Theriogenology**, v. 53, p. 1071-1079, 1999.

KUIJK, E. W.; LOPES, S. M. C. S.; GEIJSEN, N.; MACKLON, N.; ROELEN, B. A. J. The different shades of mammalian pluripotent stem cells. **Human Reproduction Update**, v. 17, n. 2, p. 254-257, 2010.

KURILO, L. F. Oogenesis in antenatal development in man. **Human Genetics**, v. 57, p. 86-92, 1981.

LAWSON, K. A.; DUNN, N. R.; ROELEN, B. A. J.; ZEINSTRA L.; DAVIS, A. M.; WRIGHT C. V. E.; KORVING J. P. W. F. M.; HOGAN B. L. M. Bmp4 is required for the generation of primordial germ cells in the mouse embryo. **Genes & Development**, v. 13, p. 424-436, 1999.

LEDDA, S.; BOGLIOLO, L.; BEBBERE, D.; ARIU, F.; PIRINO, S. Characterization, isolation and culture of primordial germ cells in domestic animals: recent progress and insights from the ovine species. **Theriogenology**, v. 74, p. 534-543, 2010.

LEE, J.; KIM, H.K.; RHO, J.Y.; HAN, Y.M.; KIM, J. The human OCT-4 isoforms differ in their ability to confer selfrenewal. **Journal Biological Chemical**, v.281, p. 33554–33565, 2006.

LEE, C-K.; PIEDRAHITA, J. Effects of Growth Factors and Feeder Cells on Porcine Primordial Germ Cells In Vitro. **Cloning**, v.2, p. 197-205, 2000.

LIU, S.; LIU, H.; PAN, Y.; TANG, S.; XIONG, J.; HUI, N.; WANG, S.; QI Z.; LI, L. Human embryonic germ cells isolation from early stages of post-implantation embryos. **Cell Tissues Res**, v.318, p.525-531, 2004.

LIVIAK, K.J.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2 (Delta Delta C(T) Method. **Methods**, v.25, n.4, p.402-408, 2001.

MacGREGOR, G. R.; ZAMBROWICZ, B. P.; SORIANO P. Tissue non-specific alkaline phosphatase is expressed in the both embryonic and extraembryonic lineages during mouse embryogenesis but is not required for migration of primordial germ cells. **Development**, v. 121, p. 1487-1496, 1995.

MARSHAK, D. R.; GARDNER, R. L.; GOTTLIEB, D. **Stem Cell Biology**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cap. 9, 2001.

MACHADO, C. C.; ALMEIDA, C. A. S.; AMANO, C. N. **Desenvolvimento embrionário e Fetal em cães**. 2003. Disponível em: <<http://www.fmvz.unesp.br/sony/Carol.pdf>>. Acesso em: 10 out. 2011.

MANOVA, K.; BACHVAROVA, R. Expression of c-kit Encoded at the W Locus of Mice in Developing Embryonic Germ Cells and Presumptive Melanoblasts. **Developmental Biology**, v. 146, p. 312-324, 1991.

MARTIN, G. R. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 78, n. 12, p. 7634-7638, 1981.

MARTINS, D. S. **Caracterização de célula-tronco germinativa caninas para o tratamento da distrofia muscular do Golden Retriever (GRMD)**. 2006. 94 f. Tese. (Doutorado) –Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual de São Paulo (FMVZ-USP). 2006.

MARTINS, D.S.; AMBRÓSIO, C.E.; SARAIVA, N.Z.; WENCESLAU, C.V.; MORINI, A.C.; KERKIS, I.; GARCIA, J.M.; MIGLINO, M.A. early development and putative primordial germ cells characterization in dogs. **Reproduction Domestic Animal**, v.46, p.c62-c66, 2011.

MATSUI, Y.; ZSEBO, K.; HOGAN, B.L. Derivation of Pluripotential embryonic stem cell from murine primordial germ cell culture. **Cell**, v.70, p.841-847, 1992.

McGEADY, T. A.; QUINN, P. J.; FITZPATRICK, E. S.; RYAN M. T. **Veterinary embryology**. Oxford: Blackwell Publishing, 2006. 377p.

McKAY, D.G.; HERTIG, A.T.; ADAMS, E.C.; DANZIGER, S. Histochemical observation on the germ cells of human embryos. **The Anatomical Record**, v.117, p.201–219, 1953.

