ALINE FERNANDA DE SOUZA

Epigenética da reprogramação em células germinativas embrionárias caninas

São Paulo

2017

ALINE FERNANDA DE SOUZA

Epigenética da reprogramação em células germinativas embrionárias caninas

VERSÃO CORRIGIDA

Tese 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 Doutor em Ciências.

Departamento:

Cirurgia

Área de Concentração:

Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientador:

Profª. Drª. Daniele dos Santos Martins

CoOrientador:

Prof. Dr. Felipe Perecin

De acordo: _____

Orientador

São Paulo
2017

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. 3451
FMVZ

Souza, Aline Fernanda de
Epigenética da reprogramação em células germinativas embrionárias caninas. / Aline Fernanda de Souza. -- 2017.
129 f. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2017.

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.

Co-orientador: Prof. Dr. Felipe Perecin.

1. Células germinativas primordiais (CGPs). 2. Células germinativas embrionárias (CGEs). 3. Epigenética. 4. Cão. I. Título.

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "EPIGENÉTICA DA REPROGRAMAÇÃO EM CÉLULAS GERMINATIVAS EMBRIONÁRIAS CANINAS", protocolada sob o CEUA nº 7043240215, sob a responsabilidade de **Daniele dos Santos Martins** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 23/11/2016.

We certify that the proposal "EPIGENETIC REPROMAMMING IN THE CANINE EMBRYONIC GERM CELLS", utilizing 20 Dogs (20 females), protocol number CEUA 7043240215, under the responsibility of **Daniele dos Santos Martins** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 11/23/2016.

Finalidade da Proposta: Pesquisa

Vigência da Proposta: de 08/2013 a 02/2017 Área: Anatomia dos Animais Domésticos E Silvestres

Origem:	Animais provenientes de campanha						
Espécie:	Cães	sexo:	Fêmeas	idade:	1 a 5 anos	N:	20
Linhagem:	SRD			Peso:	10 a 30 kg		

Resumo: A reprogramação epigenética é fundamental para a regulação do genoma durante o desenvolvimento das células germinativas, responsáveis por originar a linhagem gametogênica nos mamíferos. A desmetilação em células germinativas primordiais é um evento único, essencial para apagar a memória epigenética e também prevenir transmissões de epimutações para a próxima geração. Há poucas informações sobre quão conservados são estes eventos em mamíferos, principalmente em canídeos. O cão doméstico (Canis lúpus familiaris) apresenta-se como um modelo ideal para o estudo do desenvolvimento em mamíferos por possuir inúmeras similaridades com a bioquímica e fisiologia dos humanos. Portanto, objetiva-se nesta proposta estudar a dinâmica epigenética nas células germinativas embrionárias desde seu desenvolvimento inicial até a migração e formação da crista genital através das análises dos padrões de metilação de DNA de histonas. Para tal, em uma primeira etapa foi realizada a derivação de possíveis células germinativas embrionárias caninas nos períodos de 24 a 30 dias de gestação. O cultivo in vitro destas células foi acompanhado, sendo realizadas caracterizações morfológicas, imunofenotípicas, marcações específicas de células germinativas e de viabilidade celular. Sendo constatada a janela temporal na qual as possíveis células germinativas foram derivadas e cultivadas com sucesso, análises epigenéticas de metilação de DNA e de histonas foram conduzidas para a caracterização da reprogramação epigenética tempo-dependente na espécie canina. Espera-se que ao final deste estudo os mecanismos que compreendem a reprogramação das células germinativas caninas sejam melhor elucidados, levando a uma maior compreensão sobre possíveis biotécnicas a serem utilizadas na espécie canina.

Local do experimento: Os experimentos serão realizados na Faculdade de Engenharia de Alimentos e Zootecnia (FZEA), USP, Campus Pirassununga.

São Paulo, 23 de novembro de 2016

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais

Roseli da Costa Gomes
Secretaria Executiva da Comissão de Ética no Uso de Animais

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

Processo USP: "Epigenética da reprogramação em células germinativas embrionárias caninas"

Projeto: 13.1.1729.74.2

Esta Comissão solicita e compromete-se a manter total sigilo do conteúdo sobre a solicitação enviada e parecer gerado.

Pelo Comitê de Ética:

☒ **Referendada a aprovação.**

☐ **Não aprovado.**

☐ **Considerado em PENDÊNCIA até esclarecimentos dos pontos levantados.**

☐ **Retirado de pauta.**

Pirassununga, 20 de junho de 2013.

Notifique-se o interessado.

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

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: SOUZA, Aline Fernanda de

Título: Epigenética da reprogramação em células germinativas embrionárias caninas

Tese 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 a obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Data:____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr._____

Instituição:_____ Julgamento:_____

Prof. Dr._____

Instituição:_____ Julgamento:_____

Prof. Dr._____

Instituição:_____ Julgamento:_____

Prof. Dr._____

Instituição:_____ Julgamento:_____

Prof. Dr._____

Instituição:_____ Julgamento:_____

DEDICATÓRIA

Dedico esta pesquisa a minha família, por todo o apoio, carinho, amor e paciência.

Ao meu amigo e companheiro Gerson Antônio de Oliveria Junior.

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

AGRADECIMENTO

Ao longo destes quatro anos de doutorado, muitas pessoas passaram pela minha vida, e, de cada uma, pude "pegar" um pedacinho do conhecimento e da sabedoria. Por isso, agradeço a todas (professores, pós docs, alunos de mestrado e doutorado, técnicos, auxiliares estagiários, alunos de graduação, equipe de limpeza...) que me transmitiram ensinamentos e que me aconselharam a todo momento que precisei.

Agradecimentos especiais a:

A minha fé na existência de um ser supremo que me rege, ouve minhas orações e me dá forças e esperanças a cada novo dia.

À FAPESP, pelo apoio financeiro concedido durante todo período para o desenvolvimento do projeto e pela oportunidade de estágio no exterior, BEPE (Processo: 2013/10542-5- Processo: 2014/26761-0).

À CNPQ, pelo apoio financeiro concedido aos primeiros quatro meses do desenvolvimento do projeto.

A Profª.Dra. Daniele dos Santos Martins (Dani), por ter me acolhido, aconselhado e apoiado minhas decisões em todas as horas do doutorado. Obrigada por toda a confiança que depositou em mim e me dado a liberdade de administrar o laboratório e as pesquisas do modo que eu julgava adequado. Impossível não agradecer o suporte durante meu estágio no exterior e minhas crises de desespero de voltar ao Brasil. Obrigada também pelos momentos de descontração e das conversas não cientificas no lanche da tarde.

Ao Prof.Dr. Carlos Eduardo Ambrósio (Caju) por toda a ajuda durante o doutorado e me auxiliado com o estágio ao exterior. Obrigado também pelo constante ensinamento e ajuda sempre que necessário.

Ao Prof.Dr. Felipe Perecin por ter me aceitado o convite de ser meu co-orientador.

A Prof.Dr. Susana Chuva de Sousa Lopes por ter me acolhido durante o BEPE, ter tido paciência durante todos esses períodos e me ensinado sobre células germinativas. Obrigada por ter tido a oportunidade de sentar ao seu lado durante as coletas do laboratório e me ensinado a ter o pensamento crítico de um pesquisador. Não posso esquecer de agradecer

também aos dias de "lab-out" e minha primeira vez de ice skating em que pude demostrar o meu talento nato (rsrs).

Ao Prof.Dr. Flávio Meirelles pela ajuda de ceder seu laboratório, bem como pela a ajuda ao meu estágio com a profª. Susana.

À Juliana Barbosa Casals, pela ajuda essencial, pela extraordinária dedicação em me fornecer material para a pesquisa e, acima de tudo, agradeço pela sua confiança que, ao longo desse tempo, tornou-se numa amizade verdadeira e leal.

Às minhas grandes amigas e companheiras Kelly, Arina (Nina) e Naira, por me acompanharem nos momentos de desespero, delírio e por terem mais que paciência em todo o processo de construção deste trabalho e, é claro, ao Fabio (Cury) que não pode ser deixado de fora.

À Dr. Fabiana (Martini) por sempre estar disposta a ouvir, ajudar e auxiliar em minha pesquisa mesmo não sendo sua orientada. Obrigada por todo o ensinamento e credibilidade em meu projeto.

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

A todos os meus amigos de pós-graduação do GDTI, LIFE, LMMD-FZEA, que, ao longo destes dois anos posso considerá-los como amigos de coração, em especial a Ana Mançanares, Vanessa, Natália, Alessandra, Ingrid, Jéssica, Valéria (Val), Lidia, Gabriela Mamede, Juliano Sangali, Fernanda, Ramón, Hugo e Laís.

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

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

Ao pessoal de pós-graduação de São Paulo, em especial as meninas Jéssica, Lara e Carla por "passearmos" de ônibus até o Embu das artes para a coleta de material e também por toda a hospitalidade em receber em suas casas.

Obrigada as meninas Maria Fernandes, Mônika Bialecka e a Nannan He por toda a paciência com minha dificuldade de comunicação na língua estrangeira, pelos os ensinamentos e pelas as horas de folga em que podíamos colocar a conversa em dia.

Ao meu companheiro, mineiro Gerson e a minha família 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 os amigos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização desta tese e pelo apoio moral que sempre me concederam.

“A persistência é o menor caminho para o êxito”

(Charles Chaplin)

RESUMO

SOUZA, A. F. de. **Epigenética da reprogramação em células germinativas embrionárias caninas** [Epigenetic reprogramming in canine embryonic germ cells]. 2016. N°128. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

As células germinativas primordiais (CGPs) são as precursoras dos gametas, capazes de gerar um novo indivíduo os quais transmitirão os materiais genéticos para as futuras gerações. Normalmente, a linha germinal de mamífero é determinada por fatores genéticos e epigenéticos que possuem funções essenciais para guiar na direção e desenvolvimento das CGPs, bem como das células germinativas embrionárias (CGEs). A reprogramação epigenética é fundamental para a regulação do genoma durante o desenvolvimento das células germinativas responsáveis por originar a linhagem gametogênica nos mamíferos. A metilação e desmetilação em CGPs são um evento único, essencial para apagar a memória epigenética e também prevenir transmissões de epimutações para a próxima geração. Assim, o completo entendimento das vias e mecanismos para a migração inicial e diferenciação destas células em CGEs podem ser importantes para identificar e corrigir falhas possíveis nesses processos, o que será importante, no futuro, para o desenvolvimento e desempenho reprodutivo. A maioria dos estudos com CGPs e CGEs é realizado em camundongos, porém nem sempre esta espécie torna-se o melhor modelo de estudo quando se quer transpor esses conhecimentos a humanos. O cão doméstico (*Canis lúpus familiaris)* apresenta-se como um modelo ideal para o estudo do desenvolvimento em mamíferos, pois possui inúmeras similaridades com a bioquímica, fisiologia e genética. Deste modo, torna-se interessante expandir os estudos sobre as CGPs e CGEs na espécie canina, a fim de mostrar a importância de diferentes modelos que se assemelham a seres humanos. Portanto, objetiva-se, nesta proposta, identificar qual é a dinâmica de marcadores pluripotentes, germinativos e epigenéticos que são importantes para o desenvolvimento das CGPs e CGEs caninas. Para tal procedimento, essa pesquisa foi dividida em duas fases: a primeira, consiste no processo *in vivo,* desde o desenvolvimento inicial do embrião até a completa formação da crista gônadal. Análises de RTq-PCR e imunofluorescência para marcadores pluripotentes POU5F1 (OCT4) e NANOG, germinativos DDX4 (VASA), DAZL e DPPA3 (STELLA) e epigenéticos 5mC, 5hmC, H3K27me3 e H3K9me2 foram realizados para criar um perfil de genes que são importantes para o desenvolvimento das CGPs caninas. Prosseguiu-se para a segunda fase *in vitro,* que incide na derivação e caracterização das CGEs caninas. Ensaios de Fosfatase Alcalina, imunofluorescência para os marcadores: pluripotente POU5F1 (OCT4),

germinativos DDX4 (VASA), DAZL e DPPA3 (STELLA), mesodérmico THY-1 (CD90) e epigenéticos 5mC, 5hmC, H3K27me3 e H3K9me2, RT-qPCR para os genes NANOG e DDX4 e formação de teratoma foram efetivados para comprovar a linhagem de células CGEs. Como resultado *in vivo,* percebe-se que diferentes padrões de marcações e genes foram expressos nas CGPs, comprovando que a espécie canina se assemelha mais com os humanos do que com os camundongos. Os resultados *in vitro* mostraram que foi possível derivar as células CGEs e que estas conseguem reter sua pluripotencialidade e que diminuem a expressão dos genes germinativos. Porém, essas células tendem a se diferenciar em outros tecidos somáticos, mesmo com a adição de suplementos, fato também notado em CGEs humanas.

Palavras-chave: Células germinativas primordiais (CGPs). Células germinativas embrionárias (CGEs). Epigenética. Cão.

ABSTRACT

SOUZA, A. F. de. **Epigenetics of reprogramming in canine embryonic germ cells** [Epigenética da reprogramação em células germinativas embrionárias caninas]. 2016. No. 128. Thesis (Doctorate in Sciences) - Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science, University of São Paulo, São Paulo, 2016.

Primordial germ cells (PGCs) are known as the only cells capable of generating a new individual, they originate the gametes which then will transmit genetic material to future generations. Normally, the mammalian germ line is determined by genetic and epigenetic factors that have essential functions to guide the direction and development of PGCs as well as embryonic germ cells (EGCs). Epigenetic reprogramming is fundamental for the regulation of the genome during the development of the germ cells responsible for originating the gametogenic lineage in mammals. Methylation and demethylation in PGCs is a unique event, essential for erasing epigenetic memory and also preventing transmissions of epimutations to the next generation. Thus, the understanding of the patterns of differentiation of PGCs in EGCs can be important in identifying and correcting possible failures in these processes, which will be important in the future for development and reproductive performance. Most of the studies with PGCs in EGCs are carried out in mice, but this species is not always the best model of study when transposing this knowledge to humans. In canines, no study has ever been reported on canine PGCs and maybe the Canine species has become interesting as a new animal model for studies. It is known that the study material of human embryos are scarce samples and difficult to obtain, so it is necessary to use other animal models, such as the Canids, which also resemble humans. Dogs were the first fundamental models for the development of bone marrow transplantation in humans, but also made valuable contributions to the development of therapies for cardiovascular and orthopedic diseases. Then, it has become interesting to expand the studies on PGCs in the canine species in order to show the importance of different models that might resemble humans. Therefore, we had how proposal identify which were pluripotent, germinative and epigenetic markers that are important for the development of PGCs and canine EGCs. It research was divided into two phases: the first consists of the *in vivo* process, from the initial development of the embryo to the complete formation of the gonadal ridge. We analyzed through the techniques of real-time PCR (RT-qPCR) and immunofluorescence for pluripotent markers POU5F1 (OCT4) and NANOG, germline DDX4 (VASA), DAZL and DPPA3 (STELLA) and epigenetic 5mC, 5hmC, H3K27me3 and H3K9me2 were performed to create a profile of genes that are important for the development of canine PGCs. We proceeded to the

second *in vitro* phase, which focuses on the derivation and characterization of canine EGCs. Alkaline Phosphatase (AP), immunofluorescence for the markers: pluripotent POU5F1 (OCT4), germinative DDX4 (VASA), DAZL and DPPA3 (STELLA), mesodermal THY-1 (CD90) and epigenetic 5mC, 5hmC, H3K27me3 and H3K9me2. We also analyzed RT-qPCR for NANOG and DDX4 genes and teratoma formation were performed to prove the EGCs cell lineage. As a result *in vivo*, different marking patterns and genes had been expressed in CGPs, proving that the canine species is more similar to humans than to mice. The *in vitro* results showed that it was possible to derive the EGCs and that they are able to retain their pluripotency and decrease the expression of the germinative genes. However, these cells continue to differentiate into other somatic tissues, even with the addition of supplements, a fact also noted in human CGEs.

Key words: Primordial germ cells (PGCs). Embryonic germ cells (EGCs). Epigenetics. Dog.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Demonstrativo dos genes importantes para a especificação das CGPs em camundongos. 37
Figura 2 – Esquema da derivação das células tronco embrionárias, células germinativas primordiais (CGPs) e células germinativas embrionárias (CGEs).....38
Figura 3 – Esquema do padrão de metilação durante o desenvolvimento embrionário. 40
Figura 4 - Mecanismos epigenéticos fornecem a ligação entre fatores ambientais e alterações fenotípicas durante toda a vida.....43
Figura 5 - Esquema de imprinting genômico.....46
Figura 6 – Esquema do experimento 1: desenvolvimento das CGPs nas gônadas masculinas caninas.....49
Figura 7 - Eletroforese do gene SRY no fragmento 271bp. 57
Figura 8 – Coloração histológica de ácido Periódico-Schiff (PAS) nos embriões com 25, 27-28 e 30 dias de gestação.....59
Figura 9 - Morfologia e Imunofluorescência do embrião canino com 22 dias de gestação. (CR 1cm). 62
Figura 10 - Morfologia e Imunofluorescência do embrião canino com 25 dias de gestação. (CR 1,5cm).....63
Figura 11 - Morfologia e Imunofluorescência do embrião canino com 27-28 dias de gestação. (CR 2cm).....64
Figura 12 - Imunofluorescência do embrião canino com 25 e 27-28 dias de gestação na região do mesentério e aorta dorsal.....65
Figura 13- Morfologia e Imunofluorescência do embrião canino com 30 dias de gestação. (CR 3cm). 66
Figura 14 - Imunohistoquímica para o anticorpo 5mC.....68
Figura 15 - Morfologia e Imunofluorescência do embrião canino com 35 dias de gestação. (CR 3,5cm).....70
Figura 16 - Morfologia e Imunofluorescência do embrião canino com 40 dias de gestação. (CR 4cm).....72
Figura 17 - Imunohistoquímica para o anticorpo 5mC.....74
Figura 18 - Morfologia e Imunofluorescência do embrião canino com 45 dias de gestação. (CR 7cm).....76

Figura 19 - Morfologia e Imunofluorescência do embrião canino com 50 dias de gestação. (CR 9 cm).....78
Figura 20 –Imunofluorescência dos testículos canino nos períodos púbere e adulto. 80
Figura 21 - Imunohistoquímica para o anticorpo 5mC do embrião canino com 15 dias de gestação. (6mm).....81
Figura 22 - Morfologia e Imunofluorescência do embrião canino com 15 dias de gestação. (CR 6mm). 82
Figura 23 – Correlation *Pearson*.....83
Figura 24 - Esquema do experimento 2: derivação das CGEs caninas.....92
Figura 25 - Demonstração o procedimento de coleta das CGPs.....94
Figura 26- Análise do potencial Teratogênico.....98
Figura 27 - Fotomicrografias da morfologia das células cCGEs derivadas da crista gônadal. 99
Figura 28 – Fotomicrografias da morfologia e expressão de Fosfatase Alcina durante o cultivo das cCGEs 100
Figura 29 – Fotomicrografias da morfologia celular dos corpos embrioides. 101
Figura 30 – Fotomicrografias das análises de imunocitoquímica das células cCGEs.....103
Figura 31 – Fotomicrografias da histopatologia dos órgãos: cérebro, coração, pulmão, baço, fígado, pâncreas, estomâgo, intestino delgado e intestino grosso dos camundongo (Balb/c – nude).....105

LISTA DE QUADROS

Quadro 1- Demostra um resumo dos genes importantes para a especificação das CGPs em humanos: 36

Quadro 2 - Demonstrativo dos genes importantes para a especificação das CGPs em camundongos.....36

Quadro 3 - Demonstrando as condições de cultura para a derivação das CGEs 95

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Expressão dos genes pluripotentes e germinativos nas células germinativas no perido incial (early), intermediário (midle) e final (late).. 83

Gráfico 2 - Demostra a expressão dos genes pluripotentes e germinativos nas cCGPs durante o período embrionário e fetal. 104

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Lista de anticorpos primários utilizados nos ensaios de imunofluorescência.....53
Tabela 2 - Lista de anticorpos testados que não obtiveram marcação na espécie canina.....54
Tabela 3 – Lista de anticorpos secundários utilizados nos ensaios de imunofluorescência. 55
Tabela 4 - Sequência de primers de cães (Canis lúpus Familiares) para análise de q-PCR . ..56
Tabela 5 – Quantificação das células cCGPs nas cristas gônadais do anticorpo POU5F1 e DDX4. 67
Tabela 6 - Quantificação das células cCGPs nas cristas gônadais do anticorpo POU5F1 e DAZL. 67
Tabela 7 - Quantificação das células cCGPs nas cristas gônadais do anticorpo POU5F1 e DDX4. 73
Tabela 8 - Quantificação das células cCGPs nas cristas gônadais do anticorpo POU5F1 e DAZL. 73
Tabela 9 - Quantificação das células cCGPs nas cristas gônadais do anticorpo POU5F1 e DDX4. 79
Tabela 10 - Quantificação das células cCGPs nas cristas gônadais do anticorpo POU5F1 e DAZL. 79

LISTA DE ABREVIATURAS

RA	Ácido retinoico
AP	*AlkalinePhosphatase* – Fosfatase Alcalina
bFGF	*Basic Fibroblast Growth Factor* – Básico fator de crescimento fibroblástico
BSA	*Bovine Serum Albunim* – Soro bovino de albumina
CGPs- *like*	Células germinativas primordiais- *like*
CGPs	Células germinativas primordiais
cCGPs	Células germinativas primordiais caninas
hCGPs	Células germinativas primordiais humanas
CGEs	Células germinativas embrionárias
cCGEs	Células germinativas embrionárias caninas
hCGEs	Células germinativas embrionárias humanas
DNMT	DNA metil-transferases
EDTA	Ácido dietilenodiaminotetracético
ESCs	*Embryonic stem cells* - Células-tronco embrionárias
HCl	Ácido clorídrico
iPS	*Induced pluripotent stem cells* – Células-tronco pluripotentes induzidas
LIF	*Leucemia inhibitory fator* – Fator de leucemia inibitório
mLIF	*Mouse leucemia inhibitory fator* – Fator de leucemia inibitório camundongo
hLIF	*Human Leucemia inhibitory fator* – Fator de leucemia inibitório humano
PAS	Ácido Periódico-Schiff
PBS	*Phosphate-bufferid saline* – Solução tampão Fosfato
PBS-T	*Phosphate-bufferid saline with Tween* – Solução tampão Fosfato com *Tween*
PFA	*Paraformaldehyd*e – Paraformol
SFB	*Serum fetal bovine* – Soro Fetal Bovino
SAM	S-adenosilmetionina

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA 24

2 HIPÓTESES 27

3 OBJETIVO GERAL 28

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 28

4 REVISÃO DE LITERATURA 29

4.1 CÉLULAS GERMINATIVAS PRIMORDIAIS (CGPS): ORIGEM, ESPECIFICAÇÃO E MIGRAÇÃO 29

4.2 DIFERENCIAÇÃO SEXUAL DAS CGPs EM MACHOS E FÊMEAS 32

4.3 COMO IDENTIFICAR AS CÉLULAS GERMINATIVAS? 34

4.4 CGPS *IN VITRO*, É POSSÍVEL? 37

4.5 EPIGENÉTICA 40

4.6 EPIGENÉTICA EM CGPS: METILAÇÃO E DESMETILAÇÃO DO DNA, MODIFICAÇÕES DAS HISTONAS, *IMPRINTING* GENÔMICO E MICRO RNAs 43

5 FLUXO GRAMA 48

6 EXPERIMENTO 1 – DESENVOLVIMENTO DAS CGPS NAS GÔNADAS MASCULINAS CANINAS. 49

6.1 MATERIAL E MÉTODO 49

6.1.1. Animais 50

6.1.2 Genótipo Sexual 50

6.1.3 Coloração de ácido Periódico-Schiff (PAS) 51

6.1.4. Imunohistoquímica 51

6.1.5. Imunofluorescência 52

6.1.6. Extração de RNA, síntese de cDNA e reação polimerase em cadeia em Tempo Real (RTq-PCR) 55

6.2 RESULTADOS 57

6.2.1 Genótipo Sexual 57

6.2.2. PAS, Imunohistoquímica e Imunofluorescência 58

6.2.3. Extração de RNA, síntese de cDNA e reação polimerase em cadeia em Tempo Real (RTq-PCR) 83

6.3 DISCUSSÃO 84

6.3.1 Dinâmica da expressão das células germinativas caninas durante os estágios embrionários e fetais 84

6.3.1 Perfil epigenético das células germinativas caninas durante os estágios embrionários e fetais 88

6.4 CONCLUSÕES PRELIMINARES 91

7.0 EXPERIMENTO 2 – DERIVAÇÃO DAS CGES CANINAS. 92
7.1 MATERIAL E MÉTODO.....92
7.1.1. Animais.....93
7.1.2 Isolamento das CGPs caninas e derivação das CGEs caninas.....93
7.1.3 Imunocitoquímica e Ensaio de Atividade de Fosfatase Alcalina nas cCGEs.....96
7.1.4. Extração de RNA, síntese de cDNA e reação polimerase em cadeia em Tempo Real (PCR).....96
7.1.5 Avaliação do potencial teratogênico.....97
7.2 RESULTADOS.....98
7.2.1 Isolamento das CGPs e derivação das cCGEs.....98
7.2.2. Imunocitoquímica e Extração de RNA, síntese de cDNA e reação polimerase em cadeia em Tempo Real (qPCR) 101
7.2.2. Teratoma *in vivo* 104
7.3 DISCUSSÃO.....106
7.4 CONCLUSÕES PRELIMINARES 110
8.0 CONCLUSÃO GERAL.....111
9.0 PERSPECTIVAS FUTURAS.....111
REFERÊNCIA 1122

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

As células germinativas primordiais (CGPs) são as precursoras de gametas, conhecidas como as únicas capazes de gerar um novo indivíduo e de transmitir o material genético para a próxima geração (CINALLI; RANGAN; LEHMANN, 2008). Durante o seu desenvolvimento, as CGPs passam por extensivas reprogramações e desempenham um função essencial na constituição de outros tipos celulares, como espermatozoides e ovócitos (HACKETT; ZYLICZ; SURANI, 2012). O primórdio da formação das CPGs depende de uma variedade de modificações, sendo que três princípios básicos regulam sua reprogramação para o desenvolvimento. A primeira fase baseia-se no bloqueio da expressão de genes relacionados à linhagem das células somáticas; a segunda, no aumento de sinais e genes indutores para a estimulação do desenvolvimento e proliferação das CPGs; e, por último, restabelece o status epigenético do genoma para eliminar epimutações através da metilação do DNA, remodelações na cromatina e deleção dos genes *imprinting* (CHUVA DE SOUSA LOPES; ROELEN, 2010; RADDATZ et al., 2013).

A especificação das CPGs acontece de forma diferente para cada espécie, por exemplo: em camundongos E7.5, as CGPs formam em pequenos grupos próximos ao epiblasto, na base do alontoide (MCLAREN, 2003). Em humanos, na terceira semana de gestação, as CPGs se desenvolvem na parte posterior do saco vitelínico endodérmico, na base do alantoide (FUJIMOTO; MIYAYAMA; FUYUTA, 1977). Conforme o desenvolvimento do embrião ocorre, as CGPs migram para o interior do embrião. Em humanos, na quinta semana de gestação e em camundongos E8.5, as CGPs se movem dorsalmente através da parede epigástrica. (COOKE; NANJAPPA, 2015; DE FELICI, 2000) e durante a nona semana de gestação em humanos e camundongos E10.5, as CGPs migram para crista gonadal, onde elas se reorganizarão para a formação das gônadas e futura diferenciação dos gametas. (LEITCH; TANG; SURANI, 2013).

As gônadas masculinas desenvolvem-se em uma rede testicular, formando os cordões seminíferos. Neste processo as gônadas passam a ser chamadas de testículos fetais. Durante esta transformação morfológica das gônadas, as CGPs masculinas também se especializam e gradualmente formam uma população distinta, nomeadas de gonócitos e células pré espermatogoniais (GASKELL et al., 2004). As CGPs masculinas, gonócitos e as células pré espermatogoniais são caracterizadas por expressarem continuamente o marcador pluripotente POU5F1 (ou OCT4) e NANOG e outros marcadores germinativos como por exemplo, DDX4

(VASA) e DAZL (PESCE; SCHOLER, 200; KEHLER et al., 2004; KERR et al., 2008) Tais, características tornam as células germinativas masculinas no período embrionário e fetal importantes ferramentas no estudo da manutenção e aquisição da pluripotencialidade e mudanças epigenéticas (KIMURA; NAKANO, 2011; SURANI et al., 2008).

Além do mais, as CGPs também podem se diferenciar *in vitro*; pesquisas em várias espécies de animais, como também em humanos demonstraram que é possível diferenciar as CGPs em uma linhagem de células, denominando-as de células germinativas embrionárias (CGEs) (DURCOVA-HILLS; SURANI, 2008; NAGAMATSU et al., 2012a; PARK et al., 2009; TILGNER et al., 2008). Este tipo de diferenciação torna-se importante, pois amplia as possibilidades no uso destas células em terapias celulares e na diferenciação de gametas *in vitro* (HAYASHI et al., 2011; HAYASHI; SAITOU; YAMANAKA, 2012). Outra característica interessante é o fato das CGEs serem uma importante fonte de células-tronco pluripotentes, por apresentarem semelhanças com as células-tronco embrionárias (CTE) (ESCs*,* do inglês *Embyonic stem cells*) (PIROUZ; KLIMKE; KESSEL, 2012).

Contudo, poucos estudos têm sido dedicado para a espécie canídea. Um estudo dirigido por Gier; Marion, (1969), demostrou que as CGPs caninas aos 20 para 21 dias de gestação migram através do mesênquima entre o epitélio celômico. E somente um estudo (MARTINS et al 2011) demonstrou a progressão das populações distintas das CGPs durante a mudança morfológica das gônadas em testículos fetais caninos. No cultivo *in vitro*, dois estudos preliminares foram realizados com a diferenciação das CGPs a CGEs (MARTINS, 2010; SOUZA, 2013- dados não publicados).

O modelo canino apresenta fisiologia e genética similar com a espécie humana quando comparadas a de outros modelos experimentais convencionais, como camundongos e ratos (KIRKNESS, 2003; PARKER; OSTRANDER, 2005; WHITWORTH; OVCHINNIKOV; WOLVETANG, 2012). O cão doméstico têm sido fundamental para o desenvolvimento do transplante de medula óssea em humanos, como também fizeram valiosas contribuições para o desenvolvimento de terapias para doenças cardiovasculares e ortopédicas (EGERMANN; GOLDHAHN; SCHNEIDER, 2005; MOÏSE, 1999; PEARCE et al., 2007). Além disso, aproximadamente 481 doenças hereditárias têm sido identificado em cães e mais da metade dessas doenças são similares a humanos incluindo, Alzheimer, doença cardiovascular, distrofia muscular, câncer de próstata e de mama (CHASTANT-MAILLARD et al., 2010; RIVERA; EULER, 2011).

Assim, considerando-se os fatores de semelhanças e disponibilidade de materiais entre CGPs humanas e caninas torna-se interessante expandir as pesquisas com o modelo de cães.

Acredita-se, que através desta proposta e metodologia novos conceitos fundamentais possam ser elucidados na espécie canina. A compreensão das células germinativas durante o desenvolvimento embrionário e fetal e na derivação para CGEs podem constituir uma importante fonte na medicina reprodutiva regenerativa e no desenvolvimento biológico e epigenéticos na medicina veterinária, podendo ser transposto, com as devidas ressalvas, às terapias humanas.

2 HIPÓTESES

1) Durante o desenvolvimento das gônadas á testículo fetal as CGPs e nas células pré espermatogoniais são epigeneticamente reprogramadas.

2) As CGPs masculinas caninas possuem a capacidade de se diferenciarem em CGEs.

3 OBJETIVO GERAL

Objetiva-se identificar e analisar a dinâmica de marcadores pluripotentes, germinativos e epigenéticos importantes para o desenvolvimento das CGPs masculinas e células pré espermatogoniase, bem como nas CGEs masculinas.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar as CGPs masculinas e células pré espermatogoniais no período gestacional entre 22 a 50 dias, através da técnica de imunofluorescência com os anticorpos POU5F1 (OCT4), DDX4 (VASA), DPPA3 (STELLA) e DAZL.
- Avaliar a expressão dos genes POU5F1, NANOG, DDX4 (VASA), DPPA3 (STELLA) e DAZL nas CGPs masculinas e células pré espermatogoniais através da técnica RTq-PCR.
- Estabelecer um perfil epigenético das CGPs masculinas e células pré espermatogoniais nos, através da técnica de imunohistoquímica e imunofluorescência com os anticorpos 5mC, 5hmC, H3K27me3 e H3K9me2.
- Extrair e isolar células das cristas gônadais masculinas para a derivação das células CGEs
- Apliação das CGEs masculinas em camundongos nudes (balb/c) para a avaliação do potencial teratogênico *in vivo*.
- Caracterizar das células CGEs masculinas através de imunocitoquímica pelos os anticorpos 5mC, 5hmC, H3K27me3, H3K9me2, POU5F1 (OCT4), DDX4 (VASA), DPPA3 (STELLA) e DAZL.
- Avaliar a expressão dos genes NANOG e DDX4 (VASA) dos cultivos das CGEs através da técnica RTq-PCR.

4 REVISÃO DE LITERATURA

4.1 CÉLULAS GERMINATIVAS PRIMORDIAIS (CGPS): ORIGEM, ESPECIFICAÇÃO E MIGRAÇÃO.

Todos os seres vivos possuem um único objetivo comum, transmitir suas informações genéticas para a próxima geração. Porém, para que ocorra esse processo, o organismo precisa passar por vários ciclos de desenvolvimento até ser capaz de atingir o ápice da reprodução. O início do desenvolvimento em mamíferos ocorre por meio da fertilização, onde acontece a fusão do gameta masculino com o gameta feminino e irá gerar o zigoto.

Durante o processo de segmentação, ocorre a clivagem do zigoto, ou seja, este entra em sucessivas divisões mitóticas, resultando em um aumento celular até a formação de células conhecidas por blastômeros (HOPKIN; RAFF; WALTER, 2011). Aos poucos, com o aumento das divisões celulares, o embrião modifica sua forma para uma pequena massa de células resultando na mórula (MOORE; PERSAUD, 2008). Durante o processo de compactação, a mórula desenvolve-se ao estágio de blastócisto, que é formado por: uma cavidade central (cavidade da blastocele), as células da massa celular interna (MCI) e uma delgada camada celular externa chamadas de células da trofoecdoderme (McGEADY et al 2008). Ao final da expansão do blastocisto, ocorre a eclosão do blastocisto da zona pelúcida. Neste período, o embrião é constituído com um disco embrionário bilaminar que as células da MCI formam um epitélio, denominado hipoblasto e as células externas da MCI formam o epiblasto. O hipoblasto e o trofoectoderma constituem as linhagens extra-embrionárias, que irão formar as membranas fetais, como a placenta e seus anexos. Enquanto que o epiblasto irá compor todas as linhagens embrionárias (HYTTEL, 2010).

Após este periodo, o epiblasto forma a linha primitiva e o embrião passa a ter forma trilaminar com um conjunto de células ectodérmica, mesodérmica e endodérmica. Ainda no epiblasto, uma subpopulação de células, as futuras CGPs, é especificada, e, durante a gastrulação, migram a partir do epiblasto para posições extra-embrionárias (LAWSON, 1994). Durante este período, as CGPs multiplicam suas quantidades celulares e começam o processo de migração ao interior do embrião até atingirem às cristas gonadais (DE FELICI, 2000). Os processos de como as PGCs são especificados e as rotas de migração são diferentes para cada espécie.

Em camundongos, as células epiblásticas são posicionadas entre o ectoderma extra-embrionário (ExE) e o endoderma visceral (VE), formando como se fossem um cilindro. Próximo às células epiblásticas, sinais indutores específicos começam a decorrer e um pequeno número de células irão se tornar as CGPs e os outros tipos celulares irão se diferenciar em células somáticas. A especificação das CGPs, em camundongos durante este estágio, é dependente do gene FRAGILIS e especialmente do fator transcriptacional BLIMP1 junto com PRDM14 e TCFAP2C (ou AP2γ). PRMDM14 auxilia a inibir a programação das células somáticas nas CGPs, como também aumentar novamente a expressão de genes pluripotentes (Sox2 e Nanog), impulsionando as células a se desenvolverem como germinativas (HAYASHI; DE SOUSA LOPES; SURANI, 2007; OHINATA et al., 2005; VINCENT et al., 2004). Estudos com camundongo *knocout* do gene BLIMP1 demonstraram ausência na proliferação e migração das CGPs (SAITOU et al., 2005).Agora, camundongos *knocout* do gene PRMD14 possuem dificuldades no desenvolvimento de CGPs, além do mais a ausência de PRMD14 influência na regulação do gene SOX2 e no apagamento da marca repressiva de histona H3K9me2 (AGUERO et al., 2017). TCFAP2C, também é um fator crítico para impulsionar a especificação das CGPs, um estudo realizado por Webber et al., (2010) demostrou que a falta deste gene causa a perda das CGPs em camundongos no estágio E8.0.

Outro fator que auxilia na sinalização das CGPs é a molécula sinalizadora, proteína morfogênica do osso (BMPs), conhecida por normalmente expressar no ectoderma extra-embrionário e auxiliar no fator de crescimento das células. São os fatores BMP4 e BMP8b que irão ser expressos no ectoderma extra-embrionário de camundongos durante E5.5 e E6.5 e induzir mecanismos apropriados para o desenvolvimento das CGPs (LAWSON et al., 1999; OKAMURA; HAYASHI; MATSUI, 2005). Pesquisas com embriões mutantes de BMP4 mostraram total falta de CGPs e alantoide; BMP8b mutantes possuem pouco ou nenhuma CGPs e reduzido tamanho do alantoide (MAGNÚSDÓTTIR et al., 2012; OHINATA et al., 2005). A baixa regulação de BMPs também influencia nas proteínas SMAD (SMAD 1, SMAD 5 e SMAD 8) (HAYASHI et al., 2002). São as proteínas SMAD 1 e SMAD 5 que auxiliam no desenvolvimento do epiblasto. Consequentemente, a expressão anormal de ambas as proteínas SMAD1 e SMAD5 influencia na má formação de CGPs (ARNOLD et al., 2006; CHANG; MATZUK, 2001).

Em humanos, devido ao escasso material e considerações éticas, é difícil saber o exato momento em que os genes e as proteínas influenciam na especificação das hCGPs e que podem ser diferentes das mCGPs. De acordo com Tang et al., (2016), hCGPs são reguladas, principalmente, pelo o gene SOX17 e também pelo BLIMP1 que atuam como fator repressor

de genes somáticos, desempenhando também uma função na reprogramação epigenética. Os genes KFL4 e TFCP2L1 constituem importantes especificadores na regulação das hCGPs, bem como, nas hES*cells*. Tal descoberta difere dos achados em camundongos em que BLIMP1 e BMP4 se tornam importantes nesta transcrição mESC para mPGC-likes.

Durante todo o seu percurso de migração, as CGPs e outros tipos celulares têm que superar vários obstáculos, tais como: submeter-se a extensos movimentos morfogênicos; transpassam barreiras de diversos ambientes celulares e tecidos; e, finalmente, chegar ao destino correto que serão as cristas genitais. A motilidade celular é complexa e precisa ser orquestrada por uma série de eventos que consiste na aquisição da motilidade e moléculas sinalizadoras. Basicamente, para uma célula se mover são necessários os movimentos de protusão que utiliza filamentos de actina e miosina para a movimentação. Através desse método, as células utilizam os *lamellipodium* para polimerizar os filamentos de actina, funcionando como se fossem uma força física para empurrar a membrana no sentido da migração. Mesmo tal procedimento sendo eficiente, ocorre muito gasto energético por parte da célula (ANANTHAKRISHNAN; EHRLICHER, 2007). Assim, outro processo auxilia no deslocamento celular, que são os movimentos de bolhas (do inglês, *blebs*). As *blebs* são definidas como vesículas de membranas, conduzidas por uma pressão hidrostática e citoplasmática que se submetem a transformações morfológicas se adaptando à forma do ambiente. O resultado é um deslocamento celular com menos energia construindo uma estratégia útil e rápida (TARBASHEVICH; RAZ, 2010; ANANTHAKRISHNAN; EHRLICHER, 2007). Em *Drosophila melanogaster* (do inglês, *fruitfly*), após a gastrulação, as CGPs migram para o intestino médio e, em seguida, encaminham dorsalmente ao intestino médio, ao mesoderma posterior e tendo como seu destino final as gônadas (STARZ-GAIANO et al., 2001). As moléculas sinalizadoras que influenciam nessa transição são HMGCR e WUNENS, estas ajudam a repelir ou atrair as células migratórias CGPs e encaminha-las ao seu destino final, as cristas gônadais (SANTOS; LEHMANN, 2004).

O processo em mamíferos torna-se um pouco distinto, pois durante a migração as CGPs aumentam sua quantidade celular e um dos sinais importantes para essa ação em camundongos é o fator c-KIT e sinais de WNT (NIEHRS, 2012; RUNYAN et al., 2006). O processo de migração em camundongos inicia-se no E7.5, as CGPs, migram adjacentes ao endoderma e invaginam para o intestino primitivo no E8.5 e, novamente, migram dorsalmente ao longo do intestino primitivo até atingir a crista genital E10.5 para a formação gônada e futura diferenciação dos gametas (MCLAREN, 2003; HYTEL et al., 2010). Em humanos, o processo de migração torna-se um pouco diferente. Aproximadamente na terceira semana de gestação, as CGPs originam-se na parte posterior do saco vitelino perto do alantoide e, passivamente, são

incorporadas para o interior do embrião, migrando para a parede do intestino primitivo. No decorrer da quinta semana, migram, dorsalmente, ao mesentério até atingir seu destino final nas cristas genitais. Nos estágios que sucedem à migração, as hCGPs aumentam sua proliferação para um número aproximadamente de 1.000 para 450.000 em fêmeas e cerca de 150.000 em machos (FELICI, 2009). Em camundongos, no E13.5 as CGPs em ambos os sexos chegam até 20.000 células. Sendo que o número, após o nascimento, o número diminui para 6.000-10.000 (LOBASCIO et al., 2005).

4.2 DIFERENCIAÇÃO SEXUAL DAS CGPs EM MACHOS E FÊMEAS

Após a migração das CGPs para a crista genital, começa o processo de diferenciação sexual. Normalmente, o desenvolvimento dos testículos ocorre em embriões com um cromossomo Y normal. Este processo é dependente do gene SRY, que direciona as céluas germinativas a se desenvolverem em células de *Sertloli* e células espermatogonias (BULLEJOS; KOOPMAN, 2001; JESKE et al., 1995). Outro fator, também essencial para a determinação sexual em machos é o fator de transcrição SOX9, presente entre a espécie vertebrada (NANDA et al., 2009). Estudos revelaram que, humanos heterozigotos com mutações no gene SOX9, levam a várias doenças e umas delas é XY fêmea reversa (HOUSTON et al., 1983). Assim, SRY e SOX9 são requeridos durante o normal desenvolvimento nas gônadas masculinas, iniciando a especificação de células específicas para a produção espermática.

Morfologicamente, em camundongos durante o estágio E12,5, e, em humanos, entre a sétima e oitava semanas, as gônadas masculinas desenvolvem-se em uma rede testicular, formando os cordões seminíferos (COVENEY et al., 2008; HANLEY et al., 2000). Gradualmente, os testículos em crescimento se separam do mesônefro em degeneração e tornam-se suspensos pelo seu próprio mesentério, o mesorquídio (MOORE; PERSAUD, 2008). Os cordões seminíferos desenvolvem-se em túbulos seminíferos, túbulos retos e rede testicular. Em seguida, os túbulos seminíferos irão dar origem às células intersticiais ou de *Leyding.* O processo meiótico somente irá acontecer após o nascimento em machos, pois nos testículos fetais ou pré-natais, o ácido retinóico (RA, do inglês *retinoic acid*) leva a um aumento da enzima PRC1, degradando a expressão do gene STRA8 e, consequentemente, bloqueando a entrada da meiose (ALBRECHT; EICHER, 2001). Os machos estacionam na fase mitótica no ciclo do Go/G1 com seus cordões seminíferos e param progressivamente a proliferação para

entrada em uma fase de quiescência retornando seu ciclo somente após o nascimento (KOUBOVA et al., 2006), quando o RA somente irá atuar direcionando repressão de PRC1 e induzindo o gene STRA8 na via espermática (BOWLES et al., 2006; KOUBOVA et al., 2006).

Entretanto, na ausência do gene SRY, a linhagem germinativa se compromete com o desenvolvimento de ovócitos e as células somáticas são guiadas a se desenvolverem na célula da teca folicular ou células foliculares (ALBRECHT; EICHER, 2001; BULLEJOS; KOOPMAN, 2001). Diferente dos sinais indutores a que direcionam as gônadas masculinas, nas gônadas femininas não existem um fator determinante. Em camundongos, a participação da família dos genes WNT, como a WNT4 são expressos em ambos XX e XY gônadas até o estágio E11,5 (KIM et al., 2006). Contudo, após este período o gene WNT4 é super regulado nas gônadas femininas, decaindo sua expressão nas gônadas masculinas (KIM et al., 2006). Um estudo realizado em camundongos fêmeas, *knocout* de WNT4, demostrou ambiguidade na diferenciação sexual, tendo alguns fatores hormonais masculinos, mas com características ovarianas (HEIKKILA et al., 2005). Assim, o fator chave na determinação sexual em fêmeas ainda permanece obscuro.

O processo de diferenciação morfológico da gônada feminina ocorre lentamente, os cordões corticais estendem-se ao epitélio superficial da gônada incorporando as CGPs que estão circundadas por células foliculares transformando as CGPs em ovogônias (MOORE; PERSAUD, 2008). Em camundongos, esse evento ocorre aproximadamente no estágio E11,5 e a distinção entre o córtex e a medula não é muito evidente (JIMÉNEZ, 2009). Contudo, em humanos, durante a sexta semana de gestação, as células germinativas dos cordões são nítidas nas gônadas (BIASON-LAUBER, 2010). Algumas ovogônias continuam sua proliferação mitótica, porém outras se diferenciam em ovócitos primários. Os ovócitos entram em prófase meiótica, passando pelas fases leptóteno, zigóteno e paquíteno, mas bloqueiam no estágio diplóteno da prófase até a chegada do nascimento (HYTTEL, 2010). Esses ovócitos passam a ser chamados agora de folículos primordiais. O processo da ativação da meiose nas CGPs femininas de camundongos ocorre aproximadamente no estágio E13,5 e em humanos aproximadamente na 17° semana (WILHELM; YANG; THOMAS, 2013). A meiose inicia-se com a estimulação do RA, seguido pelo gene STRA8 (ALBRECHT; EICHER, 2001). Nos ovários pré-natais, o RA reprime a ativação de uma enzima PRC1 que leva a um aumento do gene STRA8, essencial para o funcionamento da meiose. Como resultado, as CGPs entram em meiose e dão início à produção ovocitária (HEEREN et al., 2015).

4.3 COMO IDENTIFICAR AS CÉLULAS GERMINATIVAS?

As interações das CGPs e rota de migração podem ser identificados através de marcadores moleculares específicos antes e depois dos movimentos das células germinativas para as cristas gônadais (Quadro 1) e (Figura 1). Três principais fases constituem para a caracterização das CGPs: primeira, o início do desenvolvimento, que constitui a fase de pluripotência e formação das células; segunda, o aumento do número de células e a fase migratória; terceira, a fase de diferenciação dos gametas em machos e fêmeas.

Na primeira fase, as CGPs podem ser identificadas através da atividade fosfatase alcalina (AP, do inglês *AlkalinePhosphatase*) (MACGREGOR; ZAMBROWICZ; SORIANO, 1995; YABUTA et al., 2006). A AP é altamente expressa em vários tipos de tecidos, mas em células germinativas, é intensamente expressa ao redor das células somáticas no período primordial (MCLAREN, 2003).

Outros 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 codificam 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 Cauffmanet al. (2006) descreve que a proteína Oct4 possui duas isoformas, OCT4A e OCT4B. Em humanos, o OCT4A (isoforma1, NP_ 002692.2) está claramente relacionado à pluripotencialidade, tendo sua expressão nuclear traduzida a partir da variante 1, do OCT4 humano (NM _ 002701.4). Enquanto que o OCT4B (isoforma2, NP _ 001167002.1) está envolvido na resposta ao estresse celular, expresso, essencialmente, no citoplasma e é igualmente traduzida pelas variantes 2, (NM _ 30 203289.4) e 3 (NM_ 001173531.1) do gene (LEE et al., 2006). 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 regulação restringe-se nas células germinativas (NICHOLS et al., 1998; PESCE et al., 1998). OCT4, em camundongos, persiste em ambos os sexos até E13.0 (KEHLER et al., 2004). Enquanto que em humanos, durante o primeiro trimestre, OCT4 é expresso em machos e fêmeas; no segundo, a expressão de OCT4 continua em machos e declina em fêmeas (ANDERSON et al., 2007; HEEREN et al., 2016).

Outros marcadores nucleares que estão envolvidos com a pluripotencialidade, como NANOG, SOX2 e STELLA (DPPA3 ou PGC7), também são expressos durante o desenvolvimento das CGPs. Em camundongos, NANOG é expresso em ambos os sexos até o estágio E14.5. SOX2 é detectado em camundongos nos estágios E10.5 e E13.5 em ambos os sexos e a partir de E13.5 diminui sua expressão (WESTERN et al., 2005). STELLA atua na manutenção de células pluripotentes, células do oócitos, bem como no início do desenvolvimento das CGPs (BUCAY et al., 2009). Em camundongo, STELLA é identificada a partir do E7.5 e continua até E15.5, restringindo-se depois somente nos oócitos (SATO et al., 2002). Estudos em camundongos com STELLA deficiente revelam deficiência de produção nas células germinativas em fêmeas, contudo em machos não apresentou nenhuma anormalidade (PAYER et al., 2003). Em humanos é difícil saber o exato momento em que estes marcadores são expressos devido ao difícil acesso a esse material biológico.

Durante o estágio migratório das CGPs, outros genes e sinais moleculares tornam-se importantes para a detecção das células germinativas. Em camundongos, o marcador de membrana SSEA1 é expresso em células-tronco embrionárias (mESC, do inglês *mouse embryonic stem cells*), porém, também é expresso durante a migração das CGPs de camundongos (c*CGPs*). Interessantemente, SSEA1 é ausente em células-tronco embrionárias humanas (hESC, do inglês *human embryonic stem cells*), mas estudos em células germinativas embrionárias humanas (hCGEs) demonstraram positividade para o marcador (DURCOVA-HILLS et al., 2000; ZHANG et al., 2006). Outro marcador que desempenha um papel importante é o receptor tyrosine Kinase, c-kit que é localizado na superfície da célula. Além de marcador hematopoiético que também participa no desenvolvimento das CGPs nas cristas gônadais evitando apoptose destas células (HØYER; BYSKOV; MØLLGÅRD, 2005; ROSSI, 2013). As CGPs, ao entrar na crista gônadal, ocorrem à expressão do específico marcador germinativo, VASA (DDX4), que é conservada entre as espécies vertebradas e invertebradas, e pode ser identificada no citoplasma da membrana celular (MEDRANO et al., 2010; YOON; KAWAKAMI; HOPKINS, 1997). Em camundongos, VASA é observada a partir do E10.5 e continua sua expressão até o E12.5 em ambos os sexos (FUJIWARA et al., 1994). Em humanos, VASA é detectada em ambos os sexos no primeiro trimestre de gestação, restringindo sua expressão em fêmeas no segundo (CASTRILLON et al., 2000; HEEREN et al., 2016). O específico marcador germinativo *Deleted in Azoospermialike* (DAZL) é conservado em todos vertebrados e também é um marcador essencial para o desenvolvimento das células germinativas. Em camundongos, é detectado no E12.5, sendo que, a não expressão desse gene resulta em infertilidade em ambos os sexos (HSU-HSIN CHEN et al., 2014). Em humanos, de

acordo com a pesquisa de Anderson et al., (2007), mostraram que a expressão de DAZL acontece a partir do segundo trimestre de gestação em ambos os sexos.

Quadro 1- Demostra um resumo dos genes importantes para a especificação das CGPs em humanos:

CLASSIFICATION	GENES	3-5 WEEKS	5-8 WEEKS	9-10 WEEKS (FEMALE)	9-10 WEEKS (MALES)
PLURIPOTENTE	POU5F1	+	+	+	+
	NANOG	+	+	+	+
	PRMD14	+	-	-	-
CÉLULAS GERMINATIVAS (INÍCIO)	BLIMP1	+	-	-	-
	CD38	-	+	-	-
	NANOS3	-	+	-	-
CÉLULAS GERMINATIVAS (TARDIA)	DDX4	-	+	+	+
	DAZL	-	-	-	+
	SCP3	-	-	+	-
ENDODERMICO	SOX17	+	-	-	-
MESODERMICO	T	+	-	-	-
	CKIT	-	+	+	-

Adapado (HEREEN et al., (2015 e 2016); ALAI et al., (2015) ;MEDRANO et al., (2010) ;. NDERSON et al., (2007) ; TOYOOKA et al., (2000).
Fonte: SOUZA, A.F.; 2017

Quadro 2 - Demonstrativo dos genes importantes para a especificação das CGPs em camundongos.

CLASSIFICATION	Genes	E 3.5	E5-6.0	E7.25-7.5	E10.5	E14.5 FEMALE	E14.5 MALE
PLURIPOTENT	POU5F1	+	+	+	+	-	+
	NANOG	+	-	+	+	+	+
	SOX2	+	+	+	+	+	+
GERM CELLS (INITIAL)	BLIMP1	-	-	+	+	-	-
	FRAGILIS	+	+	+	+	+	?
	NANOS3	--	-	+	+	?	?
GERM CELLS (LATES)	DDX4	-	+	+	+	+/-	
	DAZL	-	-	-	-	+	+
	SCP3	-	-	-	-	+	+
MESODERMIC	T	-	+/-	+	-	-	-

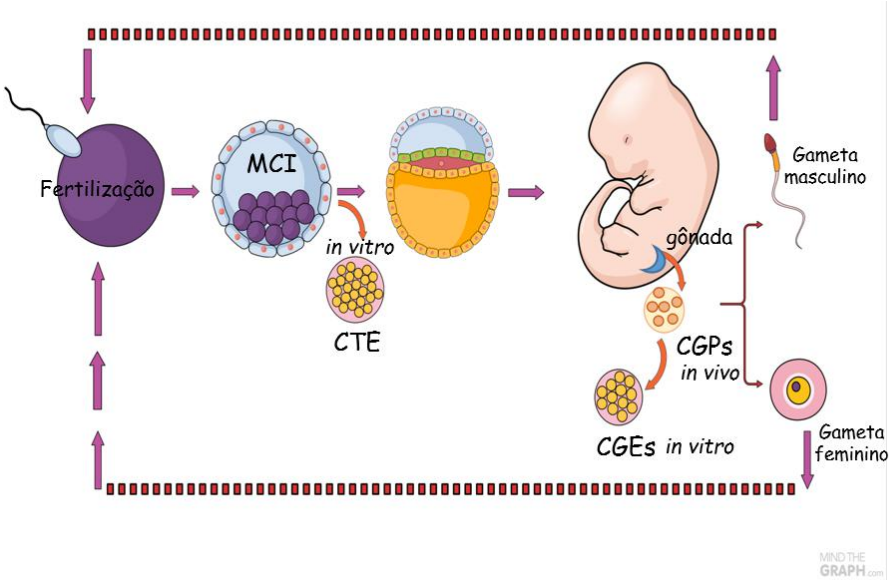
Adaptado por (HAYASHI; DE SOUSA LOPES; SURANI, (2007); SAITOU et al., (2002); TANAKA et al., (2000); PESCE et al., (1998); RUGGIU et al., (1997); FUJIWARA et al., (1994).
Fonte: SOUZA, A.F.; 2017.

4.4 CGPS *IN VITRO*, É POSSÍVEL?

As CGPs, quando colocadas em cultivo *in vitro,* aumentam suas propriedades de plasticidade celular e podem ser transformadas em outro tipo celular, cujos nomes são células germinativas embrionárias (CGEs) (NAGAMATSU et al., 2012b) (Figura 1). Este processo de transformação impõe à célula uma reprogramação que, basicamente, confere à capacidade de auto renovação, assemelhando-se às *ESCs* (DE FELICI, 2011). Assim, as CGEs expressam fatores de pluripotencialidades *in vitro,* ocorre a formação de corpos embrioides e são capazes de formar teratomas que, quando analisados, constituem os três tecidos germinativos

(mesoderma, ectoderma e endoderma) (HAYASHI et al., 2011; HAYASHI; SAITOU; YAMANAKA, 2012).

Figura 1 – Esquema da derivação das células tronco embrionárias, células germinativas primordiais (CGPs) e células germinativas embrionárias (CGEs)



Fonte: Adaptado de (TURNPENNY et al., 2006a).

Legenda: Esquema da derivação das células tronco embrionárias (CTE), células germinativas primordiais (CGPs) e células germinativas embrionárias (CGEs). Após a fecundação as células passam por transformações com o objetivo de formar um indivíduo. Durante essas divisões celulares o embrião no estágio de blastocisto é possível a derivação a partir da massa celular interna (MCI) a formação de células tronco embrionárias (CTE). Seguidamente, no estágio de embrião tardio nas gônadas existe uma população celular chamadas de células germinativas primordiais CGPs. As CGPs são capazes de originar os gametas femininos e masculinos. As CGPs quando colocadas em cultivo *in vitro* transformam-se em uma população de células germinativas embrionárias (CGEs).

Em camundongos, a conversão de CGPs, nas linhagens CGEs, está muito bem estabelecida e caracterizada (MATSUI; ZSEBO; HOGAN, 1992; RESNICK et al., 1998). De acordo com os protocolos de Durcova-Hills et al. (2003), as CGEs de camundongos podem ser obtidas de embriões desde o E8.5 até o E11.5. O protocolo consiste em desagregar as gônadas mecanicamente e depois com agentes enzimáticos, como tripsina e ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA). Segue-se o cultivo com meio básico DMEM sem soro fetal bovino (SFB) e com aditivos fator de leucemia inibitório de camundongo (mLIF, do inglês *leucemia inhibitory factor murino)*, Humano Básico fator de crescimento fibroblástico (hbFGF, do inglês *human recombinant basic fibroblast growth fator*). Como resultado, obtêm-se células que são capazes de sobreviver a longo tempo em cultura, formar colônias e quimeras *in vivo*, além de, possivelmente, diferenciar-se nos gametas para transmitir a linhagem germinal. Outras espécies, como os suínos e coelhos, seguindo os protocolos de CGEs de camundongos, conseguiram relatar com sucesso a geração de CGEs (CONG et al., 2013; KAKEGAWA et al.,

2008). Em ambas as espécies, as CGEs apresentaram as mesmas características das CGEs de camundongos.