McLAREN A. The fate of germ cells in the testis of fetal sexreversed mice. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.61, p.461–467, 1981.

McLAREN, A. Primordial germ cell in the mouse. **Development Biology**, v. 262, p. 1-15, 2003.

McLAREN, A.; LOPES, S. M. C. S. Primordial Germ cells in Mouse and Human. In: LANZA, R. **Essentials of stem cell biology**. San Diego: Elsevier, 2009. cap.14.

McBEATH, R.; PIRONE, D. M.; NELSON, C. M.; BHADRIRAJU, K.; CHEN, C. S. Cell shape, cytoskeletal tension, and RhoA regulate stem cell lineage commitment. **Developmental Cell**, v.6, p. 483-495, 2004.

MIETHING, A. Germ-cell death during spermatogenesis in the testis of the golden hamster. **Cell Tissue Research**, v. 267, p.583-590, 1992.

MIGLINO, M.A.; AMBROSIO, C.E.; MARTINS, D.S.; WENCESLAU, C.V.; PFARRER, C.; LEISER, C. The carnivore pregnancy: the development of the embryo and fetal membranes. **Theriogenology**, v. 66, n. 6-7, p. 1699-702, 2006.

MOISE, N.S. Inherited arrhythmias in the dog: Potential experimental models of cardiac disease. **Cardiovascular Research**, v. 44, p. 37-46, 1999.

MOORE, K. L.; PERSAUD, T. V. N. **Embriologia básica**. 6. ed. São Paulo: Elsevier, 2004. 462 p.

MORINI, C.A. Desenvolvimento embrionário em búfalos (*Bublaus bublais* Linnaeus, 1758). 2009. 179 f. Tese (Doutorado) Faculdade de Medicina e Veterinária, Universidade de São Paulo (FMVZ-USP).2009.

MOTTA, P.; MAKABE, S.; NOTTOLA, S. The ultrastructure of human reproduction. I. The natural history of the female germ cell: origin, migration and differentiation inside the developing ovary. **Human Reproduction Update**, v.3, p.281–295, 1997.

NICHOLS, J.; ZEVNIK, B.; ANASTASSIADIS K.; NIWA, H.; KLEWE-NEBENIUS, D.; CHAMBERS, I.; SCHÖLER, H.; SMITH, A. Formation of Pluripotent Stem Cells in the Mammalian Embryo Depends on the POU Transcription Factor Oct4. **Cell**, v.95, p.379-391, 1998.

NIWA, H.; MIYAZAKI, J-ICHI.; SMITH, A. G. Quantitative expression of Oct3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. **Nature Genetics**, v.24, p.372-376, 2000.

NODEN, D. M.; LAHUNTA, A. **Embriologia de los animals domésticos: mecanismos de desarrollo y malformaciones**. Zaragoza: Acribia.1990. cap.1, p. 11-25.

ODORICO, J. S.; KAUFMAN, D.; THOMSON, J. Multilineage differentiation from human embryonic stem cell lines. **Stem Cell**, v.19, p. 193-204, 2001.

ORLIC, D.; KAJSTURA, J.; CHIMENTI, S.; LIMANA, F.; JAKONIUK, I.; QUAINI, F.; GINARD, B. N.; BODINE, D. M.; LERI, A.; ANVERSA, P. Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 18, p. 10344–10349, 2001.

OVITT, C.E.; SCHÖLER, H.R. The molecular biology of Oct-4 in the early mouse embryo. **Molecular Human Reproduction**, v.4, p.1021-1031, 1998.

OZDZENSKI, W. Fate of primordial germ cells in the transplanted hind gut of mouse embryos. **Journal of Embryology and Experimental Morphology**, v.22, p.505-510, 1969.

PARDO, V. M. R. Células Madre: Conceptos Generales y Perspectivas de Investigación. **Universitas Scientiarum**, v.10, n. 1, p. 5-14, 2005.

PEARCE, A. I.; RICHARDS, R. G.; MILZ, S.; SCHNEIDER, E.; PEARCE, S. G. Animals models for implant biomaterial research in bone: a Review. **European Cells and Materials**, v.13, p.1-10, 2007.