Contudo, quando se transportar tais conhecimentos de CGEs de camundongos para CGEs humanas (hCGEs), ocorreu um contraste de protocolos utilizado e das características das células obtidas. O primeiro trabalho relatado sobre as hCGEs foi o grupo de Shamblott et al., (1998), o qual demonstrou ser possível a formação de hCGEs das gônadas e mesentérios de embriões com 5 a 9 semanas de gestação. No protocolo, utilizaram-se a desagregação mecânica das gônadas e a combinação com agentes enzimáticos tripsina, EDTA, hialuronidase tipo V e colagenase tipo IV. Para o cultivo, seguiu-se em meio básico DMEM com 15% de SFB e aditivo como: fator de leucemia inibitório humano (hLIF, do inglês *human leucemia inhibitory factor*), hbFGF e forscolina. Como resultado, obteve-se células com características das CGEs, as quais foram positivas a AP; mas a eficiência durante o cultivo foi baixa. Seguindo os mesmos princípios do trabalho anterior, outros grupos tentaram reproduzir a produção de hCGEs (LI et al., 2014; LIU et al., 2004; PARK et al., 2004) Contudo, ocorreu uma variabilidade entre as características das células obtidas e marcadores que possam identificar se realmente são hCGEs. Sendo que a única concordância entre os autores foi que é possível derivar hCGEs, porém são células ineficientes a longo período em cultivo, por diferenciar-se facilmente de outros tecidos. Mas, com os avanços de técnicas de reprogramação celular às pesquisas como de Hayashi; Saitou; Yamanaka, (2012), Irie et al., (2015) e Sasaki et al., (2015) demonstram que as células pluripotentes induzidas (iPS, do inglês *Induced pluripotent stem cells*) podem ser reprogramadas a uma população de células Epiblasto-*like* ou mesodérmicas-*like* e desta na geração de *CGPs- like.* A descoberta das *CGPs-like* expandiu as possibilidades para se compreender os mecanismos e vias que são importantes para a geração das hCGPs e hCGEs. Assim, o grupo de pesquisa, Irie et al., (2015), demonstraram que as hCGPs-*like* são semelhantes as hCGPs, sendo que o gene regulador para a formação das hCGPs-*like* é o SOX17. Esta descoberta diverge com os achados das CGPs-*like* de camundongos, em que um dos gene regulador é o SOX2.

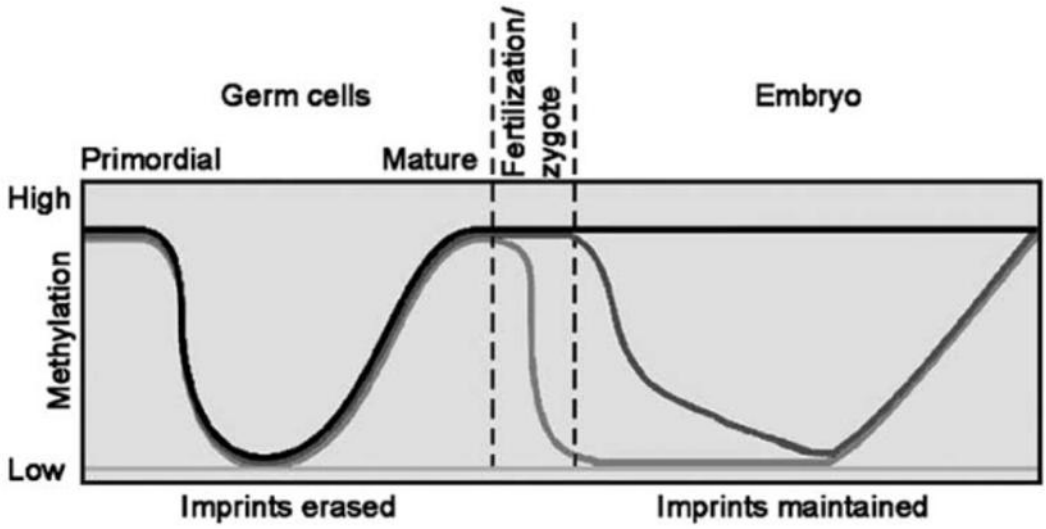
Tanto as CGEs como as CGPs-*like* ainda são uma linhagem celular recente, e ocorrem muitas incertezas na possível utilização destas nas terapias celulares. Contudo, os processos de transformação das hCGPs, hCGEs e hCGPs-*like* sempre será uma fonte consagrada na pesquisa, pois reflete o começo e o final do ciclo de um novo indivíduo.

4.5 EPIGENÉTICA

O termo "epigenética" foi introduzido em 1942 pelo embriologista Conrad Waddington que, relacionando-o com o conceito de "epigênese" do século XVII, definiu como um complexo de processos de desenvolvimento entre o genótipo e fenótipo (DEICHMANN, 2016). Hoje em dia, epigenética é definida como “os processos que regulam a expressão gênica e que não estão relacionados à sequência primária do DNA, sendo herdáveis ao longo das divisões celulares” (REIK; SANTOS; DEAN, 2003).

A reprogramação epigenética do genoma no desenvolvimento de mamíferos ocorre em duas fases distintas: a primeira fase é nas células germinativas primordiais (CGPs); e a segunda fase, logo após a fertilização, na formação do zigoto, estendendo-se até o desenvolvimento da mórula e blastocisto (FENG; JACOBSEN; REIK, 2010) (Figura 3). Tais modificações epigenéticas podem ser classificadas em categorias, dentre elas: metilação e hidroximetilação do DNA, modificações pós-traducionais nas proteínas histonas e os RNAs não codificantes e a metilação e oxidação do RNA. Estes são os principais mecanismos epigenéticos responsáveis pelo estabelecimento e manutenção dos padrões de expressões gênicas de tecidos específicos, pela repressão trancional e pela remodelação da cromatina (LI, 2002).

Figura 1 – Esquema do padrão de metilação durante o desenvolvimento embrionário.



Fonte: (REIK; SANTOS; DEAN, 2003).

Legenda: Esquema do padrão de metilação durante o desenvolvimento embrionário. O padrão de metilação ocorre no genoma em duas fases distintas: nas células germinativas primordiais (CPGs) (os *imprinting* também são apagados nesse tempo) e reestabelecida na maturação dos gametas. O segundo é depois da fertilização o genoma paternal é ativamente desmetilado (azul), enquanto o genoma materno é passivelmente desmetilado permanecendo até a ciclavagem na peri-implantação do embrião. De novo metilação acontece nas células da massa celular interna de blastocisto (importante notar que neste período os padrões *imprinting* são mantidos).

A metilação do DNA é estabelecida nas moléculas de citosina quando estas antecedem uma molécula de guanina em dinucleotideos 5'CpG3', transformando a citosina em 5-metil-citosina. A metilação da citosina consiste em uma modificação covalente resultante da atividade de uma família de enzimas denominada DNA metil-transferases (DNMT) que catalisa a transferência do grupo metil da S-adenosilmetionina (SAM) para um resíduo de citosina que antecede uma guanina-dinucleotídeo CpG (DAHL; GRØNBÆK; GULDBERG, 2011). Cinco membros da familia DNMT já foram descritos em camundongos. A função da DNMT é a de manter o padrão de metilação após a síntese da nova fita do DNA (REIK; DEAN, 2001). Subsequentemente, duas outras enzimas – DNMT3a e DNMT3b – suas funções relacionam-se, principalmente, com a metilação *de novo* (ROBERTSON, 2005). E os dois últimos membros da família da DNMT são a DNMT3L e a DNMT2. A primeira é uma proteína que não apresenta atividade catalítica, mas localiza-se juntamente com DNMT3a e DNMT3b, sendo essencial para o estabelecimento do *imprinting* em linhagens germinativas femininas (HAJKOVA et al., 2002). A deleção da DNMT2 está associada à metilação do RNA (RADDATZ et al., 2013). A metilação das ilhas CpG estão associadas à repressão da expressão gênica. Em regiões repetitivas do genoma, como nos centrômeros, a metilação é importante para a estabilidade do cromossomo e, também, suprime a expressão de elementos transponíveis (MOAREFI; CHÉDIN, 2011).

A metilação do DNA em mamíferos geralmente ocorre em regiões com sequências ricas de nucleotídeos CG, que são comumente chamadas de ilhas CpG (JONES, 2012). Nos mamíferos, a metilação do DNA é essencial para o desenvolvimento embrionário normal e tem papel importante na regulação da expressão gênica, na inativação do cromossomo X, no *imprinting* genômico e na modificação da cromatina. (SMITH; RESNICK, 2012).

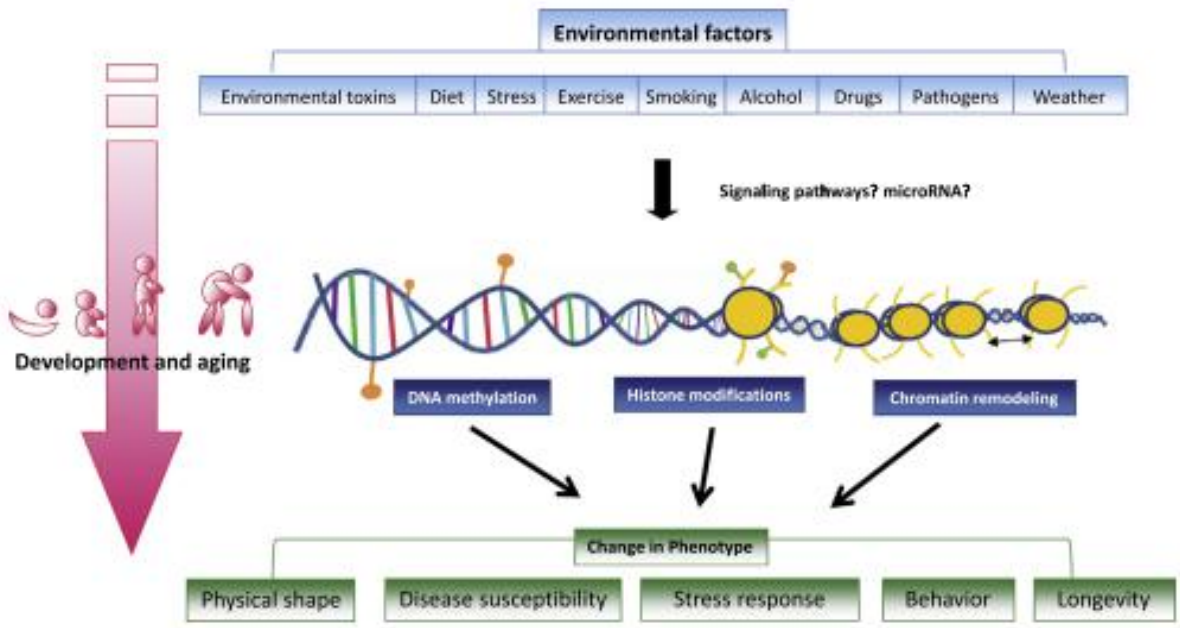
Quanto às modificações pós- traducionais das histonas, acredita-se que existam mais de 100 diferentes modificações pós-traducionais, incluindo, principalmente: metilação, acetilação, fosforilação, ubiquitinização e sumoilação. Estas transformações ficam concentradas, preferencialmente, dentro das caudas amino-terminais das histonas que se projetam no nucleossomo (BERNSTEIN; MEISSNER; LANDER, 2007). As caudas amino terminais são externamente livres ao nucleossomo, que interagem com outros nucleossomos ou com a própria molécula de DNA tornando os genes transcricionalmente ativos ou reprimidos.

As histonas podem ser acetiladas ou desascetiladas nos resíduos de lisina (K). Estas reações são catalisadas por enzimas como, histona acetil transferase (HAT) ou histona desacetilase (HDAC). Na maioria dos casos, a acetilação das histonas aumenta a transcrição de genes, enquanto histona desacetilação reprime a transcrição. O processo de acetilação das

histonas contribui para o estabelecimento ou a manutenção de um ambiente permissivo a transcrição, favorecendo à atividade de transcrição pelo relaxamento das interações de DNA nos nucleossomos (XU et al., 2009). Enquanto a metilação das histonas está relacionada tanto com a ativação como com a repressão da expressão gênica, dependo da quantidade de grupos metil adicionado a cada resíduo, dessa forma a lisina pode ser mono, di ou trimetilada (VILLAR-GAREA; IMHOF, 2006).

Apesar de possuírem diferentes modificações que estão relacionadas à transcrição, replicação e reparo de DNA, essas modificações não ocorrem isoladamente, ou seja, várias modificações podem ocorrer em uma mesma cauda de histona, produzindo um efeito combinado chamado "código de histonas" (SWYGERT; PETERSON, 2014). Tais modificações epigenéticas são responsáveis por regulações nas expressões específicas de determinados genes a uma determinada célula (TAMMEN; FRISO; CHOI, 2013). As falhas na expressão de genes específicos e a influência de fatores ambientais podem ocasionar modificações epigenéticas e possíveis mutações no genoma (HUIDOBRO; FERNANDEZ; FRAGA, 2013). Portanto, deve-se levar em consideração que existe uma interação entre todos estes sistemas e que estes padrões epigenéticos podem mudar ao longo da vida, influenciando nosso organismo ao stress celular e a susceptibilidade a uma possível doença (Figura 4).

Figura 2 - Mecanismos epigenéticos fornecem a ligação entre fatores ambientais e alterações fenotípicas durante toda a vida.



Fonte: (TAMMEN; FRISO; CHOI, 2013).
Legenda: Mecanismos epigenéticos (metilação do DNA, modificações nas histonas e remodelamento da cromatina) fornecem a ligação entre fatores ambientais (exposição a toxinas, dieta restrita, patógenos, drogas, etc) e alterações fenotípicas durante toda a vida.

4.6 EPIGENÉTICA NAS CGPS: METILAÇÃO E DESMETILAÇÃO DO DNA, MODIFICAÇÕES DAS HISTONAS, *IMPRINTING* GENÔMICO E MICRO RNAs

Devido às CGPs diferirem das células somáticas por ter vias especificas de regulação seu processo de reprogramação epigenético também se torna único (KIMMINS; SASSONE-CORSI, 2005). Sua reprogramação em mamíferos ocorre em fases distintas: durante sua especificação, na fase migratória, e na entrada da crista genital (KAFRI et al., 1992). Submetem-se a mudanças envolvendo metilação/desmetilação do DNA, várias modificações das histonas e *imprinting* genômico. Contudo, tais acontecimentos acontecem em conjunto, ou seja, ao mesmo tempo em que ocorrem modificações pós-traducionais nas histonas, ocorre redução nos níveis globais da metilação do DNA.

Em camundongos durante o início da especificação das PGCs aproximadamente no estágio E5.5 os níveis de 5mC estão os mesmos de outras células somáticas (OHINATA et al., 2009; SEKI et al., 2007a). Contudo, durante o período de migração e colonização aproximadamente entre os estágios de E8.0 a E13.5 ocorre a redução dos níveis globais da

metilação do DNA (5mC) (HACKETT; ZYLICZ; SURANI, 2012). Este padrão é distinto entre machos e fêmeas. Em machos a desmetilação ocorre de forma passiva, enquanto que em fêmeas ocorre uma drástica perda de 5mC (REIK; SANTOS; DEAN, 2003).

A desmetilação do DNA nas regiões diferencialmente metiladas (DMRs), pode ocorrer de duas formas: através da desmetilação do DNA passiva ou ativamente. A passiva depende da replicação do DNA e envolve a redução dos níveis globais de 5 metilcitosina (5mC) e afeta a produção de BLIMP1 e *PRDM14*, como também desempenha uma importante função na regulação da expressão de genes *imprinting* (SURANI; HAYASHI; HAJKOVA, 2007). E a segunda, envolve reações enzimáticas e a conversão de 5mC em 5hidroxmetilcitosina (5hmC) pela ação de enzima da família *Tet,* que são capazes de realizar a oxidação. Tal conversão pode contribuir para um processo de reprogramação nas fases iniciais e contribuir para o comprometimento de uma linhagem estável. (TAHILIANI et al., 2009).

Simultaneamente, com as mudanças de 5mc e 5hmC no DNA, as marcas repressivas de histonas fizeram também parte da reprogramação epigenéticas. Em camundongos, no estágio E8.0, um dos primeiros eventos é a perda da histona H3 da *lisina 9 dimetilada* (H3K9me2), uma marca repressora com alta estabilidade. Em seguida, no E8.5 e E9.0, ocorre o aumento da histona H3 da lisina 27 trimetilada (H3K27me3), um marcador repressivo com plasticidade aparente (HAJKOVA et al., 2008; SEKI et al., 2005, 2007a). Semelhante evento ocorre nas ESCs, onde o estado de repressão e aumento das histonas estão envolvidos com o aumento de genes associados aos pluripotentes como NANOG e SOX2 (SURANI; HAYASHI; HAJKOVA, 2007). Além disso, o declínio da histona H3K27me3 em CGPs fêmeas está relacionado ao período da inativação do cromossomo X (CHUVA et al., 2008).

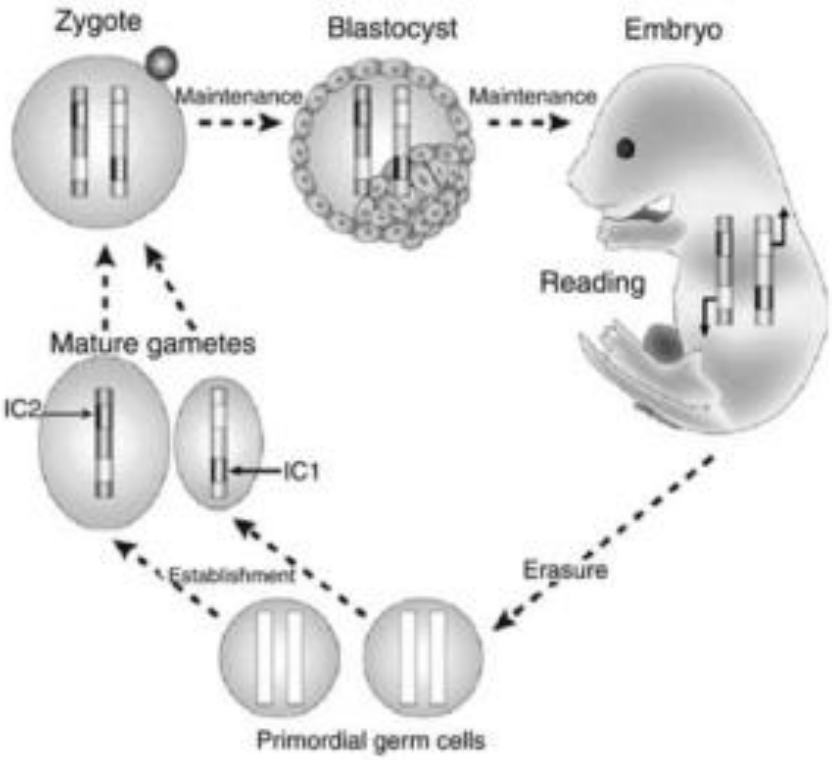
Vale ressaltar que, em CGPs de camundongos, durante a sua migração, exigem outras duas modificações de histonas: o aumento da histona H3 da lisina4 dimetilada (H3K4me2) e histona H3 da lisina 4 trimetilada (H3k4me3) e também a metilação simétrico de arginina 3 em histonas H4 e H2A (H4 / H2AR3me2s) que é catalisada pela proteína metiltransferase arginina. Essas modificações são importantes na manutenção da linhagem CGPs (TEE et al., 2010). Quando as CGPs de camundongos atingem as gônadas, ocorre uma rápida perda de todas as histonas (H9K3me2/me3, H3K27me3, H4 / H2AR3me2s) parecendo que o genoma submeteu-se a uma fase de apagamento das marcas epigenéticas (DE FELICI, 2011) (DE FELICI, 2011).

Outro mecanismo paralelo de reprogramação epigenética nas CGPs inclui o *imprinting* genômico. O *imprinting* genômico em mamíferos foi descoberto aproximadamente em 1980, através de dois experimentos sobre o desenvolvimento de embriões uni-parentais ou com dissomia uni-parental em camundongos. Ambos os casos revelaram que os genes de mamíferos

podem funcionar de formas diferentes, dependendo se proviessem do pai ou da mãe (SURANI et al.1984). Mais tarde, no início de 1990, seguiu-se a descoberta dos primeiros genes *imprinted*, que foram, de fato, expressos, de maneira diferente, nos cromossomos materno e paterno, distinguindo-se um do outro como resultado de uma metilação diferencial dos gametas (DECHIARA; ROBERTSON; EFSTRATIADIS, 1991).

Dessa forma, pode-se afirmar que o *imprinting* genômico é um padrão de modificação do DNA que ocorre somente à expressão de um dos alelos parentais. Os genes *imprinting* possuem apenas um alelo ativo (podendo ser materno ou paterno), o alelo inativo está epigeneticamente marcado por modificação das histonas e/ou metilação das citosinas (HANNA; KELSEY, 2014). Estas alterações epigenéticas ocorrem num dos alelos do gene *imprinting*, enquanto que o outro alelo permanece desmetilado e ativo (REIK; DEAN, 2001). Deste modo, o encontro dos dois alelos parentais, um metilado e outro não metilado, na fertilização, irá permitir um desenvolvimento embrionário normal na função celular sem alterar o genoma em si (REIK; SANTOS; DEAN, 2003) (Figura 5). Além do mais, o *imprinting* genômico, nas CGPs, estabelece um nova marca de metilação, conforme o sexo do embrião, e faz com que estas marcas sejam passadas corretamente para as próximas gerações (KAWASAKI et al., 2014). Um estudo dirigido por Hajkova et al., (2002) demostrou que o apagamento dos *imprinting* ocorre quando as CGPs entram na crista gonadal, onde as regiões de controle de *imprinting* (ICRs, do inglês *imprinting control regions*) retêm suas marcas de metilação até o estágio E11,5 antes de acontecer a desmetilação. Depois, os novos padrões de metilação dos *imprinting* só irão acontecer durante a diferenciação sexual. Nas células germinativas masculinas de camundongos, o estabelecimento do *imprinting* paternais são adquiridos antes do nascimento, ao redor do estágio E14,5 nas células pró espermatogônias (DAVIS et al., 2000). Em contraste, em fêmeas, os *imprinting* maternais são adquiridos depois do nascimento, durante o crescimento dos ovócitos (LUCIFERO et al., 2004).

Figura 3 - Esquema de imprinting genômico.



Fonte: (REIK; SANTOS; DEAN, 2003).
Legenda: Esquema de *imprinting* genômico. *Imprinting* metilação são introduzidas nos oócitos e espermatozoides em diferentes genes *imprinting* (ICI e IC2 são chamados de centro *imprinting*). A metilação diferencial é mantida após a fertilização e é "lida" ou convertida na diferentes expressões dos genes em embriões e adultos.

Outras modificações epigenéticas são os RNAs não-codificantes. Elas controlam a expressão gênica embrionária por vários meios, variando desde a degradação de mRNAs induzidas por microRNA até a modificação de cromatina mediada por ncRNA longa. Muitos aspectos da embriogênese parecem ser controlados pelos ncRNAs, incluindo a transição materno-zigótica, a manutenção da pluripotência, a padronização dos eixos corporais, a especificação e diferenciação dos tipos celulares e a morfogênese dos órgãos (PAULI et al, 2011).

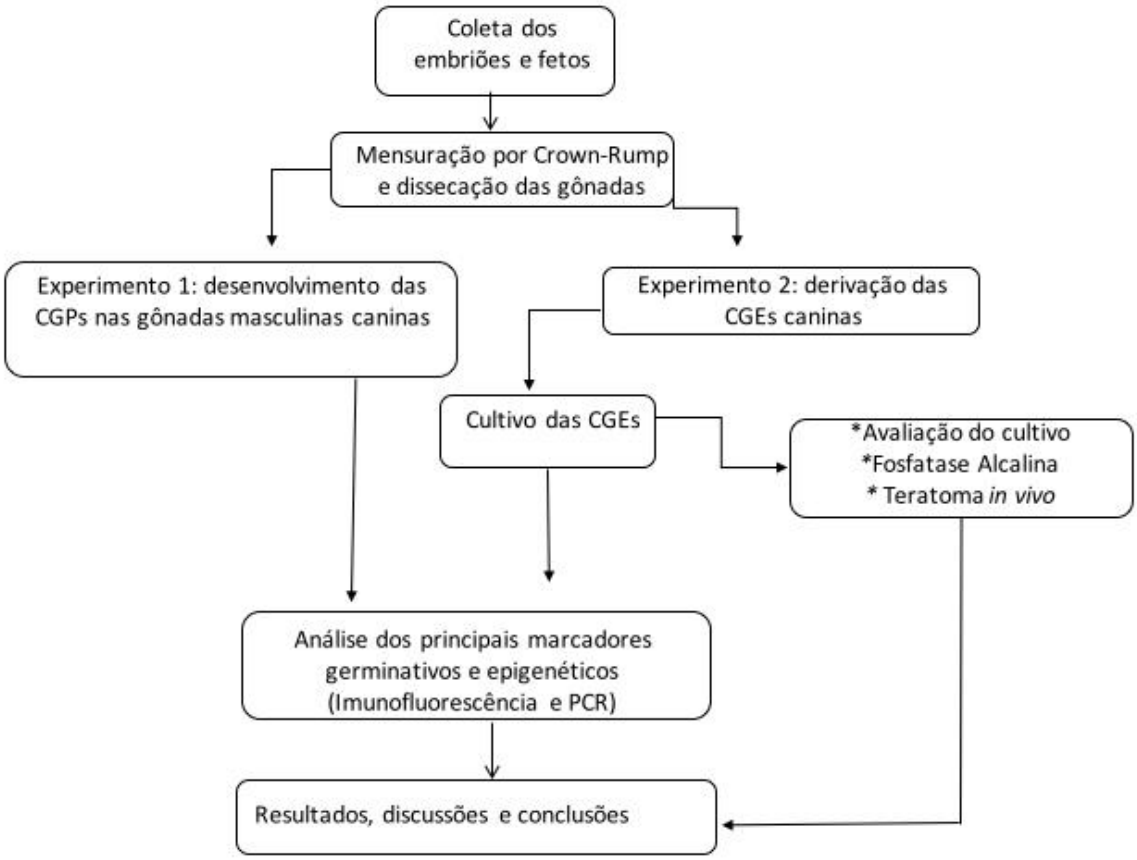
MicroRNA (miRNAs) é o nome do conteúdo para os RNAs de 22 nucleotídeos de comprimento que desempenha um papel importante na regulação de genes em células animais e vegetais (Bartel, 2009). Os miRNAs associam-se a uma classe específica de proteínas conhecida como *Argonaute* para formar miRNPs que se ligam aos alvos para induzir à repressão mediada por miRNA em células animais (HUTVAGNER; SIMARD, 2008). A tradução de um miRNA envolve diferentes fatores que estão envolvidos no processo de recrutamento de subunidades ribossômicas e para assegurar o início correto da síntese de proteínas. Há evidências crescentes de que os miRNAs interferem no processo de iniciação da tradução

(PILLAI et al, 2005). Na linhagem germinativa, os micro RNAs (piRNAs) desempenham uma ação importante na expressão da regulação gênica durante o desenvolvimento das CGPs. Durante o desenvolvimento das CGPs em camundongos é reconhecido que os o miRNAS 290-295 e os miRNAs-17-92 são significantes e abundantes e a ausência deles resulta na deficiência do número de CGPs, bem como, no comprometimento da migração destas células (HAYASHI et al., 2008). Novos estudos vêm esclarecendo e descobrindo novas ações dos microRNAs na CGPs. Um exemplo é o estudo dirigido por Bhin et al., (2015) que encontrou nove novos miRNAs (miR-10b, -18a, -93, 106b, -126-3p, -127, -181a, -181b, e -301) altamente expressos em CGPs nos estágios de E12,5 e E15,5, como também em células estaminais espermatogônicas (SSCs) aos 5 dias pós-parto (dpp), os quais desempenham ações importantes na regulação celular das CGPs.

Deste modo, pode-se concluir que as mudanças epigenéticas, como desmetilação ativa ou passiva, mudanças na cromatina, genômico *imprinti*ng e micro RNAs são eventos essenciais para o normal desenvolvimento das CGPs. Pois estes processos auxiliam a prevenir a herança de epimutações, protegendo a espécie para que não haja um clone da mesma prole (GODMANN; LAMBROT; KIMMINS, 2009).

5 FLUXO GRAMA

Para melhor compreensão são demonstrados os resultados em duas etapas conforme demonstrado no fluxo grama abaixo:

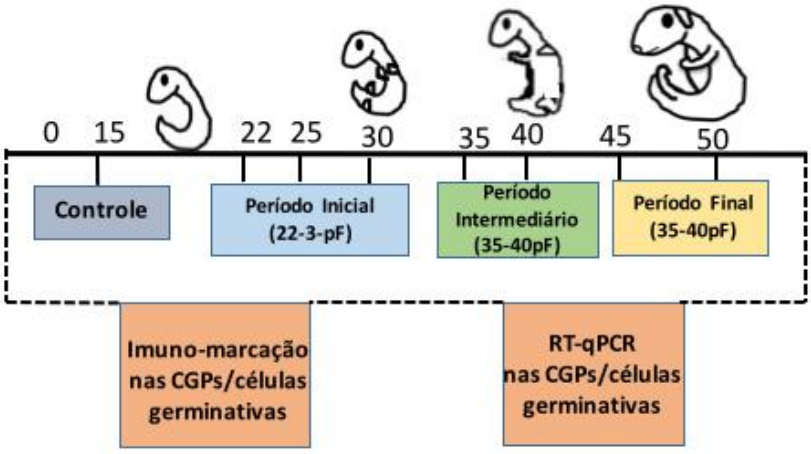


6 EXPERIMENTO 1 – DESENVOLVIMENTO DAS CGPS NAS GÔNADAS MASCULINAS CANINAS.

Devido as GGPs masculinas modificarem suas morfologia durante seu desenvolvimento á células pré espermatogonias e ambas retém a expressão de fatores pluripotentes, nossa hipótese é que :1) Durante o desenvolvimento das gônadas á testículo fetal as CGPs e as células pré espermatogoniais são epigeneticamente reprogramadas.

Para esse primeiro experimento visou identificar o perfil de marcadores e genes nas CGPs caninas (cCGPs) em diferentes estágios do desenvolvimento do embrião e feto (Figura 6). Para melhor compreensão nos dividimos o período de gestação em três estágios. O primeiro estágio, corresponde ao perido inicial (fase embrionária com embriões de 22 a 30 dias pós fertilização (pF)). O segundo estágio, corresponde ao período do intermediário (fase de diferenciação sexual e transformação morfológica da gônada com inicio dos cordões testiculares, 35-40 pF); e a terceiro estágios, corresponde ao perido final (em que a gônada completa suas modificações morfógicas e se desenvolve nos testículos fetais, 45-50 pF).

Figura 4 – Esquema do experimento 1: desenvolvimento das CGPs nas gônadas masculinas caninas.



Fonte: SOUZA, A.F.; 2017

Legenda: Esquema do experimento 1: desenvolvimento das CGPs nas gônadas masculinas caninas. Demonstra que foi realizado um perfil dos principais genes e marcas epigenéticas durante o desenvolvimento das CGPs.

6.1 MATERIAL E MÉTODO

A pesquisa foi realizada no Laboratório de Imunohistoquímica e Fisiologia Experimental (LIFE), localizado no Departamento de Medicina Veterinária da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA) da Universidade de São Paulo, campus Pirassununga.

6.1.1. Animais

Os embriões e fetos caninos utilizados neste trabalho foram obtidos durante campanhas de castração, através do método cirúrgico eletivos de ovário-salpingo-histerectomia (OSH), na cidade de Pirassununga-SP e São Paulo-SP**,** conduzidos e aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais - CEUA da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo nº protocolo 13.1.1729.74.2 e CEUA da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo nº protocolo 7043240215.

Após as coletas, os embriões e fetos foram analisados para o desenvolvimento de morfogênese e medidas Crown-Rump (CR), determinadas de acordo com os métodos de PIERI et al., (2015). Para melhor compreensão os embriões foram coletados entre os períodos gestacionais de 22 a 30 dias de gestação que corresponde antes da diferenciação sexual. Os fetos foram coletados em dois períodos gestacionais: primeiro aos 35 a 40 dias corresponde ao começo da diferenciação sexual e o segundo aos 45 a 50 dias de gestação em que as gônadas passam ser as precursoras dos testículos. Após o período de 50 dias de gestação, não foi possível obter o material biológico, devido ao risco cirúrgico para a cadela gestante e aos confrontos éticos dos animais. Uma vez que a gestação de cadelas tem a duração de 55 a 60 dias de gestação.

6.1.2 Genótipo Sexual

A extração dos tecidos embriológicos caninos foi realizado, essencialmente, como previamente descritos por (NOWACKA-WOSZUK et al., 2007) e foram realizadas análises de

PCR com *primers* específicos para o gene SRY (sequência 5′-AAG GCC ACG GCA CAG AAA AGT CAC 3’, sequência reversa 5′-AAG AAG CGT CAG CGG ACA TCT GTG). As condições das reações de PCR consistem em uma etapa inicial de desnaturação a 93°C durante 3 minutos, seguidos por 35 ciclos de desnaturação; 93°C por 40s, reaquecimento dos *primers* em temperaturas de 54 a 65°C por 40s, elongação a 72°C por 1 minuto, elongação final a 72°C por 10 minutos. Para os controles positivos foram usados testículos caninos adultos e ovário canino adulto, Os produtos dos ciclos foram analisados em gel de agarose 2%.

6.1.3 Coloração de ácido Periódico-Schiff (PAS)

Para a coloração de PAS nos utilizamos embriões masculinos entre as idades de 25, 27-28 e 30 dias de gestação. Os embriões foram fixados em solução tampão de paraformol 4% (PFA 4%), embebidas em parafina, e seccionadas com espessura de 3µm. Após a desparafinização do tecido as lâminas foram incubadas com 1% de ácido periódico a uma temperatura de 56°C por 30 minutos. Prosseguiu-se com a lavagem em água ultra pura MiliQ e seguindo de coloração do reagente de *Schiff* em temperatura ambiente por 30 minutos. Após este procedimento, as lâminas foram lavadas durante 10 minutos em água ultra pura MiliQ e coradas com Hematoxilina de *Harrys* durante 5 minutos (coloração de fundo) e lavadas em água corrente. Seguiu-se com a hidratação na concentração crescentes de álcoois 70%, 95%, 100% e em xilol por duas vezes. Uma gota de cola Permount (Fisherchemicals, cat. # 096403) foi colocada sobre a lâmina para a montagem e sobre esta, uma lamínula. Em seguida os cantos das lamínulas foram limpos e armazenados em temperatura ambiente para a secagem. As lâminas foram analisadas no microscópio de luz Zeiss KS400 (Zeiss, Göttingen, Alemanha), com imagens de 4X, 10X e 40X.

6.1.4. Imunohistoquímica

Os embriões masculinos e as gônadas fetais masculinas foram fixados em solução tampão de paraformol 4%, embebidos em parafina e seccionados com espessura de 3µm. O antígeno de recuperação foi realizado por micro-ondas 0.01 M de reagente cítrico pH 6.0 por

12 minutos a 92°C. Em seguida, as lâminas foram lavadas 2x em solução tampão fosfato (*Phosphate-bufferid saline -PBS*) com pH 7,2 e 1x em solução tampão fosfato com 0,1% Tween (Synth – Brasil) (*Phosphate-bufferid saline tween -PBS-T*). Para a melhor marcação do anticorpo, as lâminas foram incubadas com 4M de solução de ácido clorídrico (HCl) por 20 minutos a 37°C. Depois, as mesmas foram bloqueadas com 0,3% de peróxido de hidrogênio com solução PBS por 20 minutos e incubadas com o anticorpo primário policlonal mouse anti 5mC (1:500, ab10805, Abcam, Cambridge, Inglaterra, Reino Unido) durante a noite (em inglês, *overnight*) a 4°C. Controles negativos foram realizados pela ausência de anticorpos primários.

Seguidamente, as lâminas foram lavadas três vezes em PBS 1X durante cinco minutos. Em seguida, os cortes receberam uma gota do anticorpo secundário Kit Dako (cat# K4069-2 Dako, USA) e foram levadas para câmara úmida à temperatura ambiente durante 30 minutos. Prosseguiu-se com a adição do revelador Dako-advance HRP (cat#K4069 HRP, Dako, USA). Os cortes foram corados pela hematoxilina de *Harris* durante 5 minutos (coloração de fundo) e lavadas em água corrente. Seguiu-se com a hidratação nas concentrações crescentes de alcoóis 70%, 95%, 100% e xilol por duas vezes. Uma gota de cola Permount (Fisherchemicals, cat. # 096403) foi colocada sobre a lâmina para a montagem e sobre esta, uma lamínula. Em seguida, os cantos das lamínulas foram limpos e armazenados em temperatura ambiente para a secagem. As lâminas foram analisadas no microscópio de luz Zeiss KS400 (Zeiss, Göttingen, Alemanha), com imagens de 4X, 10X e 40X.

6.1.5. Imunofluorescência

Para as análises de imunofluorescência os embriões masculinos e as gônadas fetais masculinas foram fixados durante 24h em solução de paraformoldeído 4%, desidratados, embebidas em parafina, e seccionadas com espessura de 3µm. O antígeno de recuperação foi realizado por micro-ondas 0.01 M de reagente cítrico pH 6.0 por 12 minutos a 92 °C. Seguidamente as lâminas foram lavadas 2x PBS com pH 7,2 e 1x em PBS-T. As lâminas foram bloqueadas com 1% de Soro Bovino (BSA,Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA) com 0.1% Tween-20 (PBS-T). Prosseguiu-se com a incubação dos anticorpos primários diluídos em solução bloqueio por 1 hora em temperatura ambiente (Tabela 1). Os anticorpos primários utilizados neste estudo foram escolhidos por estarem presentes em diferentes estágios de

desenvolvimento das CGPs e também por apresentaram homologia de mais de 95% com a espécie canina. Outros anticorpos também foram testados para identificar as cCGPs, porém pela a falta de um anticorpo específico com a espécie canina e pela a baixa homologia das proteínas com a espécie canina não obtivemos resultados o satisfatórios com as técnicas de imunofluorescência e imunohistoquímica (Tabela 2). Controles negativos foram realizados pela ausência de anticorpos primários. Embrião canino com 15 dias de gestação foi utilizado como controle positivo para os anticorpos: DPPA3, os anticorpos de marcas repressoras de histonas como, H3K27me3 e H3K9me2 e os anticorpos que indicam metilação do de DNA como, 5mC e hidroximetilação do DNA, 5hmC. Para o controle positivo do anticorpo DDX4 foram utilizados testículos caninos pré-púberes e adultos.

Após, este período as lâminas foram novamente lavadas 2x em PBS e 1x em PBS-t. Seguiu-se com a incubação do anticorpo secundário por 1 hora em temperatura ambiente (Tabela 3). Prosseguiu-se com as lavagens das lâminas e os núcleos das células foram contra corados com Hoechst (Hoechst (Trihydrochloride, Trihydrate, cat#33342, Invitrogen, Calsbad, CA, USA). As lâminas foram montandas com ProLongGold (Life Technologies cat# P36930, Life technology; Calsbad, CA, USA) e armazenado a 4°C. Todos os dados foram processados com uso de microscópio de fluorecência Leica DMRA (Leica, Wetzlar, Germany) com câmera de cliques frios HQ2 (Photometrics, Tucson, USA) ou microscópio de fluorescência Leica AF6000 equipado com câmera digital Hamamatsu EM-CCD C9100 (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) em aumentos de 10X e 40X.

Tabela 1 – Lista de anticorpos primários utilizados nos ensaios de imunofluorescência.

ANTICORPO	HOSPEDEIRO	DILUIÇÃO	N°CATÁLAGO/EMPRESA
SOX2	ANTI-RABBIT	1:100	ab97959 / ABCAM
POU5F1	ANTI GOAT	1:100	sc-8629/ SANTA CRUZ
DDX4	ANTI RABBIT	1:500	ab13840 / ABCAM
DPPA3	ANTI RABBIT	1:200	sc67249/ SANTA CRUZ
DAZL	ANTI RABBIT	1:500	ab34139/ ABCAM
5HMC	ANTI RABBIT	1:500	ap9160a/ ABGENT
H3K27ME3	ANTI RABBIT	1:500	7449/ MILIPORE
H3K9ME2	ANTI RABBIT	1:500	7441/ MILIPORE

Fonte: SOUZA, A.F.; 2017

Tabela 2 - Lista de anticorpos testados que não obtiveram marcação na espécie canina.

Anticorpo	Funcionalidade	Localização celular	Hospedeiro	Companhia	Controle positive na espécie canina	Controle positive
c-Kit	Desenvolvimento das CGPs	Membrana	rabbit	Santa Cruz, Ab 5535	Ausência nas Gônadas embriões e fetos. Positivo em tumor de mama canino.	Positivo para a Gônada de camundongo
c-Kit	Desenvolvimento das CGPs	Membrana	rabbit	Abcam, Ab 5506	Ausência nas Gônadas embriões e fetos. Positivo em tumor de mama canino.	Positivo para a Gônada de camundongo
Fibronectin	Adesão celular	Membran	rabbit	Abcam,F-3648.2	Negativo nos Embriões com 25, 27-28 e 30 dias de gestação	Positivo para a Gônada de camundongo e humana
Laminin	Matriz extracelular	Membran	mouse	Abcam, Ab11574	Negativo nos Embriões com 25, 27-28 e 30 dias de gestação	Positivo para a Gônada de camundongo e humana o
Nanog	Pluripotencia	Núcleo	rabbit	Abcam, Ab 80892	Negativo nas Gônadas embriões e fetos	Gônada de camundongo e humana
Nanog	Pluripotencia	Núcleo.	goat	Santa Cruz, Sc 30331	Negativo nas Gônadas embriões e fetos	Positivo para a Gônada de camundongo e humana
Nanog	Pluripotencia	Núcleo.	goat	Tebu, 500-P236A	Negativo nas Gônadas embriões e fetos	Positivo para a Gônada de camundongo e humana
Nanog	Pluripotente.	Núcleo.	goat	R&D AF2729	Negativo nas Gônadas embriões e fetos	Positivo para a Gônada de camundongo e humana
Pecam	Célula germinativa	Membrana	goat	Santa Cruz, sc1506	Negativo nas Gônadas embriões e fetos	Positivo para a Gônada de camundongo e humana
Podoplain	Citoesqueleto	Membran	mouse	Reliatech Gmbh101-M41	Negativo nas Gônadas embriões e fetos	Positivo para a Gônada de camundongo e humana
SSEA1	Pluripotencia /célula germinativa	Citoplasma	mouse	Santa Cruz,Sc2170 2	Ausente ou Negativo nas Gônadas embriões e fetos e nas cCGEs	Positivo para a Gônada de camundongo
SSEA1	Pluripotencia /célula germinativa	Citoplasma	mouse	Milipore, MAB4301	Ausente ou Negativo nas Gônadas embriões e fetos e nas cCGEs	Positivo para a Gônada de camundongo

Fonte: SOUZA, A.F.; 2017

Tabela 3 – Lista de anticorpos secundários utilizados nos ensaios de imunofluorescência.

ANTICORPO	HOSPEDEIRO	DILUIÇÃO	N°CATÁLAGO/EMPRESA
ALEXA FLUOR 488	DONKEY ANTI RABBIT	1:500	A-11058, Life Technologies
ALEXA FLUOR 594	DONKEY ANTI GOAT	1:500	A-21203, Life Technologies

Fonte: SOUZA, A.F.; 2017

6.1.6. Extração de RNA, síntese de cDNA e reação polimerase em cadeia em Tempo Real (RTq-PCR)

Para a extração de RNA utilizou-se células germinativas do período inicial (22-30 pF, n=3/idade), período intermediário (35-40 pF, n=3/idade) e período final (45-50 pF, n=3/idade). O tecido das gônadas foram isoladas usando o reagente Trizol (Life Technologies, Carlsbad, CA,USA) de acordo com as instruções do fabricante e a qualidade das extração do RNA foi quantificada pelo espectrofotómetro (Nanodrop ND-1000, Nanodrop Technologies, Inc., Wilmington Delaware, USA). Para a síntese de cDNA utilizamos o kit *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kitight* (Life Technologies, Carlsbad, CA,USA) de acordo com as instruções do fabricante.

Para as análises de RTq-PCR, primeiramente foi realizada a validação dos primers conforme descrito por Pieri (2016) (dados não publicados) e a sequência de primers NANOGe GADPH foram retirados da literatura (LEE et al., 2014) (Tabela 4). Enquanto, que o primer POU5F1, DDX4, DAZL e DPPA3 foram desenhados utilizando o programa *Primer 3 plus* (http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi/) (Tabela 4). Após, a validação prosseguiu-se com as análises de qPCR usando SYBR Green Master Mix (Cat# 4367659,Applied Biosystems, Life Technologies, Carlsbad, CA). As reações foram processadas no instrumento Step One Plus Real-time PCR system (TermoFisher- Scientific n° 4376600, USA) sob as condições de fase pré-ciclo foi mantida a de 95°C por 10 minutos, sendo 40 ciclos: desnaturação, aumento de temperatura e separação da fita dupla (95°C, 15 minutos), seguido do anelamento dos primers a região homologa no cDNA (60°C por 1 minuto) e pôr fim a curva de dissociação 72°C, por 45segundos). Como controle negativo da reação utilizou-se a mesma reação sem a adição da amostra de cDNA e como controle positivo, utilizamos testículo de cão na fase pré-púbere e adulto. Toda a reação foi realizada em triplicata.

O método empregado para a análise foi de quantificação relativa com correção pela eficiência do primer, e os dados subministrados pelo o software do equipamento Step One Plus (Step one software versão 2.3) e analisados com o programa LinReg PCR (Versão 2015.0). As razões da expressão do genes alvo (POU5F1, DPPA3, DDX4, NANOG e DAZL) foram normalizadas pela razão da expressão do controle endógeno GADPH empregando a metodologia de correção de eficiência da equação do Pfaff1 (PFAFFL, 2001).

Para as análises estatísticas foram realizados o teste de variância (ANOVA, $p<0.05$), e as diferenças entre os genes e os períodos avaliadas foram comparados pelo o teste de Turkey ($p<0.05$) usando o software Graphpad Prism 4. Foram realizados os testes de coeficiente de correlação de *Pearson*, no qual demonstra os valores de correlação das CPGs durante o estágio embrionário e fetal entre os genes.

Tabela 4 - Sequência de primers de cães (Canis lúpus familiares) para análise de q-PCR .

GENES	SEQUÊNCIA DE PRIMER FORWARD	SEQUÊNCIA DE PRIMER REVERSE	ANELAMENTO (°C)
GADPH	CTTCACCACCATGGAGAAGC	CAGCTCAGGGATGACCTTGC	60
NANOG	ACCTCAGTCTCCAGCAGATG	TCTGACTGTTCCAGGAGTGG	60
POU5F1	GGTGGAGGAAGCTGACAACA	GTTCGCTTTCTCTTTCGGGC	60
DDX4	CATACCACCTCCTCCACCTG	TGTCTGACAGAGATTAGCTTCCTC	59.60
DAZL	ACTGGTGTGTCCAAAGGCTAT	GGACGAGGCTGCACATGATA	59.90
STELLA	AACTCCCTTCCCCTCTACCA	CGCTGGTACTGAATCAATCG	59.60

Fonte: SOUZA, A.F.; 2017

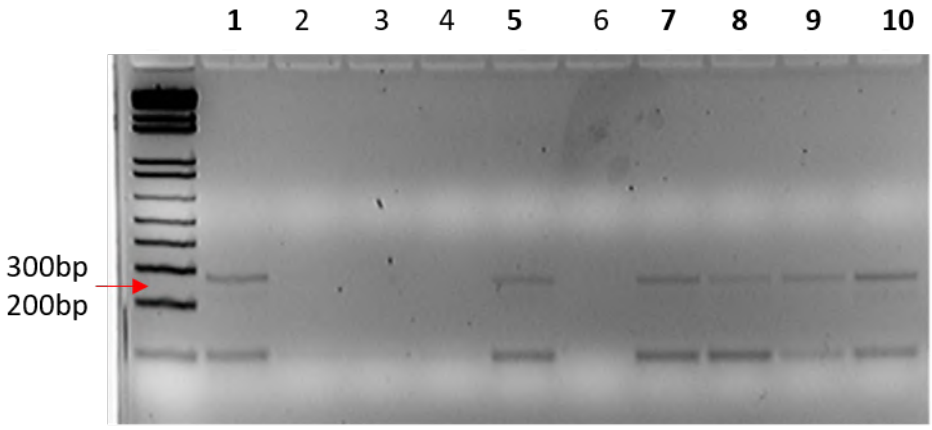
6.2 RESULTADOS

6.2.1 Genótipo Sexual

Durante as coletas dos embriões (22-30 dias de gestação) foram realizadas a técnica de coloração Hematoxilina e Eosina para verificar a morfologia das cristas gônadais, podendo assim identificar os sexos. Contudo, as cristas gônadais durante o período embrionário apresentaram morfologicamente um tecido altamente compactado não podendo distinguir os fenótipos celulares para caracterizar os sexos. Somente a partir de 35 dias de gestação foi possível identificar pela a microscópia de luz os sexos dos fetos.

Deste modo, realizamos o genótipo sexual para determinar os sexos dos embriões entre as idades de 15 a 30 dias de gestação; para este procedimento utilizamos a técnica de PCR para o gene masculino SRY. Como resultado, houve a presença do gene SRY no fragmento 271bp dos embriões n° 5 (15 dg), 7 (22 dg), 8 (25dg), 9 (27-28dg) e 10 (30dg), confirmando serem do sexo masculino. Os embriões de números 2(22 dg), 3 (25 dg), 4 (27-28 dg) e 6 (30 dg) não apresentaram presença do gene SRY, ou seja possíveis embriões femininos. (Figura 7). Como controle positivo utilizamos o testículo canino adulto (n° 1) e controle negativo ovário canino adulto (n° 2)

Figura 5 - Eletroforese do gene SRY no fragmento 271bp.



Fonte: SOUZA, A.F.; 2017

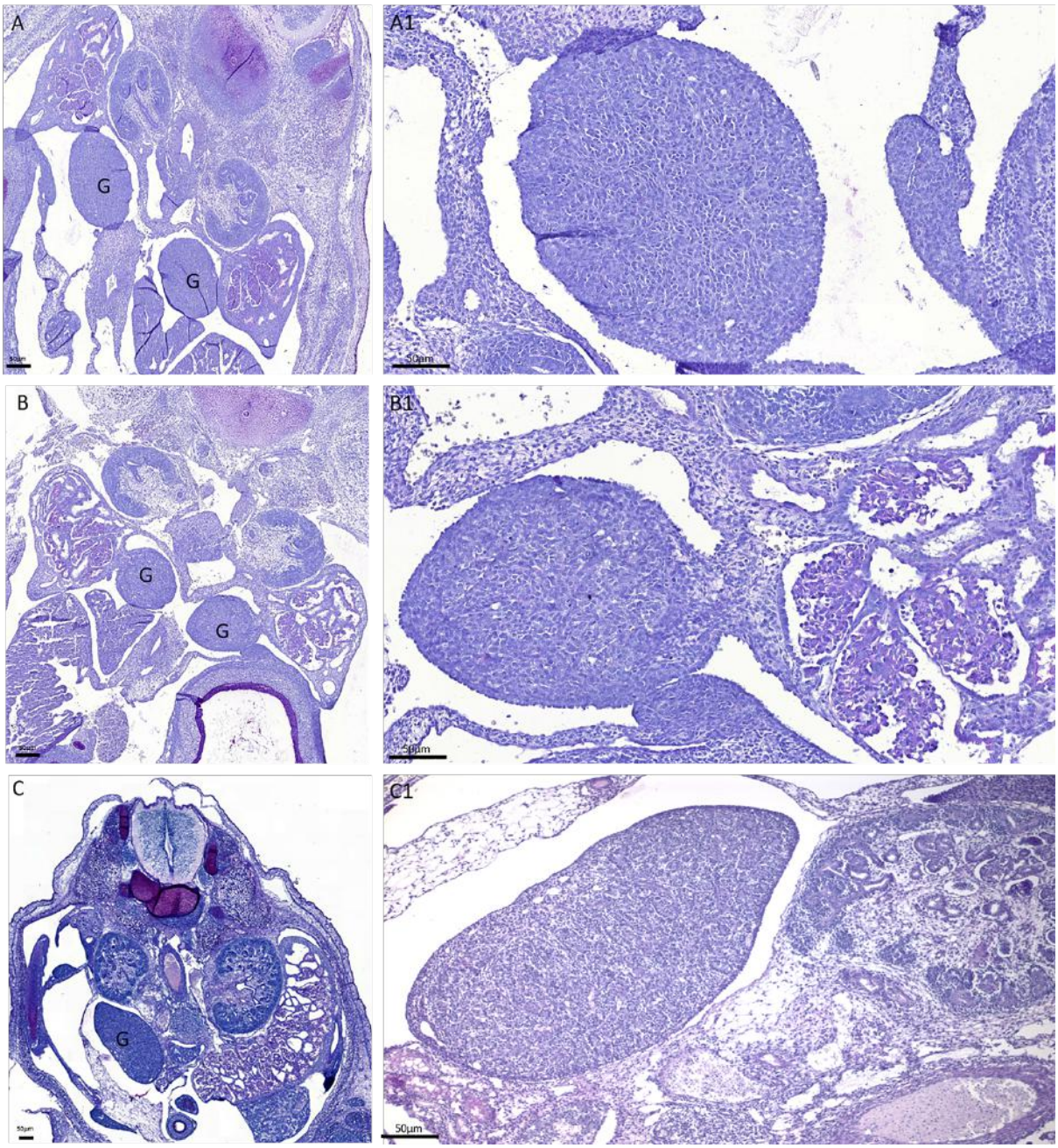
Legenda: Eletroforese do gene SRY no fragmento 271bp. Seguindo da direita para a esquerda o nº1, representa o controle positivo testículo canino adulto e o n°2 o controle negativo ovário canino adulto. O n° 5 embrião masculino na idade gestacional de 15 dias; nº7 embrião de 20 de gestação; n°8 embrião de 25 de gestação; nº9 embrião de 27-28 dias de gestação e por último nº10 embrião de 30 dias de gestação apresentavam a presença do gene SRY confirmando ser do sexo masculino. Nos números 2,3,4 e 6 foram resultados de possíveis embriões femininos entre as idades de 20,25, 27-28 e 30 dias de gestação.

6.2.2. PAS, Imunohistoquímica e Imunofluorescência

As análises de imunofluorescência e imunohistoquímica foram conduzidas para avaliar a expressão de marcadores associados às cCPGs nas gônadas durante o período embrionário e fetal

No período inicial (22-30pF) foi possível visualizar as cristas gônadais e lateralmente a ela os mesónefros em proeminentes túbulos situados lateralmente do futuro sistema urogenital. Os túbulos dos mesónefros são compostos por células epiteliais, as quais formam epitélio cúbico simples e são enroladas ao redor de vasos sanguíneos e uma camada protetora serosa. Na porção caudal deste órgão, é possível verificar a presença do tecido metanefro ou rim primitivo. As primitivas gônadas estão localizadas na porção medial e neste período elas são chamadas de gônadas indiferenciadas, pois não é possível identificar os sexos morfologica e histologicamente. Foram realizados os ensaios com coloração de PAS nos embriões com 25, 27-28 e 30 dias de gestação. A coloração de PAS é um método para verificar a presença de deposito de glicogênio em tecidos. A reação do ácido periódico seletivamente oxida os resíduos de glicose, produzindo aldeídos que reagem com o reagente de Schiff produzindo uma cor púrpura-magenta. A reatividade das CGPs com a coloração de PAS foram insatisfatórios, pois não houve a presença da coloração ao redor do citoplasma das cCGPs (Figura 8).

Figura 6 – Coloração histológica de ácido Periódico-Schiff (PAS) nos embriões com 25, 27-28 e 30 dias de gestação.



Fonte: SOUZA, A.F.; 2017

Legenda: Coloração histológica de ácido Periódico-Schiff (PAS) nos embriões com 25 (Fotomicrografias A e A1), 27-28 (Fotomicrografias B e B1) e 30 dias (Fotomicrografias C e C1) de gestação. Figura A, demonstra a coloração de PAS nas gônadas (G) do embrião com 25 dias de gestação. A1 em maior aumento evidencia a gônada com o resultado insatisfatório para a coloração de PAS. Figura B demonstra a coloração de PAS nas gônadas (G) do embrião com 27-28 dias de gestação. B1 em maior aumento evidencia a gônada com o resultado insatisfatório para a coloração de PAS. Figura C demonstra a coloração de PAS nas gônadas (G) do embrião com 30 dias de gestação. C1 em maior aumento evidencia a gônada com o resultado insatisfatório para a coloração de PAS. Figuras A, B 4X e C 3X (Barra:50µm). Figuras A, B e C 20X (Barra:50µm).

Através do ensaios imunofluorescência pode-se observar que as cCPGs masculinas possuem baixa detecção do anticorpo POU5F1 (Figura 9, 10 e 11) (Tabela 5). As células que mostraram positividade para este marcador possuíam como características morfológicas esféricas ou arredondadas com núcleos grandes, características que assemelham-se as células germinativas. Também pode-se visualizar imunopositividade para POU5F1 nas regiões do mesentério e na aorta dorsal (Figura 12).

Para o marcador de membrana DDX4 foram encontrados apenas duas células positivas nas CGPs nos embriões com 27-28 e 30 dias de gestação (Figura 11 e 13)) (Tabela 5). Também, visualizou-se aparente expressão de DDX4 na região do mesentério no embrião de 27-28 dias de gestação (Figura 12). Enquanto, que para o marcador citoplasmático DAZL visualizou-se imunopositvidade nas CGPs no embrião de 30 dias de gestação com co-localização positiva da proteína POU5F1 (Figura 13) (Tabela 6). Não houve existência do marcador DPPA3 em todos os estágios embrionários.