PELOSI, E.; FORABOSCO, A.; SCHLESSINGER, D. Germ cell formation from embryonic stem cell and the use somatic cell nuclei in oocytes. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1221, p. 18-26, 2011.

PERA, M. F.; REUBINOFF, J.; TROUNSON, A. Human Embryonic Stem Cells. **Journal of Cell Science**, v.113, p. 5-10, 2000.

PESCE, M.; FARRACE, M.G.; DOLCI, S.;PIACENTINI, M.; DE FELICI, M.S.Stem cell factor and leukemia inhibitory factor promote primordialgerm cell survival by suppressing programmed cell death (apoptosis). **Development**, v.118, p.1089-1094, 1993.

PESCE, M.; DE FELECI, M. Apoptosis in mouse primordial germ cells: a study by transmission and scanning electron microscope. **Anatomy and Embryology**, v.189, p.435-440, 1994.

PESCE, M.; SCHÖLER, H. R. Oct-4: control of totipotency and germline determination. **Molecular Reproduction and Development**, v. 55, n. 4, p. 452-457, 2000.

PESCE, M.; WANG, X.; WOLGEUTH D. J.; SCHÖLER, H. Differential expression of the Oct-4 transcription factor during mouse germ cell differentiation. **Mechanisms of Development**, v. 71, p. 89-98, 1998.

PETKOV, S. G.; MARKS, H.; KLEIN, T.; GARCIA, R. S.; GAO, Y.; STUNNENBERG, H. H.; HYTTEL, P. In vitro culture and characterization of putative porcine embryonic germ cells derived from domestic breeds and Yucatan mini pig embryos at Days 20–24 of gestation. **Stem Cell Research**, v. 6, n. 3, p. 226-237, 2011.

PIROUZ, M.; KLIMKE, A.; KESSEL, M. The reciprocal relationship between primordial germ cells and pluripotent stem cells. **Journal of Molecular Medicine**, v. 90, n. 7, p. 753-61, 2012.

PONDER, K. P. Gene therapy for hemophilia. **Current Opinion in Hematology**, v. 13, p. 301-307, 2006.

RAZ. E. Primordial germ-cell development: The Zebrafish Perspective. **Nature Reviews Genetics**, v.4, p.690-700, 2003.

RESNICK, J.L.; BIXLER, L.S.; CHENG, L.; DONOVAN, P.J. Long-term proliferation of mouse primordial germ cells in culture. **Nature**, v.359, p.550-551, 1992.

RESNICK, J.L.; ORTIZ, M.; KELLER, J.R.; DONOVAN, P.J. Role of fibroblast growth factors and their receptors in mouse primordial germ cell growth. **Biological Reproduction**, v.59, p.1224-1229, 1998.

RICH, I. Primordial Germ cells are capable of producing cells of thehematopoietic system in vitro.**Blood**, v.86,n. 2,p.463-472, 1995.

SANTOS, H. S. L.; AZOUBEL, R. **Embriologia comparada: texto e atlas**. Jaboticabal: FUNEP, 1996. 189 p.