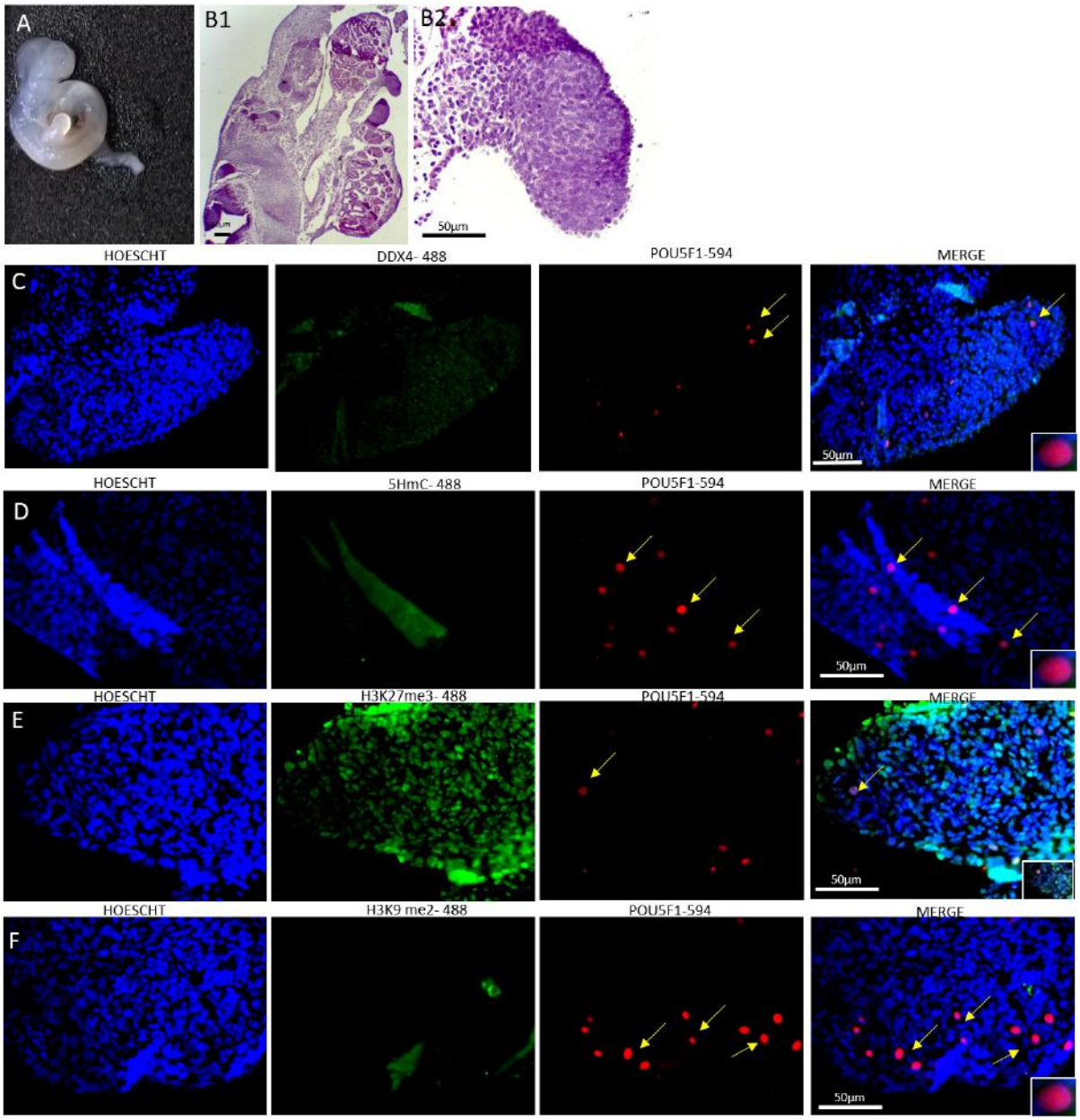
Para o perfil epigenético das marcas repressivas de histonas utilizamos os anticorpos H3K9me2 e H3K27me3 com dupla marcação para o anticorpo germinativo POU5F1. Para o anticorpo H3K27me3 verificou-se imuno positividade nas células germintivas e nas células somáticas em todos os periodos embrionários. Contudo, para o anticorpos H3K9me2 não houve marcação nas CGPs e nas células somáticas

Através dos anticorpos de 5mC e 5hmC foram analisados a dinâmica de metilação e hidroximetilação da citosiana durante o desenvolvimento embrionário e fetal das cCGPs. Pela a técnica de imunohistoquímica foi visualizado a metilação do DNA nas células germinativas e nas células somáticas durante diferentes estágios do desenvolvimento embrionário e fetal. No embrião de 22 dias de gestação não houve quaisquer marcações nas células cCGPs e nas células somáticas que compõe o tecido das cristas gônadais (Figura 14). Contudo, nos períodos seguintes com, 25, 27-28 e 30 dias de gestação houve um aumento da marcação para o anticorpo 5mC nos núcleos das células que compõem a região da crista gônadal (Figura 14). Para o anticorpo 5hmC foram realizados os ensaios de imunufluorescência com co-localização para o anticorpo germinativo POU5F1 e nossos resultados mostram que não houve marcação do anticorpo 5hmC nas células germinativas e nas células somáticas durante todos os períodos embrionários. Permanecendo, somente a marcação nas células germinativas para o anticorpo POU5F1 (Figura 9,10,11 e 13).

Devido ao anticorpo H3K27me3^{+} estar presente em todo o tecido da crista gônadal, fica inviavel quantificar o número exato de células presentes para este anticorpo. Aos marcadores

5hmC e H3K9me2 houve ausente marcação, deste modo não foi quantificado o número de células germinativas.

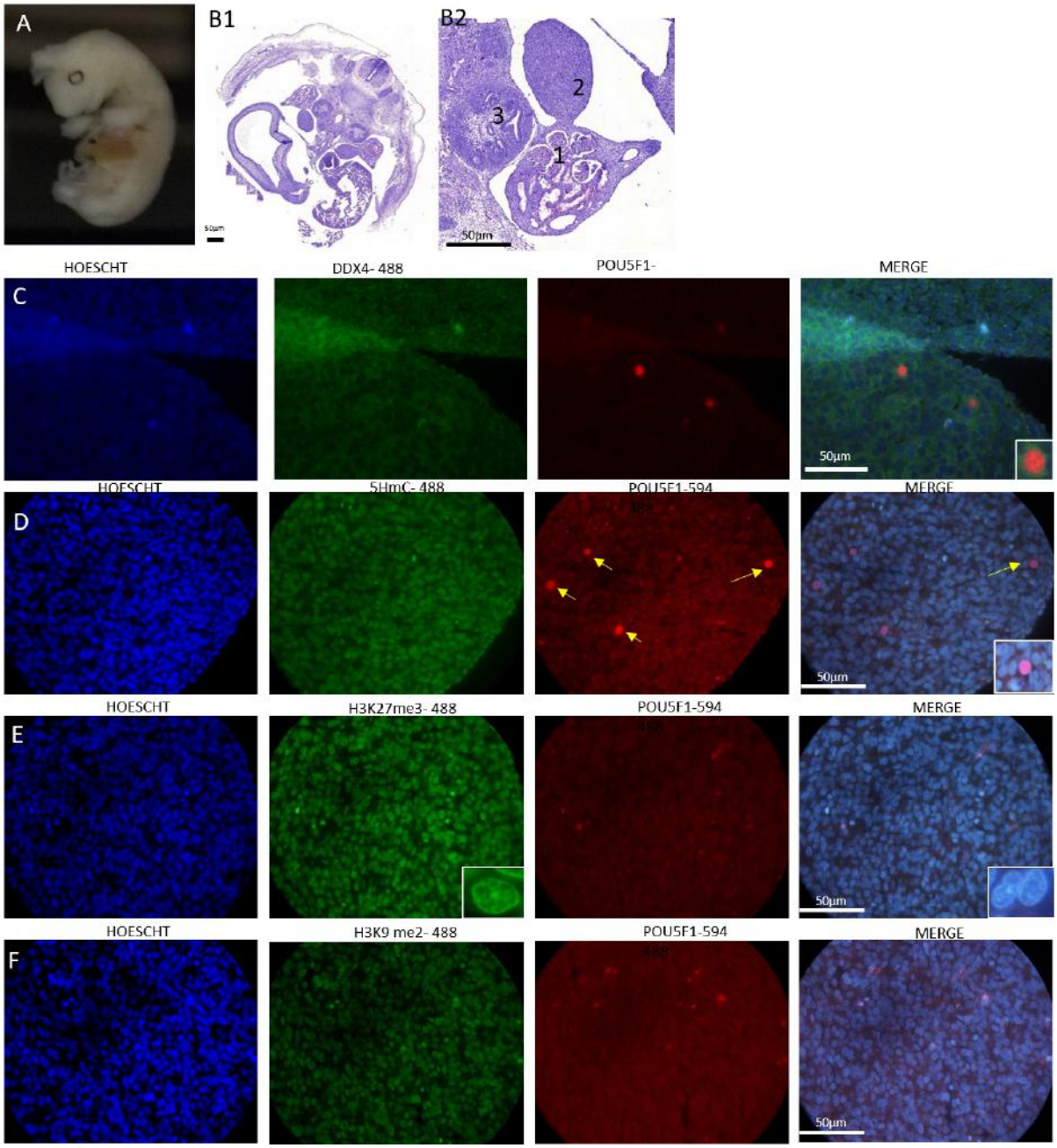
Figura 7 - Morfologia e Imunofluorescência do embrião canino com 22 dias de gestação. (CR 1cm).



Fonte: SOUZA, A.F.; 2017

Legenda: Morfologia e Imunofluorescência do embrião canino com 22 dias de gestação. (1cm). Figura A fotomacrografia da secção longitudinal do embrião canino macroscopicamente. Figura B1, fotomicrografia da secção longitudinal do Mesonefro e Crista gônadal 10X (Barra:50µm) e B2 Crista gônadal 40X (Barra:50µm). Figura C demonstra inexistência da proteína germinativa DDX4 e a imunomarcação nuclear da proteína pluripotente e germinativa POU5F1 na região crista gônadal (seta amarela). As figura D, E e F demonstram a seção de imunofluorescência para o marcador epigenéticos 5hmC, H3K27me3 e H3K9me2 respectivamente com co-localização para o anticorpo pluripotente POU5F1. Figura D, demonstra inexistência do anticorpo 5hmC e positivo para a proteína nuclear POU5F1 (seta amarela). Figura E elucida imunofluorescência para a modificação da histona H3K27me3 em todo tecido da crista gônadal e positiva marcação para POU5F1 (seta amarela). Figura F observa-se inexistência da proteína para o anticorpo H3K9me2 e positivo para POU5F1 (seta amarela). 60X (Barra:50µm).

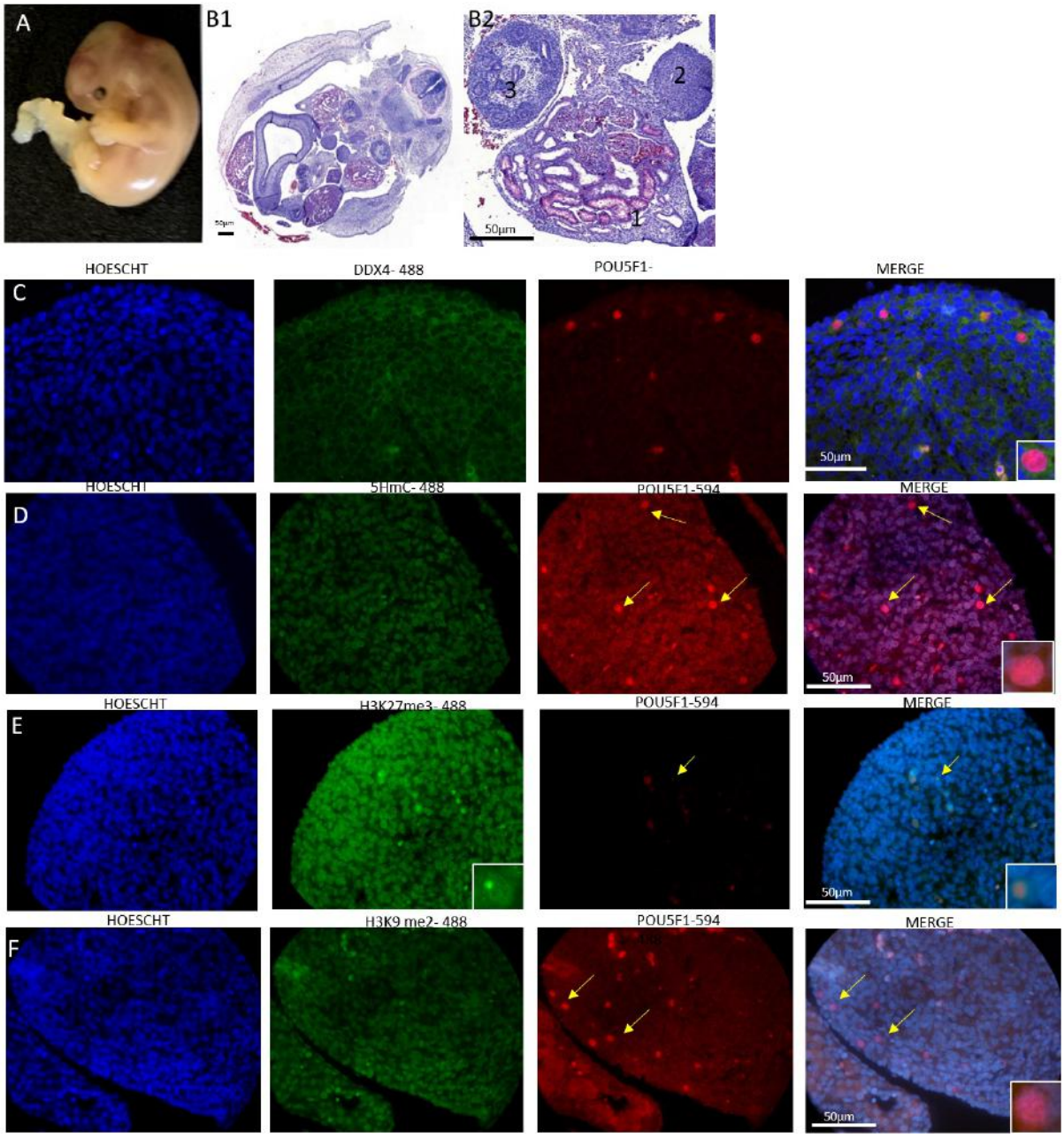
Figura 8 - Morfologia e Imunofluorescência do embrião canino com 25 dias de gestação. (CR 1,5cm).



Fonte: SOUZA, A.F.; 2017

Legenda: Morfologia e Imunofluorescência do embrião canino com 25 dias de gestação. (1,5cm). Figura A fotomacrografia da secção longitudinal do embrião canino. Figura B1, fotomicrografia da secção sagital do embrião canino 4X (Barra:50µm) e B2 evidenciando 1-mesonefro, 2-crista gônadal e 3-metanefro 40X (Barra:50µm). Figura C, demonstra inexistência da proteína germinativa DDX4 e imunomarcação nuclear da proteína pluripotente e germinativa POU5F1 na região crista gônadal (seta amarela). As figura D, E e F demonstram a seção de imunofluorescência para o marcador epigenéticos 5hmC, H3K27me3 e H3K9me2 com co-localização para o anticorpo pluripotente POU5F1. Figura D, demonstra inexistência do anticorpo 5hmC e positivo para a proteína nuclear POU5F1 (seta amarela). Figuras E destaca a imunofluorescência para a modificação da histona H3K27me3 em todo tecido da crista gônadal e inexistência da proteína POU5F1. Figura F observa-se inexistência para o anticorpo de histona H3K9me2 e para POU5F1. 60X (Barra:50µm).

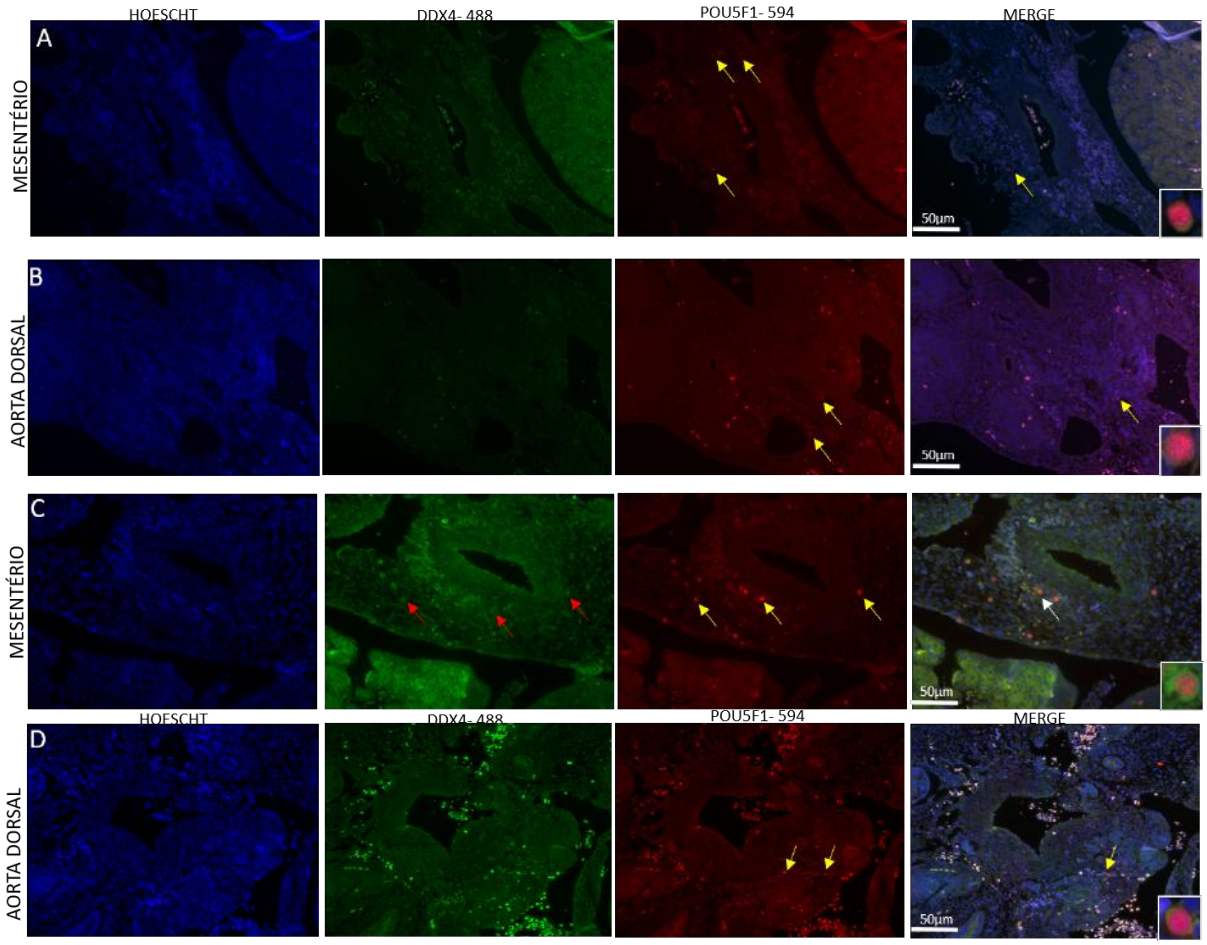
Figura 9 - Morfologia e Imunofluorescência do embrião canino com 27-28 dias de gestação. (CR 2cm).



Fonte: SOUZA, A.F.; 2017

Legenda: Morfologia e Imunofluorescência do embrião canino com 27-28 dias de gestação. (2cm). Figura A fotomacrografia da secção longitudinal demonstrando o embrião macroscopicamente. Figura B1, fotomicrografia da secção sagital do embrião canino 4X (Barra:50µm) e B2 evidenciando 1-mesonefro, 2-crista gônadal e 3-metanefro.40X (Barra:50µm). Figura C, demonstra inexistência da proteína germinativa DDX4 e imunomarcação nuclear da proteína pluripotente e germinativa POU5F1 na região crista gônadal (seta amarela). Figura D, E e F demonstra a seção de imunofluorescência para o marcador epigenéticos 5hmC, H3K27me3 e H3K9me2 com co-localização para o anticorpo pluripotente POU5F1. Figura D, demonstra inexistência do anticorpo hidroximetilação 5hmC e positivo para a proteína nuclear POU5F1 (seta amarela). Figuras E mostra imunofluorescência para a modificação da histona H3K27me3 em todo tecido da crista gônadal e marcação para POU5F1 (seta amarela). Figura F observa-se inexistência para o anticorpo de histona H3K9me2 e positivo para proteína POU5F1 (seta amarela). 60X (Barra:50µm).

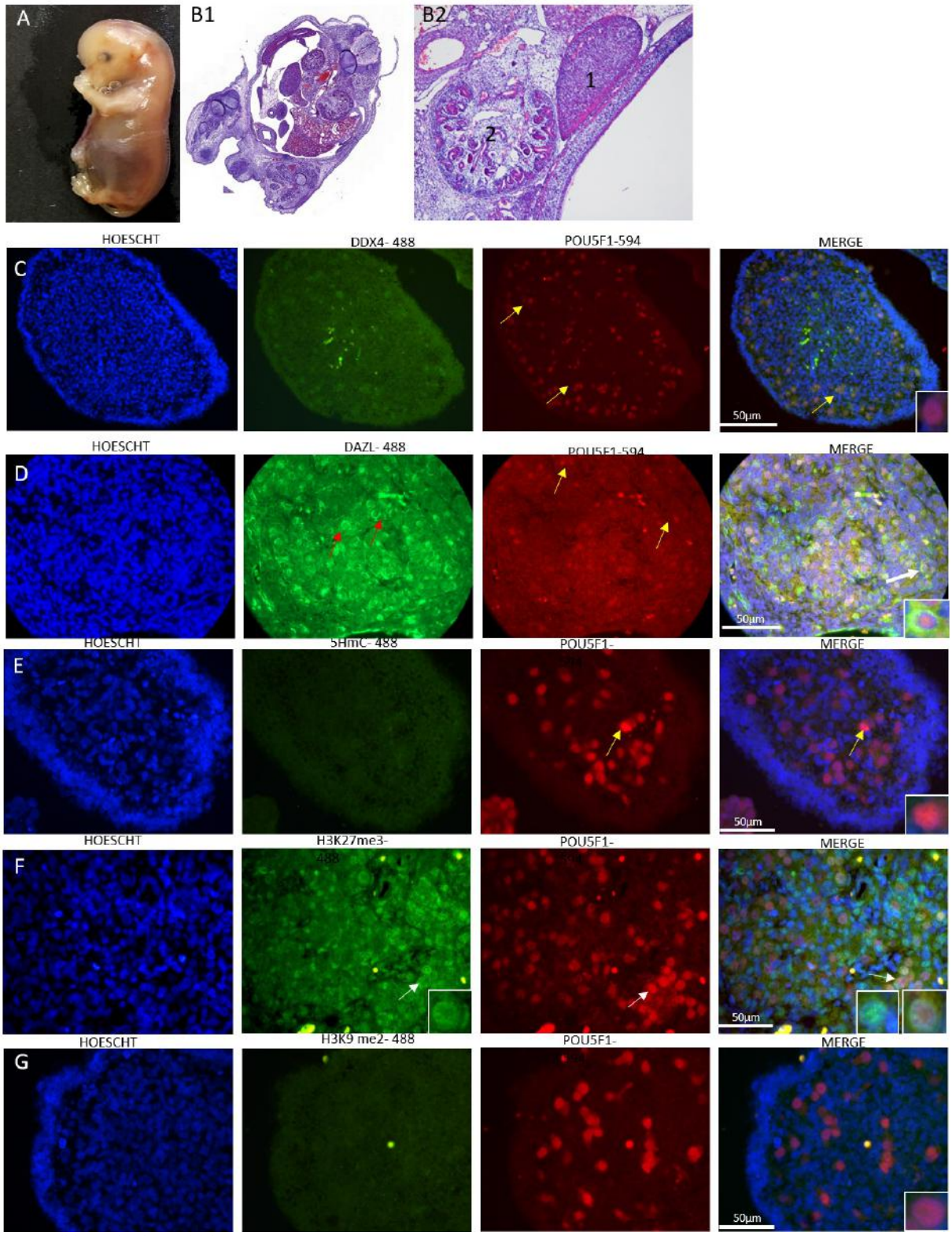
Figura 10 - Imunofluorescência do embrião canino com 25 e 27-28 dias de gestação na região do mesentério e aorta dorsal.



Fonte: SOUZA, A.F.; 2017

Legenda: Imunofluorescência do região do mesentério e aorta dorsal de embriões caninos com 25 e 27-28 dias de gestação.. Na figura A, demonstramos a região do mesentério no embrião com 25 dias de gestação, destacando na seta amarela a imunopositividade para o marcador POU5F1. A figura B, destaca a região da aorta dorsal no embrião com 25 dias de gestação, seta amarela a imunopositividade para o marcador POU5F1. A figura C, determina a região do mesentério no embrião com 27-28 dias de gestação, destacando na seta vermelha o marcador DDX4 e na seta amarela POU5F1 e a merge na seta branca. A figura C, mostra a região da aorta dorsal no embrião com 27-28 dias de gestação, destacando na seta amarela a imunopositividade para o marcador POU5F1. As figuras A,B,C e D 20X (Barra:50µm).

Figura 11- Morfologia e Imunofluorescência do embrião canino com 30 dias de gestação. (CR 3cm).



Fonte: SOUZA, A.F.; 2017

Legenda: Morfologia e Imunofluorescência do embrião canino com 30 dias de gestação. (3cm). Figura A fotomacrografia da secção longitudinal do embrião canino demonstrando o embrião macroscopicamente. Figura B1, fotomicrografia da secção sagital do embrião 4X (Barra:50µm) e B2 evidenciando 1-crista gônadal e 2-metanefro.40X (Barra:50µm). Figura C, demonstra inexistência da proteína germinativa DDX4 e imunomarcação nuclear da proteína pluripotente e germinativa POU5F1 na região crista gônadal (seta amarela). Figura D, imunomarcação positiva da proteína germinativa DAZL (seta vermelha) e imunomarcação nuclear da proteína pluripotente e germinativa POU5F1 na

região crista gônadal (seta amarela). Ambas as proteínas DAZL e POU5F1 tiveram co-localização evidencia na *merge* (seta branca). Figuras E, F e G demonstram a seção de imunofluorescência para o marcador epigenéticos 5hmC, H3K27me3 e H3K9me2 respectivamente, com co-localização para o anticorpo pluripotente POU5F1. Figura E, demonstra demonstra inexistência do anticorpo 5hmC e positivo para a proteína nuclear POU5F1 (seta amarela). Figuras F salienta imunofluorescência para a modificação da histona H3K27me3 em todo tecido da crista gônadal e marcação para POU5F1 (seta amarela). Figura G observa-se demonstra inexistência da do anticorpo de histona H3K9me2 e positivo para proteína POU5F1 (seta amarela). 60X (Barra:50µm).

Tabela 5 – Quantificação das células cCGPs nas cristas gônadais do anticorpo POU5F1 e DDX4.

Id.	**Sexo**	**Tamanho**	**Dias de gestação**	**Secção**	**POU5F1 +**	**%**	**DDX4**	**%**	**Número total de cCGPs**
AQ	Macho	1 cm	22	3	19	100	0	0	19
AB	Macho	1,5cm	25-26	3	38	100	0	0	38
AF	Macho	1,5cm	25-26	3	42	100	0	0	42
AL	Macho	1,5cm	25-26	3	35	100	0	0	35
AC	Macho	2cm	27-28	3	49	96,07843	1	3,921569	50
AD	Macho	3cm	30	3	210	91,70306	2	8,296943	212

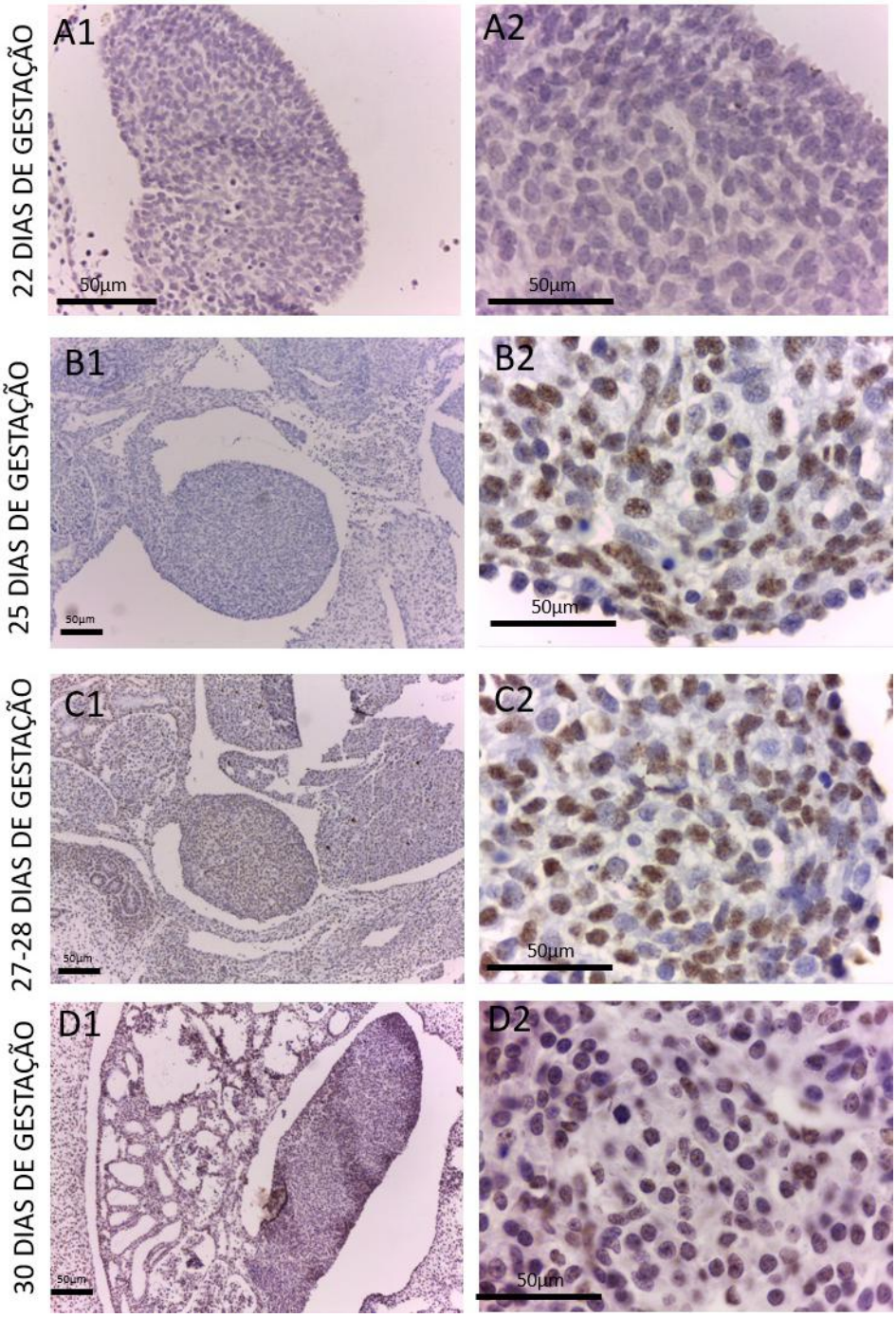
Fonte: SOUZA, A.F.; 2017

Tabela 6 - Quantificação das células cCGPs nas cristas gônadais do anticorpo POU5F1 e DAZL.

Id	**Sexo**	**Tamanho**	**Dias de Gestação**	**Seção**	**POU5F1 +**	**%**	**DAZL+**	**%**	**POU5F1+ DAZL+**	**%**	**Número total de cCGPs**
AQ	Macho	1 cm	22	3	16	100	0	0	0	0	16
AB	Macho	1,5cm	25-26	3	34	100	0	0	0	0	34
AF	Macho	1,5cm	25-26	3	37	100	0	0	0	0	37
AL	Macho	1,5cm	25-26	3	32	100	0	0	0	0	32
AC	Macho	2cm	27-28	3	56	100	0	0	0	0	56
AD	Macho	3cm	30	3	200	43,48	180	39,13	80	17,39	460

Fonte: SOUZA, A.F.; 2017

Figura 12 - Imunohistoquímica para o anticorpo 5mC.



Fonte: SOUZA, A.F.; 2017

Legenda: :Imunohistoquímica para o anticorpo 5mC, demonstrando a positiva marcação na crista gônadal nas idades de 25, 27-28 e 30 dias de gestação. Houve inexistência do anticorpo 5mC na idade de 22 dias de gestação. Figuras A1,B1,C1 e D1 10X ((Barra:50µm), Figuras A2,B2,C2 e D1 100X (Barra:50µm).

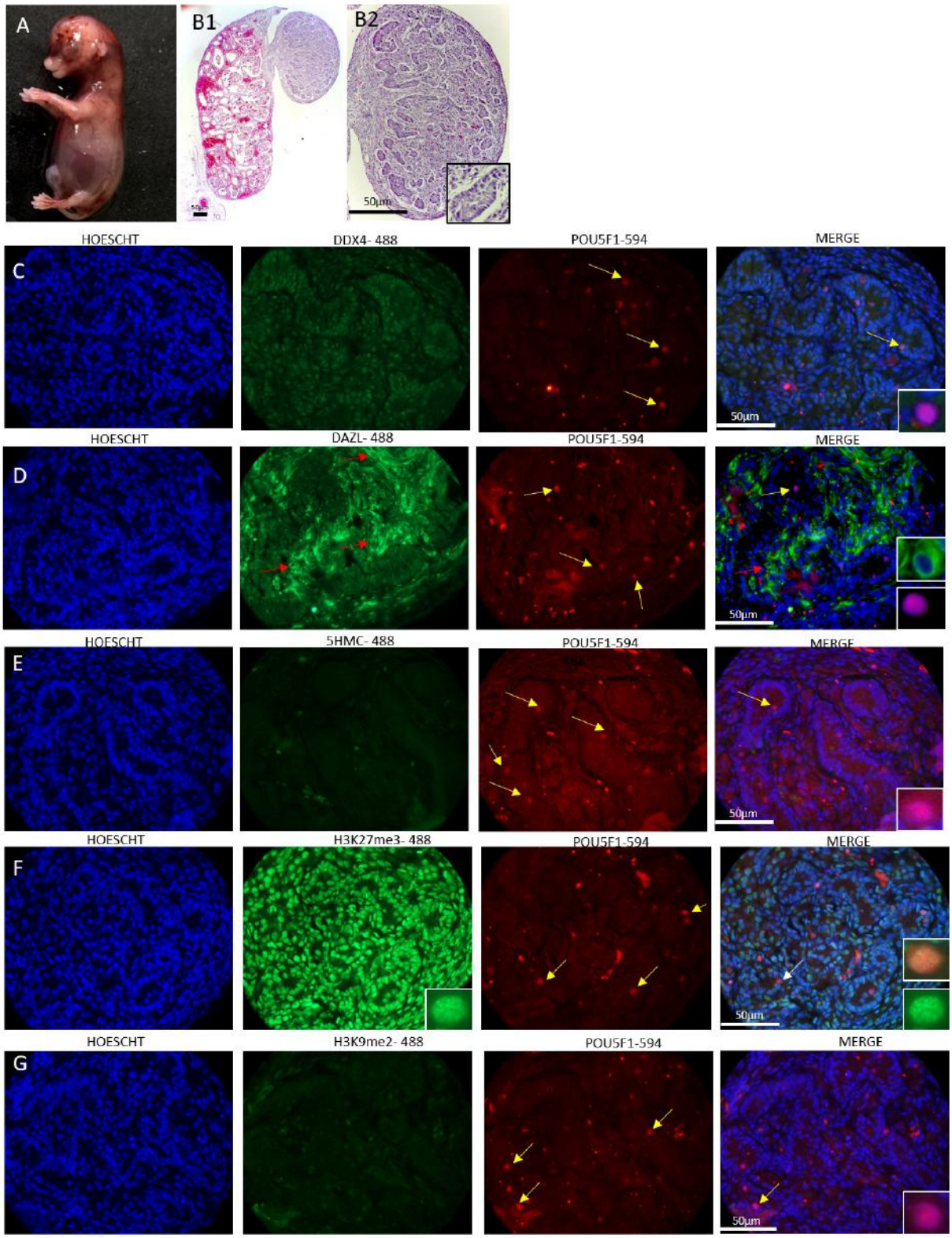
O segundo periodo (35-40 pF) representa o começo da diferenciação sexual, no qual pode-se distinguir macroscopicamente os sexos. As gônadas masculinas submetem-se a grandes mudanças em sua morfogenesi e podem ser chamadas de gonócitos.Aos 35 dias de gestação, os cordões medulares se diferenciaram em cordões seminíferos e ocorre a presença das células intersticiais.

Neste estágio de gestação, POU5F1^{+} foi detectado no núcleo das células germinativas no interior dos cordões seminíferos (Figura 15 e 16) (Tabela 7). Poucas CGPs apresentaram positividade para o anticorpo DDX4, havendo também única e dupla marcação com o anticorpo POU5F1 (Figura 15 e 16) (Tabela 7). Ao contrário de DDX4, todas as CGPs obtiveram a imuno-expressão do marcador germinativo DAZL,sendo que a maioria tiveram única ou dupla expressão dos anticorpos POU5F1 e DAZL. CGPs, DAZL^{+} foram encontradas no interior do citoplasma das CPGs (Figura 15 e 16) (Tabela 8).

Os marcadores epigenéticos apresentaram os mesmos perfis do grupo anteiror; com intensa marcação de H3K27me3 nos núcleos do tecido da crista gônadal e na região dos cordões seminíferos. A marcação para POU5F1 foi visualizada somente nas células espermatogôniais dos cordões seminíferos, os marcadores 5hmC e H3K9me2 continuaram ausentes (Figura 15 e 16), enquanto que, 5mC houve clara marcação em todo os túbulos do testículo fetal. Contudo, nas células espermatogôniais dos cordões seminíferos não foram positivas para 5mC (Figura 17).

Devido ao anticorpo H3K27me3^{+} e 5mC estarem presentes em todo o tecido da crista gônadal, fica inviavel quantificar o número exato de células presentes para este anticorpo. Aos marcadores 5hmC e H3K9me2 houve ausente marcação, deste modo não foi quantificado o número de células germinativas.

Figura 13 - Morfologia e Imunofluorescência do embrião canino com 35 dias de gestação. (CR 3,5cm).

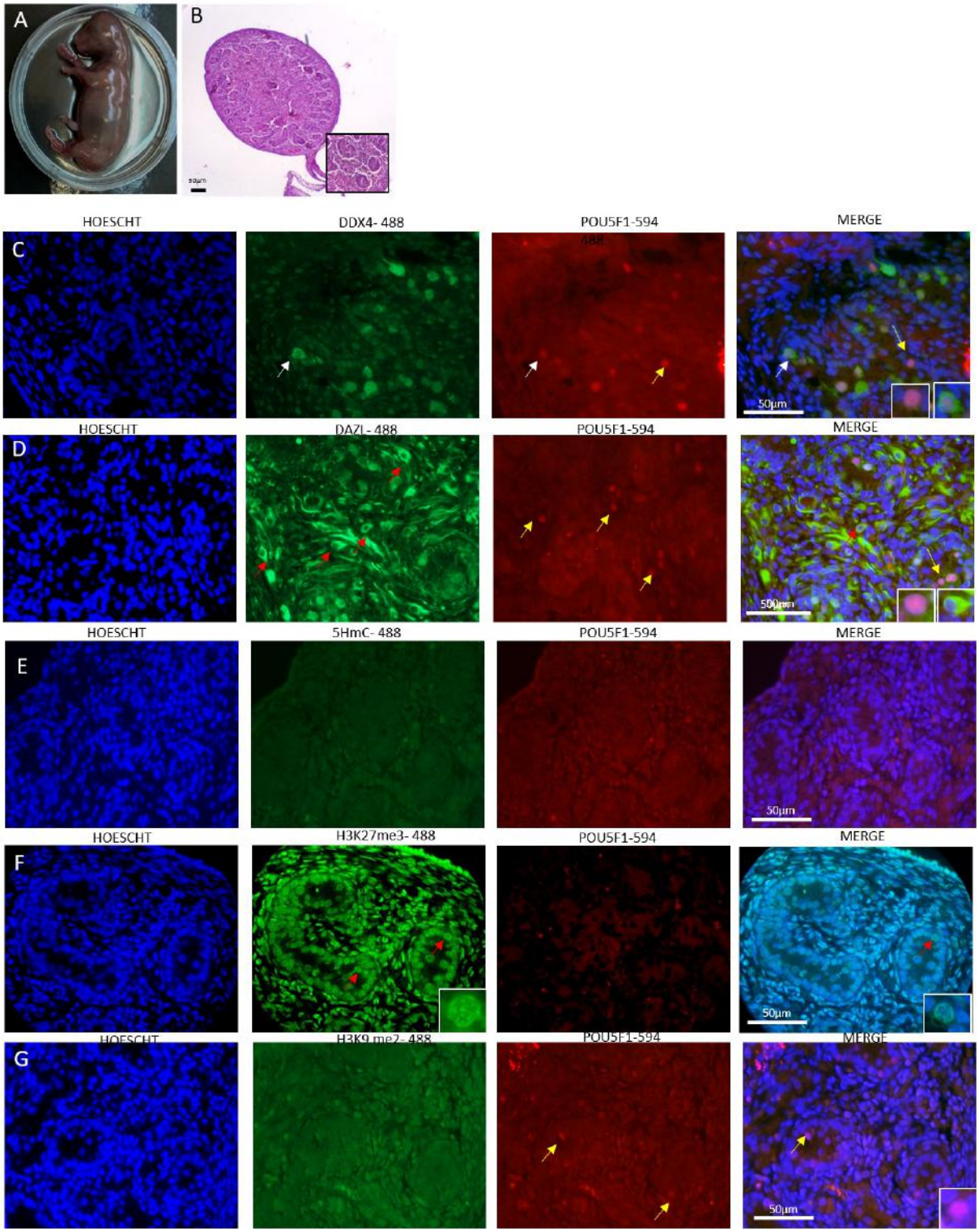


Fonte: SOUZA, A.F.; 2017

Legenda: Morfologia e Imunofluorescência do embrião canino com 35 dias de gestação. (3,5cm). Figura A fotomacrografia da secção longitudinal do embrião canino demonstrando o embrião macroscopicamente. Figura B1, fotomicrografia da secção longitudinal da crista gônadal 4X (Barra:50µm) e B2 evidenciando crista gônadal e os cordões medulares se diferenciaram em cordões seminíferos 10X e 100X(Barra:50µm). Figura C, demonstra inexistência da proteína germinativa DDX4 e imunomarcação nuclear da proteína pluripotente e germinativa POU5F1 na região dos cordões

seminíferos (seta amarela). Figura D, imunomarcação positiva da proteína germinativa DAZL (evidencia em seta vermelha) e imunomarcação nuclear da proteína pluripotente e germinativa POU5F1 na região dos cordões seminíferos (seta amarela). Figuras E, F e G demonstram a seção de imunofluorescência para o marcador epigenéticos 5hmC, H3K27me3 e H3K9me2 com co-localização para o anticorpo pluripotente POU5F1. Figura E, demonstra demonstra inexistência da proteína do anticorpo 5hmC e positivo para a proteína nuclear POU5F1 (seta amarela). Figura F destaca imunofluorescência nuclear para a modificação da histona H3K27me3 em todo tecido da crista gônadal e na região dos cordões seminíferos. A marcação para POU5F1 é visualizada somente nas células espermatogôniais dos cordões seminíferos (seta amarela). Na figura G observa-se inexistência da proteína do anticorpo de histona H3K9me2 e positivo para proteína POU5F1 nas células espermatogôniais (seta amarela). 60X (Barra:50µm).

Figura 14 - Morfologia e Imunofluorescência do embrião canino com 40 dias de gestação. (CR 4cm).



Fonte: SOUZA, A.F.; 2017

Legenda: Morfologia e Imunofluorescência do embrião canino com 40 dias de gestação. (4cm). Figura A fotomacrografia da secção longitudinal do embrião demonstrando o embrião macroscopicamente e figura B, fotomicrografia da secção longitudinal da crista gônadal evidenciando o testísculo neonatal canino e os cordões seminíferos 10X e 100X (Barra:50µm).. Na figura C destacamos a imunomarcação positiva da proteína germinativa DDX4 e imunomarcação nuclear da proteína pluripotente e germinativa POU5F1 na região dos cordões seminíferos (seta amarela). Figura D, imunomarcação positiva da proteína germinativa DAZL (seta vermelha) e imunomarcação nuclear da proteína pluripotente e germinativa POU5F1 na região dos cordões seminíferos (seta amarela). Figuras E, F e G

demonstram a seção de imunofluorescência para o marcador epigenéticos 5hmC, H3K27me3 e H3K9me2 respectivamente com co-localização para o anticorpo pluripotente POU5F1. Figura E, demonstra inexistência da do anticorpo 5hmC e positivo para a proteína nuclear POU5F1 (seta amarela). Figuras F mostra imunofluorescência nuclear para a modificação da histona H3K27me3 em todo tecido da crista gônadal e na região dos cordões seminíferos. A marcação para POU5F1 é visualizada somente nas células espermatogônias dos cordões seminíferos (seta amarela). Figura G observa-se inexistência do anticorpo de histona H3K9me2 e positivo para proteína POU5F1 nas células espermatogôniais (seta amarela). 60X (Barra:50µm).

Tabela 7 - Quantificação das células cCGPs nas cristas gônadais do anticorpo POU5F1 e DDX4.

Id	Sexo	Tamanho	Dias de Gestação	Seção	POU5F1 +	%	DDX4+	%	POU5F1+ DDX4+	%	Número total de cCGPs
AO	Macho	3,5 cm	35	3	92	86,69	8	8	0	0	100
BA	Macho	4 cm	40	3	43	77,58	9	017,30	0	0	52

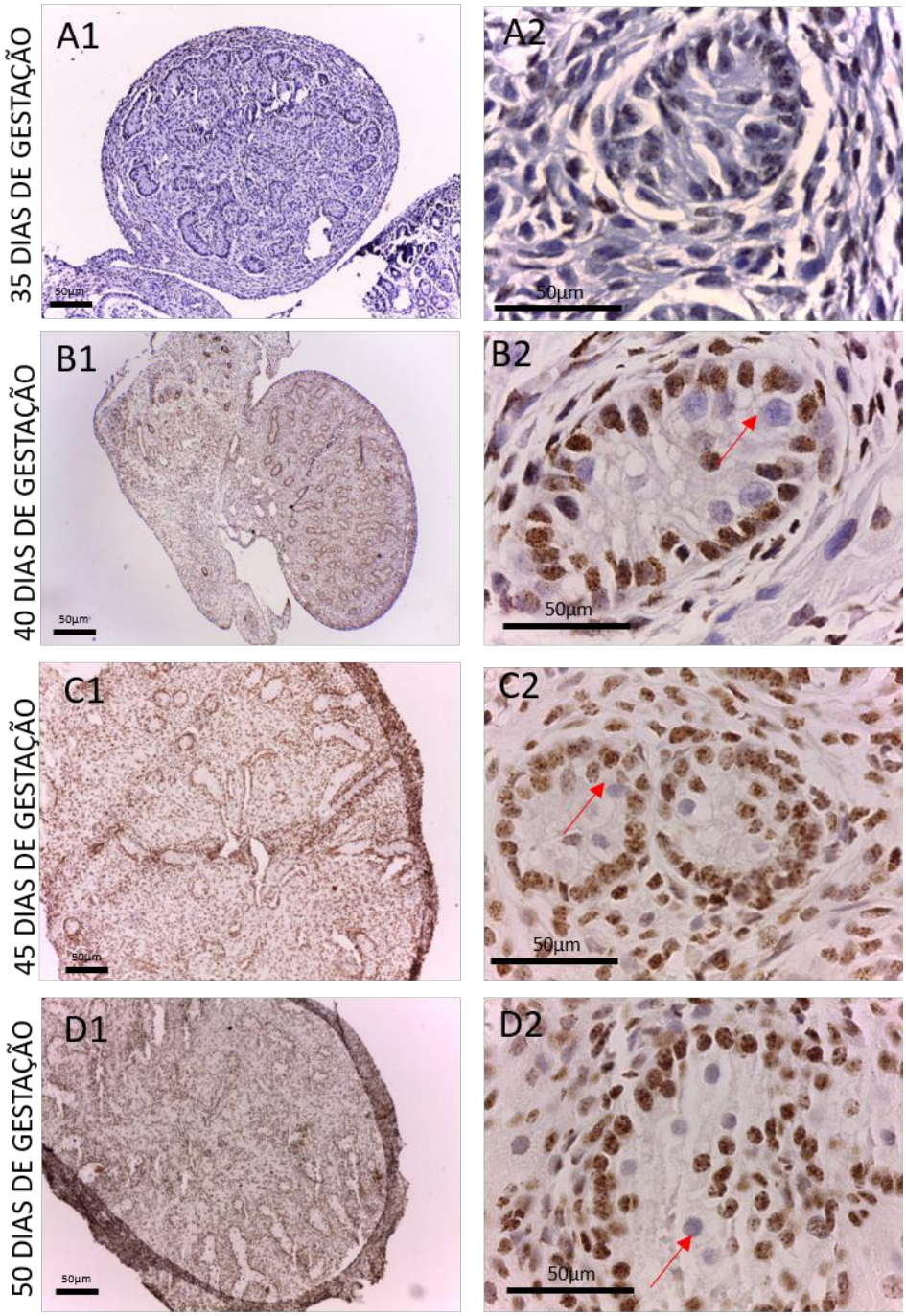
Fonte: SOUZA, A.F.; 2017

Tabela 8 - Quantificação das células cCGPs nas cristas gônadais do anticorpo POU5F1 e DAZL.

Id	Sexo	Tamanho	Dias de Gestação	Seção	POU5F1 +	%	DAZL+	%	POU5F1+ DAZL+	%	Número total de cCGPs
AO	Macho	3,5 cm	35	3	87	36,70	150	63,29	0	0	237
BA	Macho	4 cm	40	3	39	17,41	185	82,59	0	0	224

Fonte: SOUZA, A.F.; 2017

Figura 15 - Imunohistoquímica para o anticorpo 5mC.



Fonte: SOUZA, A.F.; 2017

Legenda: Imunohistoquímica para o anticorpo 5mC, demonstrando a positiva marcação em todo tecido da crista gônadal e na região dos cordões seminíferos, exceto nas células espermatogônias. Figuras A2,B2,C2 e D1 evidenciando na seta em vermelho a negativa marcação do anticorpo 5mC nas células espermatogôniais dos cordões seminíferos fetais caninos. Figuras A1,B1,C1 e D1 10X (Barra:50µm). Figuras A2,B2,C2 e D1 100X (Barra:50µm).

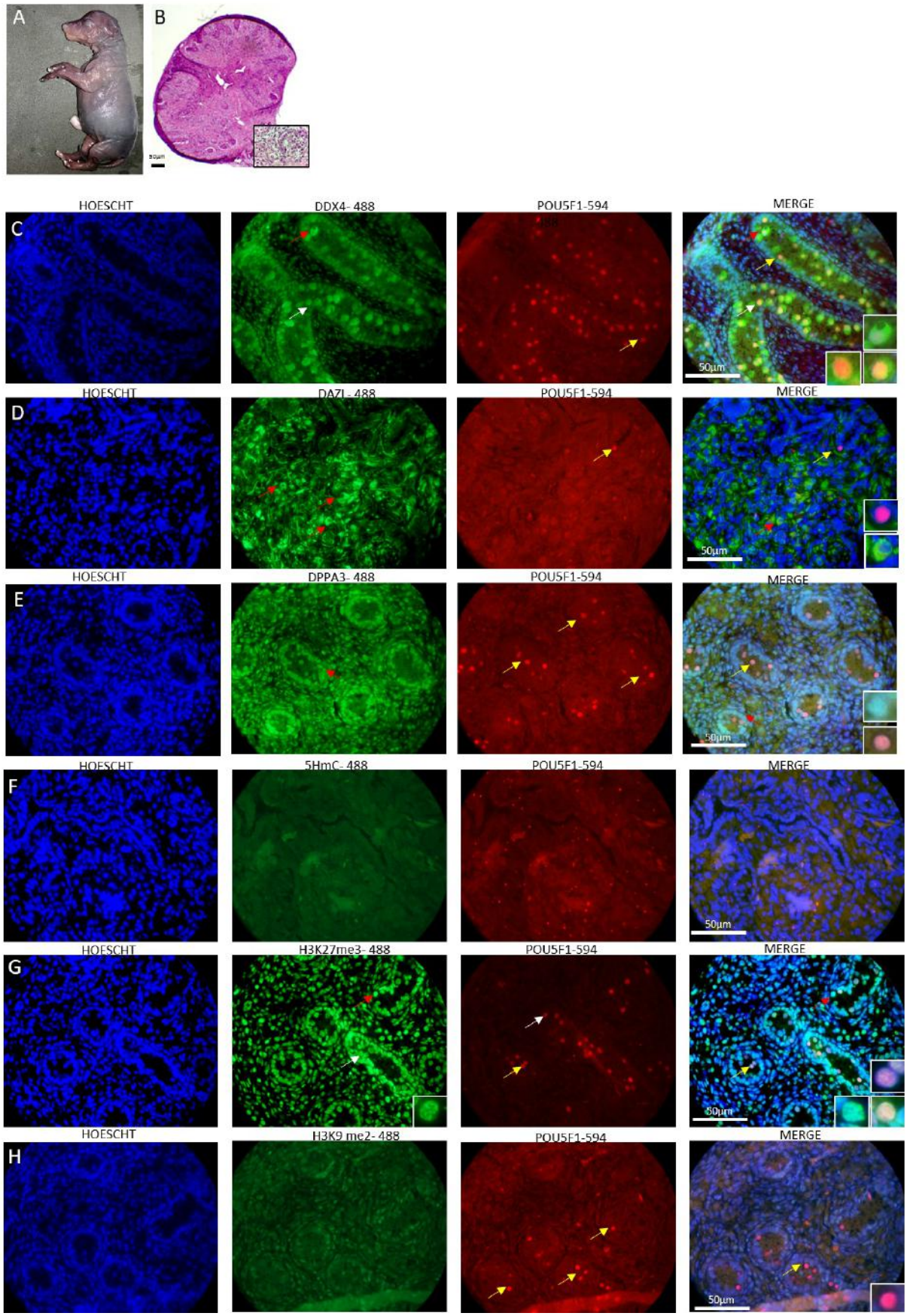
No terceiro periodo (45-50pF), as gônadas apresentam uma morfologia simples de precursoras do testículo, podendo ser chamadas de testículos fetais. As CGPs podem ser nomeadas neste momento de pré espermatogonias e se localizam-se nos cordões testiculares,

Nos testiculos fetais, foram possíveis visualizar DDX4^{+} com marcação de membrana nos cordões seminíferos (Figura 18 e 19) (Tabela 9). Para a proteína citoplasmática DAZL obteve-se simples e dupla marcação com co-localização do marcador nuclear POU5F1^{+} nos cordões seminíferos (Figura 18 e 19) (Tabela 10). Destacamos que neste terceiro estágio obteve-se a presença da proteína nuclear DPPA3 em toda a região das cristas gônadais e nos cordões seminíferos (Figura 18 e 19).

Sobre o perfil epigenético, a expressão de H3K27me3+ com co-localização ou não de POU5F1^{+} permanece continua nos cordões seminíferos e no tecido da crista gônadal . Aos 45 dias de gestação não houve positividade para os marcadores 5hmC e H3K9me2. Contudo, aos 50 dias de gestação aproximadamente 24 células foram positivas para o anticorpo 5hmC e aproximadamente 13 células foram positivas para o anticorpo H3K9me2 na região da crista gônadal e no interior do cordão seminífero (Figura 18 e 19). O padrão de marcação do anticorpo de metilação 5mC permaneceu o mesmo do que o segundo grupo (Figura 17).

Devido ao anticorpo DDPA3, H3K27me3^{+} e 5mC terem sido presente em todo o tecido da crista gônadal, fica inviavel quantificar o número exato de células presentes para este anticorpo. Aos marcadores 5hmC e H3K9me2 houve ausente marcação, deste modo não foi quantificado o número de células germinativas.

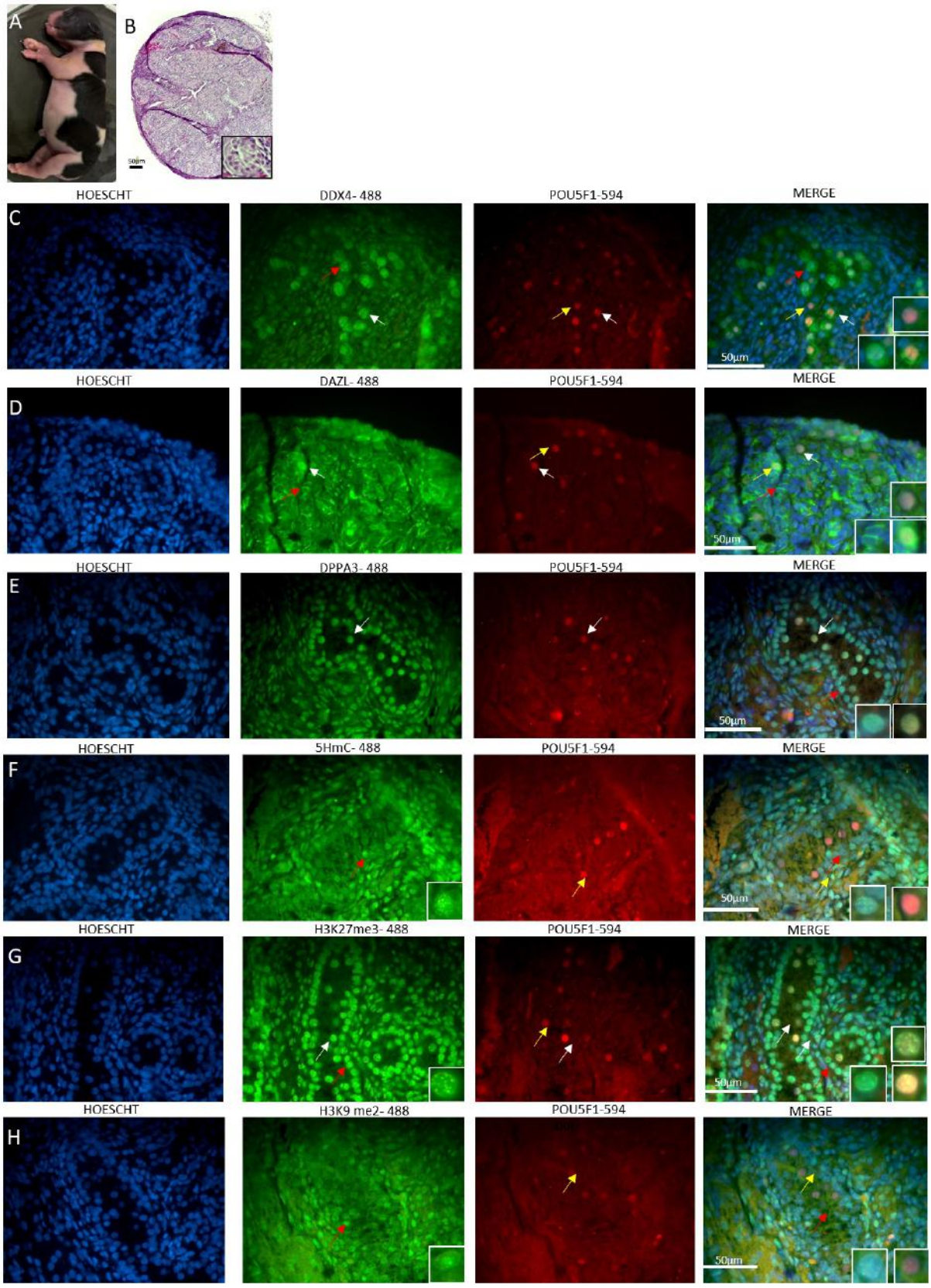
Figura 16 - Morfologia e Imunofluorescência do embrião canino com 45 dias de gestação. (CR 7cm).