- SAITOU, M.; YAMAJI, M. Primordial Germ Cell Mice. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v.4, p. 1-19, 2012.
- SAITO, S.; UGAI, H.; SAWAI, K.; YAMANATO, Y.; MINAMIHASHI, A.; KUROSAKA, K.; KOBAYASHI, Y.; MURATA, T.; OBATA Y.; YOKOYAMA, K. Isolation of embryonic stem-like cells from equine blastocysts and their differentiation in vitro. **Federation of European Biochemical Societies Letters**, v. 531, p. 389-396, 2002.
- SAXE, J.P.; TOMILIN, A.; SCHOLER, H.R.; PLATH, K.; HUANG, J. Post-Translational regulation of Oct4 Transcriptional Activity. **PloS ONE**, v.4, p.4467, f2009.
- SEMB, H. Human embryonic stem cells: origin, properties and applications. **Acta Pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica**, v.113, p. 743-50, 2005.
- SHAMBLLOT, M. J.; AXELMAN, J.; WANG, S.; BUGG, E. M.; LITTLEFIELD, J. W.; DONOVAN, P.; BLUMENTHAL, P.; HUGGINS, G.; GEARHART, J. Derivation of Pluripotent Stem Cells from Cultured Primordial Germ Cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, p. 13726-13731, 1998.
- SHAMBLOTT, M.; KERR, L.C.; AXELMAN, J.; LITTLEFIELD, W.J.; CLARK, O.G.; PATTERSON, E.S.; ASSIS, C.R.; KRASZEWSKI, N.J.; KENT, C.K.; GEARHART, D.J. Derivation and differentiation of human embryonic germ cell. In: CARLSON, B.M. Stem Cell Anthology. San Diego: Elsevier. cap. 8, 2009.
- SMITH, A.G. Embryo-derived stem cells: of mice and men. **Annual Review off Cell and Developmental Biology**, v.17, p. 435–462, 2001.
- STURM, R. A.; HERR, W. The POU domain is a bipartite DNA-binding structure. **Nature**, v. 336, n. 6199, p.601-604, 1988.
- TARNOK, A.; ULRICH, H.; BOCSI, J. Phenotypes of stem cells from diverse origin. **Cytometry A**, v. 77, n. 1, p. 6-10, 2010.
- VERFAILLIE, C. M.; PERA, A.; LANSDORP, P. M. Stem cells: hype and reality. **Hematology American Society of Hematology Education Program**, p. 369-387, 2002.
- VEJSTED, M.; OFFENBERG, H.; MADDOX-HYTTEL, P. Identification of primordial germ cells in porcine embryos from the primitive streak stage. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 18, n. 1-2, p. 7-11, 2006.
- WAGERS, A. J.; WEISSMAN, I. L. Plasticity of adult stem cells. **Cell**, v.116, p. 639-648, 2004.
- WANG, L.; DUAN, E.; SUNG, L.; JEONG, B. S.; YANG, X.; TIAN, X. C. Generation and Characterization of Pluripotent Stem Cells from Cloned Bovine Embryos. **Biology of Reproduction**, v. 73, p. 149-155, 2005.
- WANG, N.; TILLY J. Epigenetic status determines germ cell meiotic commitment in embryonic and postnatal mammalian gonads. **Cell Cycle**, v. 9, 2, p.339-349, 2010.

WARTHEMANN, R.; EILDERMANN, K.; DEBOWSKI, K.; BEHR, R. False-positive antibody signals for the pluripotency factor OCT4A (POU5F1) in testis-derived cells may lead to erroneous data and misinterpretations. **Molecular Human Reproduction**, v. 18, n. 12 p.605-612, 2012.

WEI, F.; SCHOLER, H.R.; ATCHISON, M. Sumoylation of Oct4 Enhances Its Stability, DNA Binding, and Transactivation. **The Journal of Biological Chemistry**, v.282, p.21551-21560, 2007.

WEISSMAN, I. L. Translating stem and progenitor cell biology to the clinic: barriers and opportunities. **Science**, v.287, p. 1442-1446, 2000.

WENCESLAU, C. V. **Análise de células mesenquimais de saco vitelino, fígado e medula óssea de fetos caninos**. 2009. 198p., Dissertação (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009

WHITWORTH, D. J.; OVCHINNIKOV, D. A.; WOLVETANG, E. J. Generation and Characterization of LIF-dependent Canine Induced Pluripotent Stem cells from Adult Dermal Fibroblasts. **Stem Cells and Development**, v.21, p. 2288-2297, 2012.

ZHANG, Z.; LIAO, B.; XU, M.; JIN, Y. Post-translational modification of POU domain transcription factor Oct4 by SUMO-1. **The FASEB Journal**, v.21, p.3042-3051, 2007.

YABUTA, Y.; KURIMOTO, K.; OHINATA Y.; SEKI, Y.; SAITOU, M. Gene Expression Dynamics During Germline Specification in Mice Identified by Quantitative Single-Cell Gene Expression Profiling. **Biology of Reproduction**, v.75, p. 705-716, 2006.

YU, X.; JIN, G.; YIN, X.; CHO, S.; JEON, J.; LEE, S.; KONG, I. Isolation and Characterization of Embryonic Stem-Like Cells Derived From In Vivo-Produced Cat Blastocysts. **Molecular Reproduction and Development**, v. 75, p. 1426–1432, 2008.

ANEXO A

Anexo 1 Alinhamento das sequências das proteínas do Oct4 humano X Canino