Fonte: SOUZA, A.F.; 2017

Legenda: Morfologia e Imunofluorescência do embrião canino com 45 dias de gestação. (7cm). Figura A fotomacrografia da secção longitudinal do embrião canino demonstrando o embrião macroscopicamente. Figura B, fotomicrografia da secção longitudinal da crista gônadal evidenciando o testísculo neonatal canino e os cordões seminíferos 10X e 100X (Barra:50µm). Figura C, imunomarcação positiva da proteína germinativa DDX4 e imunomarcação nuclear da proteína pluripotente e germinativa POU5F1 na região dos cordões seminíferos (seta amarela). Figura D, imunomarcação positiva da proteína germinativa DAZL (seta vermelha) e imunomarcação nuclear no da proteína pluripotente e germinativa POU5F1 na região interior dos cordões seminíferos (seta amarela). Figura E marcação nuclear para o anticorpo DPPA3 na região da crista gônadal e no cordão seminífero e POU5F1 na região interior dos cordões seminíferos (seta amarela). Figuras F, G e H demonstram a seção de imunofluorescência para o marcador epigenéticos 5hmC, H3K27me3 e H3K9me2 respectivamente com co-localização para o anticorpo pluripotente POU5F1. Figura F, demonstra inexistência do anticorpo 5hmC e para a proteína nuclear POU5F1. Figuras G mostra imunofluorescência nuclear para a modificação da histona H3K27me3 em todo tecido da crista gônadal e na região dos cordões seminíferos. A marcação para POU5F1 é visualizada somente nas células espermatogônias dos cordões seminíferos (seta amarela). Figura H observa-se inexistência do anticorpo de histona H3K9me2 e positivo para proteína POU5F1 nas células espermatogôniais (seta amarela). 60X (Barra:50µm).

Figura 17 - Morfologia e Imunofluorescência do embrião canino com 50 dias de gestação. (CR 9 cm).



Fonte: SOUZA, A.F.; 2017

Legenda: Morfologia e Imunofluorescência do embrião canino com 50 dias de gestação. (9cm). Figura A fotomacrografia da secção longitudinal do embrião canino demonstrando: o embrião macroscopicamente. Figura B, fotomicrografia da secção longitudinal da crista gônadal evidenciando o testísculo neonatal canino e os cordões seminíferos 10X e 100X (Barra:50µm). Figura C,

imunomarcação positiva da proteína germinativa DDX4 e imunomarcação nuclear da proteína pluripotente e germinativa POU5F1 na região dos cordões seminíferos (seta amarela). Figura D, imunomarcação positiva da proteína germinativa DAZL (seta vermelha) e imunomarcação nuclear no da proteína pluripotente e germinativa POU5F1 na região interior dos cordões seminíferos (seta amarela). Figura E marcação nuclear para o anticorpo DPPA3 na região da crista gônadal e no cordão seminífero e POU5F1 na região interior dos cordões seminíferos (seta amarela). Figuras F, G e H demonstram a seção de imunofluorescência para o marcador epigenéticos 5hmC, H3K27me3 e H3K9me2 respectivamente com co-localização para o anticorpo pluripotente POU5F1. Figura F, demonstra positiva marcação na crista gônadal e na região dos cordões seminíferos para o anticorpo hidroximetilação 5hmC e para a proteína nuclear POU5F1. Figuras G mostra imunofluorescência nuclear para a modificação da histona H3K27me3 em todo tecido da crista gônadal e na região dos cordões seminíferos. A marcação para POU5F1 é visualizada somente nas células espermatogôniais dos cordões seminíferos (seta amarela). Figura H observa-se positiva imunofluorescência para o anticorpo de histona H3K9me2 e positivo para proteína POU5F1 nas células espermatogôniais (seta amarela). 60X (Barra:50µm).

Tabela 9 - Quantificação das células cCGPs nas cristas gônadais do anticorpo POU5F1 e DDX4.

Id	Sexo	Tamanho	Dias de Gestação	Seção	POU5F1 +	%	DDX4+	%	POU5F1+ DDX4+	%	Número total de cCGPs
AE-1	Macho	7 cm	45	3	38	74,50	13	25,49	0	0	51
AE-3	Macho	7 cm	45	3	40	80	10	20	0	0	50
AZ	Macho	9,5 cm	50	3	43	56,57	24	31,57	9	11,84	76

Fonte: SOUZA, A.F.; 2017

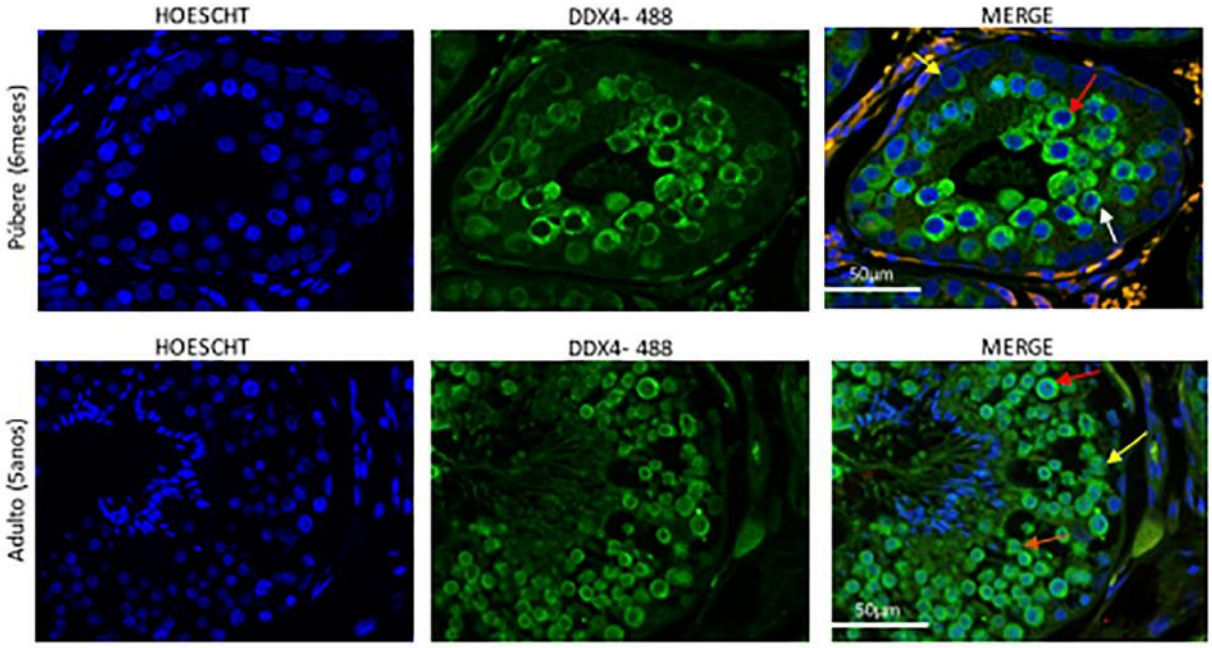
Tabela 10 - Quantificação das células cCGPs nas cristas gônadais do anticorpo POU5F1 e DAZL.

Id	Sexo	Tamanho	Dias de Gestação	Seção	POU5F1 +	%	DAZL+	%	POU5F1+ DAZL+	%	Número total de cCGPs
AE-1	Macho	7 cm	45	3	40	16,45	193	83,55	0	0	231
AE-3	Macho	7 cm	45	3	40	17,54	188	82,46	0	0	228
AZ	Macho	9,5 cm	50	3	47	15,71	216	72,24	36	12	299

Fonte: SOUZA, A.F.; 2017

Os testículos caninos nos estágios púberes (6 meses) e adultos (5 anos) foram utilizados como controle positivo para os anticorpos DDX4. Nos testículos púberes DDX4 foram imunopositivos nas células de *Sertolli*, espermatogônia e espermatócito. No testículo adulto, foram observados as marcações nas espermatogônia diferenciadas, espermatócitos e espermátide arrendondada (Figura 20). Como esperado, os controles negativos não apresentaram quaisquer marcações.

Figura 18 –Imunofluorescência dos testículos canino nos períodos púbere e adulto.

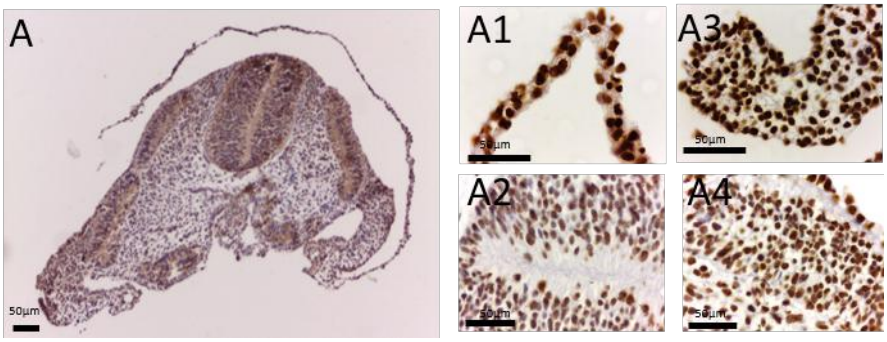


Fonte: SOUZA, A.F.; 2017

Legenda: Imunofluorescência dos testículos canino nos períodos púbere e adulto. No testículo púbere (6 meses) DDX4 é positivo nas células de *Sertolli* (seta amarela), espermatogônias (branca) e espermatócito (seta vermelha). No testículo adulto DDX4 foi positivo nas células espermatogônia diferenciadas (seta amarela), espermatócitos (seta vermelha) e espermátide arrendondada (seta laranja). 40X (Barra:50µm).

O embrião canino com 15 dias pF foram utilizados como controle positivo para os anticorpos DPPA3, 5mC, 5hmC, H3K27me3 e H3K9me2 (Figuras 19 e 20). Porém, para o anticorpo pluripotente e germinativo POU5F1 não houve quaisquer marcações durante esse estágio de desenvolvimento embrionário, tanto quanto utilizado técnica de imunofluorescência quanto por imunohistoquímica. O anticorpo POU5F1 utilizado nesse experimento é especifico para a espécie canina e, como visto nos resultados anteriores, a proteína POU5F1 estava presente nas gônadas embrionárias e fetais. Este resultado não influencia na falta de pluripotencialidade do embrião, pois durante esse período houve a marcação do anticorpo SOX2 na região do tubo neural do embrião. Desse modo, acredita-se que durante esse estágio de desenvolvimento embrionário não há imunomarcação ou expressão da proteína POU5F1.

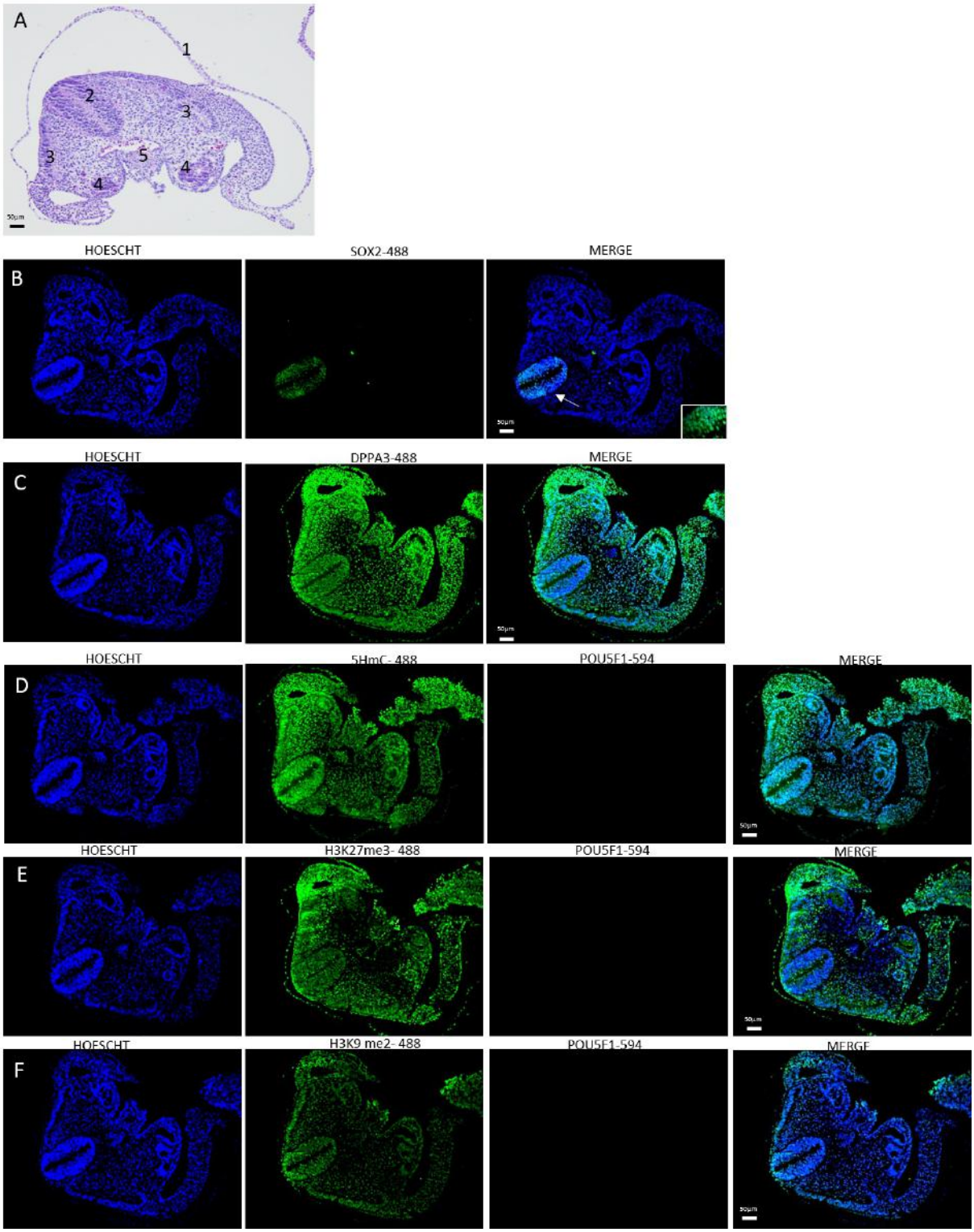
Figura 19 - Imunohistoquímica para o anticorpo 5mC do embrião canino com 15 dias de gestação. (6mm).



Fonte: SOUZA, A.F.; 2017

Legenda: Imunohistoquímica para o anticorpo 5mC do embrião canino com 15 dias de gestação. (6mm). Figura A, fotomicrografia da secção sagital do embrião canino demonstrando a imunomarcação nuclear para o anticorpo 5mC. 10X (Barra:50µm). Na figura A1 destacamos o Âmmnio; A2-Tubo neural; A3-Aorta Dorsal e A4-Somito, imunomarcados nuclear para o anticorpo 5mC. 60X (Barra:50µm).

Figura 20 - Morfologia e Imunofluorescência do embrião canino com 15 dias de gestação. (CR 6mm).



Fonte: SOUZA, A.F.; 2017

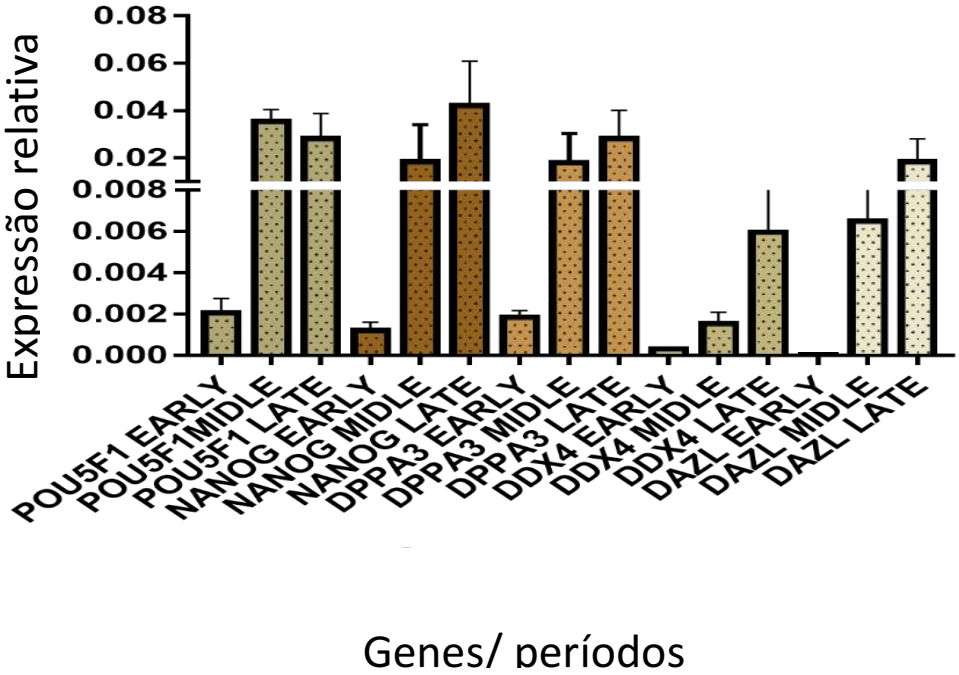
Legenda: Morfologia e Imunofluorescência do embrião canino com 15 dias de gestação. (6mm). Figura A fotomicrografia da secção sagital do embrião canino demonstrando: 1-Âmmnio 2-Tubo neural; 3-Somito; 4-Aorta Dorsal e 5-Aorta do cólon embrionário. Figura B, imunomarcação da proteína pluripotente SOX2 na região do tubo neural. Figura C, DPPA3 se mostra positivo em todo o embrião canino. Figuras D, E e F demonstram a seção de imunofluorescência para o marcador epigenéticos 5hmC, H3K27me3 e H3K9me2 respectivamente com co-localização para o anticorpo pluripotente POU5F1. Figura D, demonstra marcação em todo o embrião para o anticorpo hidroximetilação 5hmC e

negativo para POU5F1. Figuras E e F mostram imunofluorescência para a modificação da histona H3K27me3 e H3K9me2 e negativo para POU5F1. 10X (Barra:50µm).

6.2.3. Extração de RNA, síntese de cDNA e reação polimerase em cadeia em Tempo Real (RTq-PCR)

A expressão de alguns genes podem divergir durante o estágio de desenvolvimento e maturação das CGPs nas gônadas. Assim, as análises de PCR em tempo real foram realizadas nas gônadas embrionárias e fetais caninas para quantificar a real expressão dos marcadores relacionados a genes de pluripotência POU5F1 e NANOG e aos genes germinativos DPPA3, DDX4 e DAZL. Pode-se verificar que houve diferença de expressão dos genes pluripotentes e germinativos NANOG, POU5F1, DPPA3 e DAZL entre os estágios embrionários e fetal (Gráfico 1).

Gráfico 1 - Expressão dos genes pluripotentes e germinativos nas células germinativas no perido incial (early), intermediário (midle) e final (late).

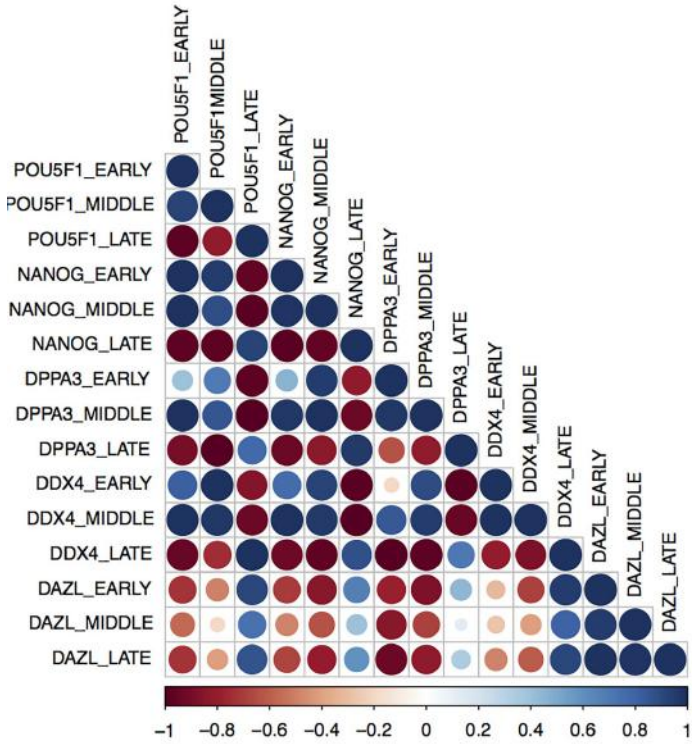


Fonte: SOUZA, A.F.; 2017.

A correlação da expressão gênica foi realizada a partir da equação de *Pearson* para o período inicial (early), intermediário (midle) and final (late) (figura 23), a expressão dos genes NANOG e POU5F1 foram positivamente correlacionadas em ambos os períodos. No período

fetal, houve correlação entre a expressão dos genes DDX4 e DPPA3 com o NANOG. Também se mostraram correlacionadas as expressão dos genes DAZL e DDX4.

Figura 23 – Correlation *Pearson*.



Legenda: Correlação de Pearson. *Heat map*, demonstrando a correlação dos genes pluripotentes e germinativos entre os períodos iniciais (early), intermediário (midle) e final (late). A barra de valores segue de -1 (em vermelho-negativamente corelacionados) a 1 (azul escuro-positivamente correlacionados).
Fonte: SOUZA, A.F.; 2017.

6.3 DISCUSSÃO

6.3.1 Dinâmica da expressão das células germinativas caninas durante os estágios embrionários e fetais

Desde 1977, a pesquisa com células germinativas tem sido realizada e a cada ano novas descobertas vêm sendo publicadas para a melhor compreensão do funcionamento e produção das células germinais primordiais (CGPs). Ao longo dos anos, vários mecanismos têm sido propostos para explicar a origem e a formação dos CGPs. Hoje, no entanto, é estabelecido que

estas células são especificadas como extra gônadais e que migram para se desenvolverem nas cristas genitais. Na espécie canina ainda não existe informação sobre o início de formação das células germinativas. Somente um único estudo dirigido por Gier; Marion, (1969), demostrou que as CGPs caninas aos 20 para 21 dias de gestação migram através do mesênquima entre o epitélio celômico. Estes achados também são encontrados em outras espécies como a de camundongos e humanos (MOLLGARD et al., 2010; McLAREN, 2003).

Em mamíferos, após as CGPs adentrarem para o interior do embrião, inicia-se seu processo de migração. Este processo é mediado por sinais indutores que auxiliam as CGPs chegarem ao seu destino final nas cristas gônadais. O desenvolvimento das cristas gônadais, nos seres humanos e camundongos, começa com o espessamento da superfície ventromedial dos mesonefros, pronefros e metanefros. Os mesonefros são constituídos por túbulos e ductos enrolados e suas quantidades variam de acordo com o desenvolvimento do embrião (HYTTEL, 2010). Conforme ocorre o desenvolvimento embrionário e fetal, os mesonefros diminuem de tamanho e a crista gônadal expande sua morfologia até a diferenciação dos gametas. Tais descrições morfológicas também acontecem durante o desenvolvimento das cristas gônadais de cães.

Assim, após as CGPs alcançarem as cristas gônadais, submetem-se a grandes transformações morfológicas, aumentando seu número celular até atingirem a diferenciação sexual em machos ou fêmeas. Durante este período de desenvolvimento, específicos marcadores e expressões de genes auxiliam a reconhecer cada estágio das CGPs. Alguns desses marcadores são conservados entre as espécies e outros podem ser expressos somente em uma determinada espécie. Como também existem casos de certas proteínas expressarem, em tempos diferentes, do desenvolvimento das CGPs de uma espécie para outra.

Na espécie canina para detectar as CGPs durante o primeiro período de desenvolvimento embrionário realizou-se a coloração de PAS no tecido das cristas gônadais. Porém, não houve quaisquer marcações ao redor no citoplasma das CGPs nas cristas gônadais que se assemelha-se às células germinativas, visualizando somente um tecido bem compactado. Tal resultado, difere do encontrado nas células CGPs nas espécies *Gallus gallus domesticus* (galinha doméstica) e *Phasianus colchicus* (Faisão), o qual foi possível identificar o depósito de grânulos de glicogênio ao redor do citoplasma das CGPs (JUNG et al., 2007; KIM et al., 2005).

Os ensaios de imunohistoquímica, imunofuorescência e PCR, em tempo real, providenciaram um panorama da expressão das proteínas e genes necessários para o desenvolvimento das CGPs caninas. Durante o primeiro, segundo e terceiro estágios que correspondem ao período embrionário e fetal, as CGPs possuem uma população de células

heterogêneas. A expressão do marcador pluripotente e germinativa POU5F1 ocorrem ao longo de todos os períodos, enquanto que os outros marcadores são observados a partir de 30 dias de gestação.

O gene POU5F1 ou também conhecido como OCT4 apresentou imuno marcação durante o estágio embrionário nas regiões do mesentério, ao redor da aorta dorsal, bem como na colonização das cristas gônadais. Enquanto que, durante o estágio fetal, aumentou a expressão de POU5F1, sendo possível visualizar positividade para este anticorpo nas células germinativas que permanecem no interior dos cordões seminíferos. Nos seres humanos, durante o primeiro trimestre de gestação, o marcador POU5F1 é expresso em maior quantidade nas células germinativas femininas que nas masculinas (HEEREN et al., 2015). Contudo, no segundo trimestre de gestação, este padrão inverte, ocorrendo maior marcação do anticorpo POU5F1 nas células dos cordões seminíferos (HEEREN et al., 2016). Estes resultados estão de acordo com os encontrados nas técnicas de imunofluorescência e PCR, em tempo real, nas cCGPs, gonócitos e testículos fetais de cães. Diferente do encontrado em camundongos, em que a expressão de POU5F1 é homogênea em ambos os sexos a partir do estágio E7,5 permanecendo igual até o estágio E12,5 (OVITT; SCHÖLER, 1998; PESCE et al., 1998).

O específico marcador germinativo DAZL foi expresso a partir do estágio de 30 dias de gestação. Este resultado indica que a partir deste período, as células germinativas caninas estão entrando no processo de maturação celular, o qual irá prosseguir para o processo de diferenciação sexual dos gametas. Em humanos, durante o segundo trimestre de gestação, foi observado a maior expressão do marcador DAZL em ambos os sexos (ANDERSON et al., 2007). Também em camundongos, DAZL é detectado em ambos os sexos nas CGPs pós-migração no estágio E11,5, permanecendo sua expressão até a vida adulta nos ovócitos e espermatócitos (SELIGMAN; PAGE, 1998). Os resultados obtidos em cães vão de encontro com o apresentado em humanos e camundongos, em que ocorre a marcação e a expressão de DAZL, após as CGPs estarem no seu estágio de “maturação” para gonócitos, permanecendo em machos até a formação dos testículos adultos (PIERI et al., 2016).

O marcador DDX4 ou VASA foi utilizado por ser conservado entre as espécies invertebradas e vertebradas e desempenhar uma função de auxiliar no desenvolvimento das células germinativas (FUJIWARA et al., 1994; YOON; KAWAKAMI; HOPKINS, 1997). Estudos em camundongos demonstram que a deleção do gene DDX4 em machos ocasiona infertilidade com cessão da produção de células germinativas no estágio zigóteno da meiose (TANAKA et al., 2000). Neste estudo, DDX4 foi encontrado, pontualmente, durante os estágios de desenvolvimento embrionário e fetal. Durante o período embrionário, baixa ou nenhuma

expressão de DDX4 foi visualizado. Enquanto que no período fetal, somente a partir de 40 dias de gestação, houve a presença de DDX4 permanecendo sua expressão até a formação do testículo adulto. Em humanos, durante o primeiro trimestre de gestação, em ambos os sexos, DDX4 é pouco expressa permanecendo o tema "DDX4 *low*" (HEEREN et al., 2016; MEDRANO et al., 2010; CASTRILLON et al., 2000). Contudo, a partir do segundo trimestre de gestação, DDX4 aumenta consideravelmente sua expressão nas células germinativas femininas do que masculinas (STOOP et al., 2005). Em outras espécies, como os bovinos, a primeira população de CGPs positiva para o marcador DDX4 foi detectada somente após 100 dias do desenvolvimento fetal em fêmeas, não havendo informações durante o desenvolvimento embrionário e fetal em machos (HUMMITZSCH et al., 2013). Em camundongos, DDX4 começa a expressar nas CGPs de fêmeas a partir do E10, 5 (TOYOOKA et al., 2000), enquanto que em machos, a expressão de DDX4 ocorre mais tardia durante o estágio E13,5 e continua até a formação dos testículos adultos (BIALECKA, 2006). Diferente do encontrado na literatura, neste estudo conclui-se que DDX4 não é um marcador indicativo de CGPs caninas masculinas durante os períodos embrionários e fetais. Contudo, após o nascimento em testículos caninos pré-puberes e adultos DDX4 é altamente expresso. Este resultado sugere que DDX4 é requerido para a entrada da meiose nos testículos caninos a partir do estágio pré-pubere.

O marcador pluripotente DPPA3 ou Stella/PGC7 foi escolhido por ser considerado como marcador germinativo; de acordo com os nossos resultados, DPPA3 foi visualizado nos testículos fetais, a partir de 45 dias de gestação, quando sua expressão, no período fetal, aumentou significantemente quando comparado ao período embrionário. Em camundongos, DPPA3 é expresso, desde do início do desenvolvimento embrionário, no estágio de zigoto, e permanece em ambos os sexos até o estágio E13,5 (SAITOU; BARTON; SURANI, 2002). Após esse período, continua sua expressão nas células germinativas em machos até o estágio E15,5. (SAITOU et al., 2005). Em humanos, DPPA3 é encontrado durante o início da pré-implantação do embrião e, depois, mais tardiamente, nos ovócitos, não tendo registros em células germinativas masculinas, nos períodos embrionário e fetal (LAI et al., 2015; SATO et al., 2002). Os resultados com a espécie canina difere do encontrado em camundongo, pois em cães não observa-se a contínua expressão de DPPA3 ao longo do desenvolvimento embrionário e fetal de machos. Podendo concluir que, DPPA3, em cães do sexo masculino, é um marcador de início de desenvolvimento embrionário no estágio de epiblasto (EPI) e germinativo tardio nos cordões seminíferos. Assim, estes dados sugerem que DPPA3 pode ser um marcador chave para o desenvolvimento das células germinativas caninas nos testículos fetais.

Como citado anteriormente em matérias e métodos, nos resultados não foi possível visualizar positividade para alguns anticorpos (Tabela 2). Contudo, para o gene NANOG foi possível constatar sua expressão nas cCGPs através da técnica de PCR em tempo real. Assim, verificamos que a expressão de NANOG foi, significantemente, maior durante o período fetal do que no período embrionário. Em humanos, os relatos com o gene NANOG estende-se na produção de células-tronco, iPS, germinativas *in vitro* e ovócitos. Somente no estudo de Hoei-Hansen et al., 2005, foi demonstrado positividade para o marcador NANOG em todas as células de gonócitos humanos durante aos 14 dias de gestação até, aproximadamente, aos 19 dias de gestação, sendo que após este período, decai a expressão do NANOG.. Também, em camundongos, NANOG é encontrado nas células germinativas de camundongos em ambos os sexos desde estágio de mórula até o estágio E13,5, onde sua expressão decai após este período (YAMAGUCHI et al., 2005). O resultado obtido nas células germinativas caninas foi inesperado. Visto que o gene NANOG está relacionado à manutenção da pluripotencialidade e à regulação, produção de célula-tronco e iPS. Esperava-se como resultado que, o gene NANOG, em cães, tivesse sua maior expressão, durante o estágio embrionário (22-30 dias de gestação) e início do desenvolvimento fetal (35-40 dias de gestação), mas não que se estendesse após este período (45-50 dias de gestação). Estes resultados sugerem que, a expressão de NANOG, nos gonócitos e nos testículos fetais, auxilam na manutenção da pluripotencialidade destas células durante o período fetal e que sua expressão esteja intrinsicamente correlacionado ao gene pluripotente e germinativo POU5F1.

Como conclusão, pôde-se observar que, durante o desenvolvimento das células germinativas caninas, entre os estágios embrionário e fetal, ocorreu um aumento progressivo de todos os marcadores, mostrando que a população as cCGPs possuem uma população de células heterogêneas.

6.3.1 Perfil epigenético das células germinativas caninas durante os estágios embrionários e fetais

Reprogramação epigenética inclui mudanças e estabelecimento na metilação do DNA nas histonas e nos micro RNAs. Todos esses processos epigenéticos desempenham uma importante função em vários processos celulares. Nas CGPs, estes processos também são

observados durante o período de migração e após entrarem nas cristas gônadais. Neste estudo, foi investigado através da técnica de imunofluorescência e imunohistoquímica, o perfil de mudanças epigenéticas após a migração das CGPs nas cristas gônadais.

A primeira observação visualizada foi que houve marcação para a marca repressiva de histona H3K27me3, aumentando progressivamente a intensidade da fluorescência no período fetal. Contudo, não houve nenhuma marcação para a histona H3K9me2 em ambos os estágios. De acordo com a literatura, quando ocorre à perda da histona H3K9me2 esta é compensada pelo aumento da histona H3K27me3 (HAJKOVA et al., 2008; SEKI et al., 2007b). Tal evento, nas células-tronco de camundongos, está relacionado aos ganhos de genes pluripotentes, como NANOG e SOX2 (SURANI; HAYASHI; HAJKOVA, 2007). Estes dados corroboram aos nossos, apresentados anteriormente nas CGPs caninas, em que houve maior expressão de NANOG durante o período em que ocorreu intensa marcação de H3K27me3.

As modificações nas histonas ocorrem em paralelo com as mudanças de metilação do DNA. O início de formação e migração das CGPs é marcado pela perda da metilação do DNA, tal ação permite que ocorra o apagamento genômico dos genes *imprinting* (HACKETT; ZYLICZ; SURANI, 2012). Neste estudo, verificou-se a metilação global nas cristas gônadais embrionárias e caninas. Houve ausente marcação para o anticorpo 5mC nas cristas gônadais durante o estágio embrionário de 22 dias de gestação. Este dado sugere que neste período ocorreu a desmetilação do DNA. Contudo, conforme aumenta a idade embrionária e atinge os estágios fetais, as gônadas masculinas são metiladas passivamente. Este dados corroboram com o estudo de Hyldig et al., (2011) em que o estado de metilação decai em entre os estágios embrionários E24-E28, contudo após este período houve um aumento da metilação de DNA nas gônadas masculinas.

Pesquisa como o de Rodci et al., (2005) demonstrou que a metilaçao do DNA regula a expressão de genes específicos de tecidos e inclusive das CGPs. Em camundongos, Maatouk et al., (2006) demostrou que genes de células germinais pós-migratórias, tais como Mvh (DDX4), DAZL e SCP3 são desmetilados em células germinativas, mas não em células somáticas. Nakashima et al., (2013) observou em seus estudos com camundongos que o gene Dppa3 está envolvido no processo de desmetilação ativa mediada por Tet durante a reprogramação de CGPs. No entanto, neste estudo foi evidenciado o oposto, que os genes DAZL, DDX4 e DDPA3 podem estar interligados para manter o estado de metilação do DNA. Devido a estes marcadores terem sido positivos no testículo fetal canino, ao mesmo tempo em que as células germinativas tinham forte imunopositividade para o anticorpo 5mC. Em particular, também foi observado neste estudo que a desmetilação do DNA pode estar relacionada com o ganho de POU5F1. Pois

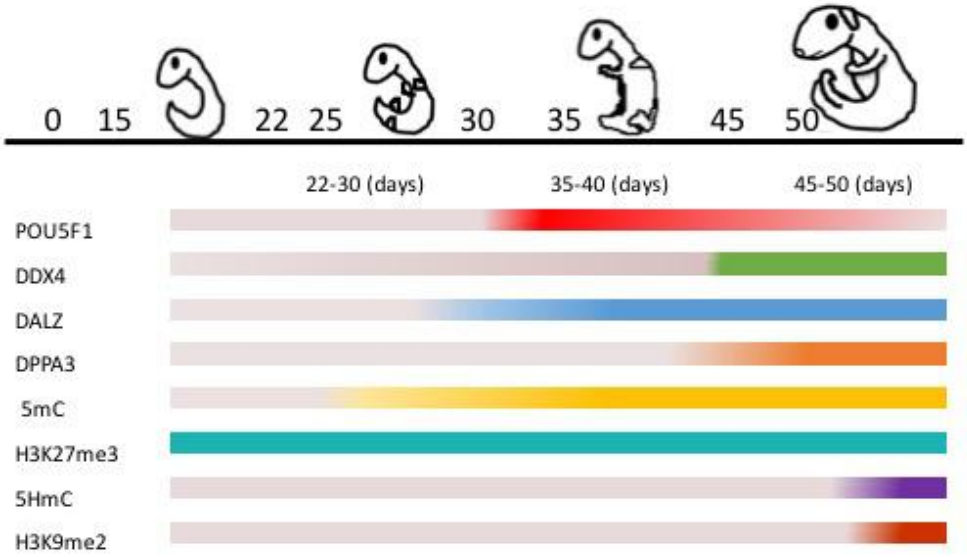
as únicas células que encontravam-se desmetiladas eram as que possuem características de células espermatogônias no testículo fetal canino, sendo que essas células foram as únicas positivas para POU5F1.

Em contraste com o marcador 5mC, o marcador de hidroximetilação 5hmC mostra ausência de marcação nos estágios embrionários e fetais. Apesar do processo de 5hmC permanecer ainda obscuro em várias espécies, pode-se sugerir que o fato das cCGPs, gonócitos e os testículos fetais apresentarem a marcação de 5mC é porque essas células se encontram metiladas. Deste modo, não há como acontecer o processos de desmetilação pela 5hmC.

Conclui-se que as células germinativas caninas, durante os estágios embrionários e fetais, possuem um perfil epigenético único.

6.4 CONCLUSÕES PRELIMINARES

Nesta pesquisa foi caracterizada, pela primeira vez, a progressão do desenvolvimento das CGPs caninas durante os períodos embrionários e fetais. Verificou-se que possuem três estágios distintos:



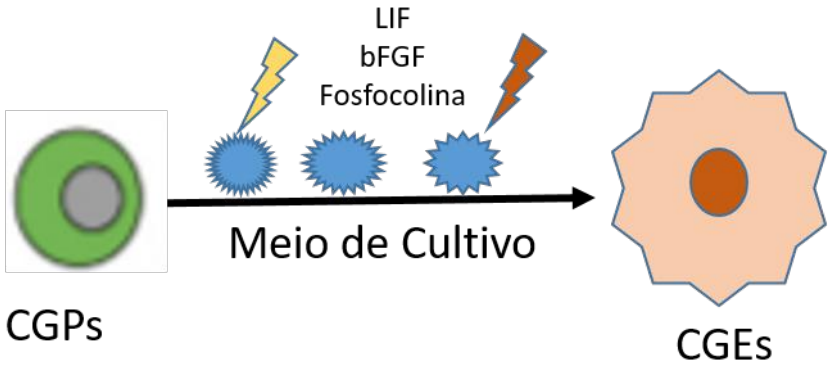
- ✓ Período inicial (22-30pF), identificado CGPs POU5F1^{+} e DDX4^{-} , 5mC$^{+/-}$ e H3K27me3^{+}.
- ✓ Período intermediário (35-40pF), identificado uma população intermediária em que as CGPs modificam sua morfologia para gonócitos e expressam POU5F1^{+}, DAZL^{+} e DDX4$^{+/-}$, 5mC^{+}e H3K27me3^{+} .
- ✓ Período final (45-50pF), em que os testículos fetais se apresentam com expressão POU5F1^{+} , DAZL^{+} , DPPA3^{+} e DDX4$^{+/-}$, 5mC^{+} e H3K27me3^{+}.

7.0 EXPERIMENTO 2 – DERIVAÇÃO DAS CGES CANINAS.

Está descrito na literatura a derivação de células CGEs a partir das CGPs. Como visto no experimento 1 desta pesquisa, as CGPs masculinas caninas retém a detecção de marcadores e transcriptos pluripotentes e germinativos. Assim, a partir desta informação nossa hipótese foi: 2) As CGPs masculinas caninas possuem a capacidade de se diferenciarem em CGEs.

O segundo experimentou visou a derivação das CGEs caninas (cCGEs) e sua posterior caracterização celular através das técnicas de imunocitoquímica, q-PCR e formação de teratoma *in vivo* (Figura 24).

Figura 24 - Esquema do experimento 2: derivação das CGEs caninas



Fonte: SOUZA, A.F.; 2017
Legenda: Esquema do experimento 2: derivação das CGEs caninas. Demonstra o delineamento experimental de transformação das CGPs a CGEs utilizando meios de cultivos específicos suplementados.

7.1 MATERIAL E MÉTODO

A pesquisa foi realizada no Laboratório Grupo Desenvolvimento de Terapias Inovadoras (GDTI), localizado no Departamento de Medicina Veterinária da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA) da Universidade de São Paulo, campus Pirassununga.

7.1.1. Animais

Os embriões caninos utilizados neste projeto foram obtidos durante campanhas de castração (Pirassununga-SP e São Paulo-SP)**,** conduzidos e aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais - CEUA da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Brasil (n° protocolo 13.1.1729.74.2) e CEUA da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Brasil (n° protocolo 7043240215). Os embriões foram coletados no estágio de 30 dias de gestação de acordo com os métodos cirúrgicos eletivos de ovário-salpingo-histerectomia (OSH). Em seguida, foram analisados para o desenvolvimento de morfogênese e medidas Crown-Rump (CR), determinadas de acordo com os métodos de PIERI et al., 2015.

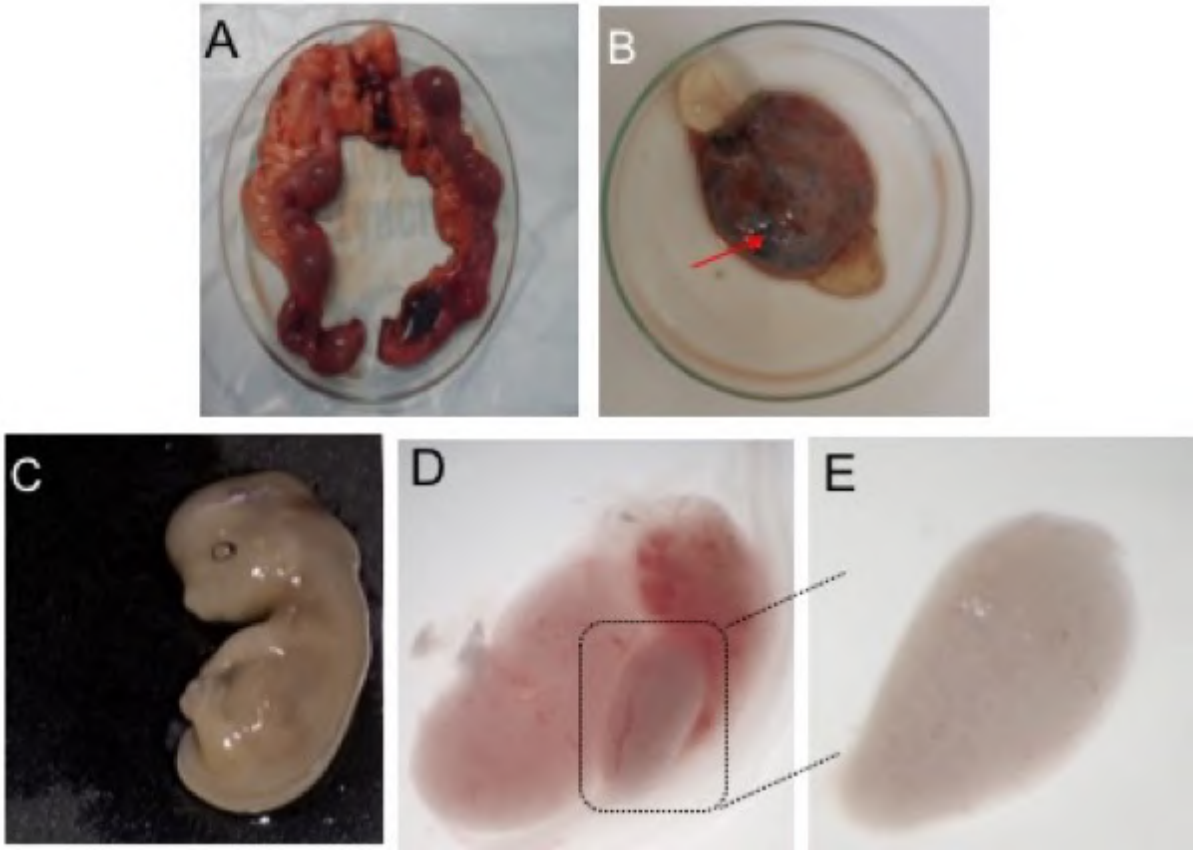
7.1.2 Isolamento das CGPs caninas e derivação das CGEs caninas

Para a derivação das células CGPs caninas à CGEs caninas utilizou-se gônadas fetais masculinas com 30 dias de gestação (n=15). A dissecação das gônadas embrionárias masculinas foram realizadas em lupa (Labomede, Microscope) (Figura 25), os tecidos gônadais foram lavado em PBS para cultivo, pH 7,0 com 0,5% de penicilina/streptomicina (Gibco, Invitrogen). Seguidamente, as gônadas foram dissociadas mecânicamente com auxílio de uma lâmina de bisturi e por dissociação enzimática com, 1mg/ml de dispase (Gibco), 0,3mg/ml de hialuronidase (Sigma) e 0.5mM EDTA diluído em PBS próprio para cultivo, seguidamente foram incubados a 37°C por 5-6minutos. Após, esse período as células foram centrifugadas a 1.500 rpm e o sobrenadante foram descartado e os *pellets* celulares lavados em PBS de cultivo. Prosseguimos com o plaqueamento celular, com uma quantidade de $1x10^4$ nas placas de 24 poços.

O meio de cultivo para as CGPs foram compostos por: Knockout DMEM (Gibco Invitrogen), composto por 10% de soro Knockout (KSR- Gibco, Invitrogen), 0.1 mM de aminoácidos não essencial (Gibco BRL), 0.1 mM beta-mercaptoethanol (Gibco BRL), 2 mM L-glutamina (Gibco BRL), 50ug/ml penicillina/streptomicina (Gibco, Invitrogen) e 1 mM piruvato de sódio (Gibco BRL) (quadro 1). Para promover o desenvolvimento e a proliferação

das células CGPs à CGEs, utilizamos a presença de suplementos, como 4ng/ml fator básico de crescimento fibroblástico humano (hbFGF, do inglês *human basic fibroblast growth fator*, Cell Science; Norwood, MA), 1000U/ml fator de leucemia inibitória humano (LIF, do inglês *human leukemia factor inhibitor, Chemicon International*) e 10 µM de Forscolin (Sigma) No terceiro dia de cultivo retiramos a presença de bFGF, a cultura celular das CGEs foram colocadas em uma nova placa de cultivo contendo monocamadas de fibroblastos embrionários caninos (CEFs, do inglês canine embryonic fibroblast) inativados mitoticamente através do uso de mitomicina C (Sigma). No quinto, décimo e décimo quinto dia as células foram desagregadas manualmente e colocadas em uma nova placa de cultivo contendo novas CEFs (Quadro 2). Toda a cultura foi mantida com 5% CO2 a 37°C.

Figura 25 - Demonstração o procedimento de coleta das gônadas masculinas



Fonte: SOUZA, A.F.; 2017

Legenda: Demonstração do procedimento de coleta das gônadas masculinas. Em A visualiza-se o corno uterino canino gravídico. B, feto envolto pela a placenta e pela a cinta placentários (seta vermelho). Em C, feto com 30 dias de gestação (CR3cm) . Na figura D evidenciamos após dissecação a gônada masculino (contorno pontilhado) e o mesonefro; e em E a gônada masculina.

Quadro 2 - Condições de cultura para a derivação das CGEs

Categoria	**Fator**	**Conc.**	**Condições de cultura em dias**																								
			1	2	**3***	4	**5p**	6	7	8	9	**10p**	11	12	13	14	**15p**	16	17	18	19	**20p**	21	22	23	24	**25**
Meio Básio	*Knockout* DMEM		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
	Knocout Soro	10%	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Monocamadas	CEFS	2.5E4/cm^2			X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X			X	X	X	X	X	X	X	X
Suplementos	h-LIF	1.000U/ml	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
	Forscolin	10µM			X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
	hbFGF	4ng/ml	X	X																							

Fonte: SOUZA, A.F.; 2017

Legenda: Resumo da composição do meio de cultivo utilizado para a derivação das cCGEs. CEFs (monocamadas de fibroblastos embrionários caninos); h-LIF (*human leukemia factor inhibitor)*; hbFGF (*human basic fibroblast growth fator)*; P= passagens.

7.1.3 Imunocitoquímica e Ensaio de Atividade de Fosfatase Alcalina nas cCGEs

Os ensaios de imunocitoquímica e Fosfatase Alcanina (*Alkaline phosphatase assays – AP*) foram utilizados para confirmar a linhagem das cCGEs. Cada proteína e ensaios de AP foram mensurados em triplicatas.

Para as análises de imunocitoquímica utilizou-se as côlonias celulares com 10 dias de cultivo. As colônias das cCGEs foram cultivados sob as lamínulas redondas (Knittel®) com 0,1% de gelatina para cultivo (Science-Pro). Após 10 dias de cultivo as colônias das cCGEs foram fixadas em 4% de PFA e permeabilizadas com PBS mais 0.1% Triton X-100 (TBST, Sigma) por 20 minutos. Em sequencia as colônias foram bloqueadas com solução de Soro albumina bovino (Sigma) por 1 hora, prosseguiu-se com a incubação dos anticorpos primários diluídos em solução bloqueio por 1 hora em temperatura ambiente. Controles negativos foram realizados pela ausência de anticorpos primários. Após, este período as células foram lavadas 2x em PBS e 1x em PBS-T. Seguidamente houve a incubação do anticorpo secundário por 1 hora em temperatura ambiente (Tabela 16) e posteriormente lavagens das lâminas e os núcleos das células foram contra corados com Hoechst (Hoechst (Trihydrochloride, Trihydrate, cat#33342, Invitrogen, Calsbad, CA, USA). Para a visualização no microscópio as células foram montandas com ProLongGold (Life Technologies cat# P36930, Life technology; Calsbad, CA, USA) e armazenado em 4 °C. Todos os dados foram processados com uso de microscópio Confocal Microscope Leica SP5 com aumentos de 20X, 60X e 100X. Todos os anticorpos utilizados foram os mesmos do experimento 1, com excessão do anticorpo THY-1 anti goat(Sc6071, Santa Cruz)

7.1.4. Extração de RNA, síntese de cDNA e reação polimerase em cadeia em Tempo Real (RTq-PCR)

Para a extração de RNA utilizou-se as côlonias cCGEs com 10 dias de cultivo (n=4), o tecido das gônadas foram isoladas usando o reagente Trizol (Life Technologies, Carlsbad, CA,USA) de acordo com as instruções do fabricante e a qualidade das extração do RNA foi quantificada pelo espectrofotómetro (Nanodrop ND-1000, Nanodrop Technologies, Inc., Wilmington Delaware, USA). Para a síntese de cDNA utilizamos o kit *High-Capacity cDNA*

Reverse Transcription Kitight (Life Technologies, Carlsbad, CA,USA) de acordo com as instruções do fabricante.

Para as análises da reação polimerase em cadeia em tempo real (RTq-PCR), seguimos primeiramente com a validação dos primers conforme descrito por Pieri (2016) (dados não publicados). A sequência de primers NANOG, DDX4 e GADPH foram os mesmos utilizados no experimento 1. Após, a validação prosseguiu-se com as análises de qPCR usando SYBR Green Master Mix (Cat# 4367659,Applied Biosystems, Life Technologies, Carlsbad, CA). As reações foram processadas no instrumento Step One Plus Real-time PCR system (TermoFisher-Scientific n° 4376600, USA) sob as condições de fase pré-ciclo foi mantida a de 95°C por 10 minutos, sendo 40 ciclos: desnaturação, aumento de temperatura e separação da fita dupla (95°C, 15 minutos), seguido do anelamento dos primers a região homologa no cDNA (60°C por 1 minuto) e pôr fim a curva de dissociação 72°C, por 45segundos). Como controle negativo da reação utilizou-se a mesma reação sem a adição da amostra de cDNA e como controle positivo, utilizamos testículo de cão na fase pré-púbere e adultos. Toda a reação foram realizadas em triplicatas.

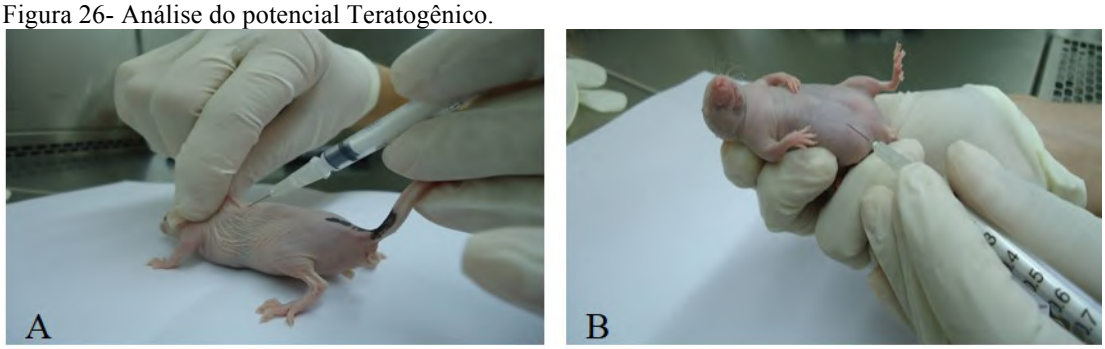
O método empregado para a análise foi de quantificação relativa com correção pela eficiência do primer, e os dados subministrados pelo o software do equipamento Step One Plus (Step one software versão 2.3) foram analisados com o programa LinReg PCR (Versão 2015.0). As razões da expressão do genes alvo (DDX4 e NANOG) foram normalizadas pela razão da expressão do controle endógeno GADPH empregando a metodologia de correção de eficiência da equação do Pfaff1 (PFAFFL, 2001). As análises estatísticas foram avaliados comparando o período embrionário com o período fetal com o auxílio do *teste T*, sendo 90% de confiabilidade ($P<0,10$). Foram realizados os testes de coeficiente de correlação de *Pearson*, no qual demonstra os valores de correlação das CPGs durante o estágio embrionário e fetal entre os genes.

7.1.5 Avaliação do potencial teratogênico

O ensaio para análise do potencial teratogênico as colônias das células cCGEs foram injetadas em ambiente estéril, via subcutânea e intraperitoneal em dois camundongos fêmeas *Balb/c Nude*. Foram injetadas $2x\ 10^4$ células cCGEs ressuspendidas em PBS. Os animais foram observados a cada 2 ou 3 dias e mantidos por um período de 60 dias (Figura 26). Após 8 semanas, os animais foram eutanasiados em câmera de gás (CO_2) com confirmação por

deslocamento cervical de acordo com as normas de bioética de vigência. Os pontos de transplante foram cuidadosamente expostos para averiguar possível formação de teratomas. Para análise histopatológica coletamos os tecidos: encéfalo, pulmão, coração, estômago , intestino delgado, cólon, pâncreas, baço e fígado. O material coletado foi fixado em PFA 4% e processados rotineiramente usando técnicas de inclusão em parafina (BEHMER, 1976). Em seguida, os blocos foram cortados sequencialmente com 5 µm e colocados em lâminas para a coloração de hematoxilina e eosina (VEJSTED et al., 2006). Todos os órgãos e tecidos foram avaliados por patologista quanto a presença de quaisquer anomalias celulares.

Figura 26- Análise do potencial Teratogênico.



Fonte: SOUZA, A.F.; 2017
Legenda: Análise do potencial Teratogênico. Em A, injeção subcutânea e em B, injeção intraperitoneal e camundongos fêmeas *Balb/c Nude*.

7.2 RESULTADOS

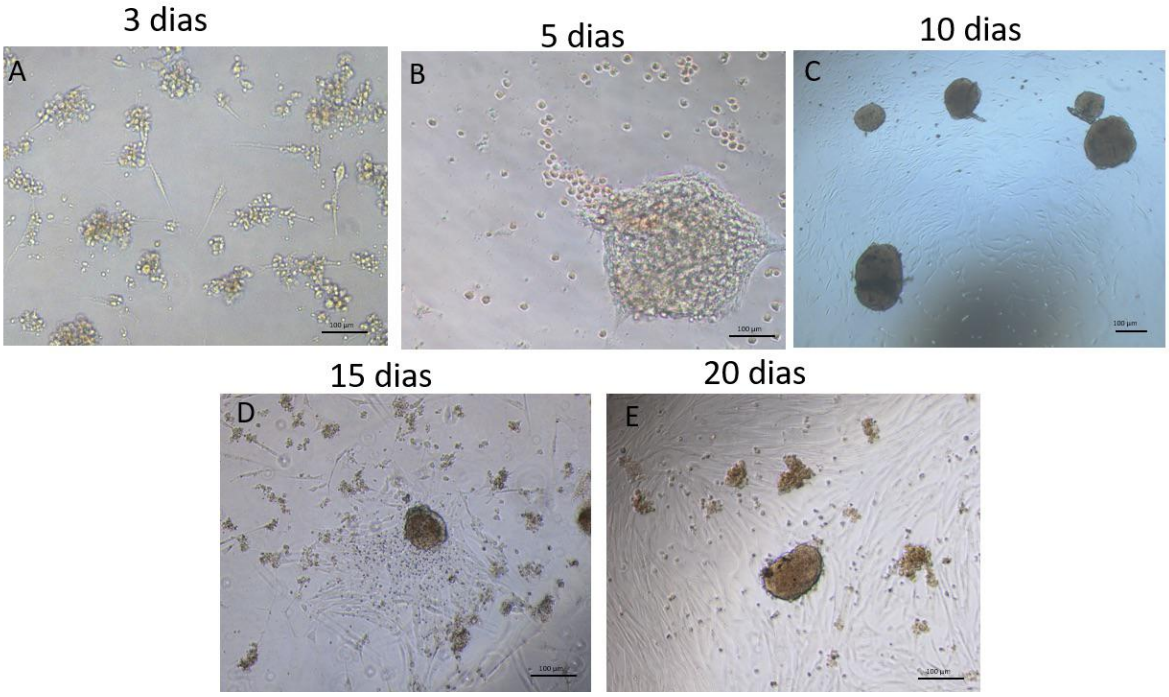
7.2.1 Isolamento das CGPs e derivação das cCGEs

Após a completa dissociação, as CPGs foram plaqueadas em placas de 24 poços para a derivação das CGEs. Durante o cultivo, foi observado que, após três dias, as células formaram pequenos aglomerados celulares, com uma morfologia arrendondada e pouco aderentes à placa de cultivo. Deste modo, realizou-se a primeira passagem celular das CGEs para placas que continham monocamadas fibroblásticas, CEFs, para auxiliar na adesão e conectividade celular.

Quando adicionado ao cultivo os suplementos, como o LIF, bFGF e Forscolin, visualizou-se que as células apresentavam maiores índices de colônias e um aumento em sua proliferação celular após cinco dias de cultivo, permanecendo em cultivo por 20 dias (Figura 27). Na ausência desses fatores não houve a presença de formação de colônias, as células

permaneciam dispersas na placa de cultivo e facilmente diferenciavam-se em outros tecidos celulares, como células fibroblatoides.

Figura 27 - Fotomicrografias da morfologia das células cCGEs derivadas da crista gônadal.

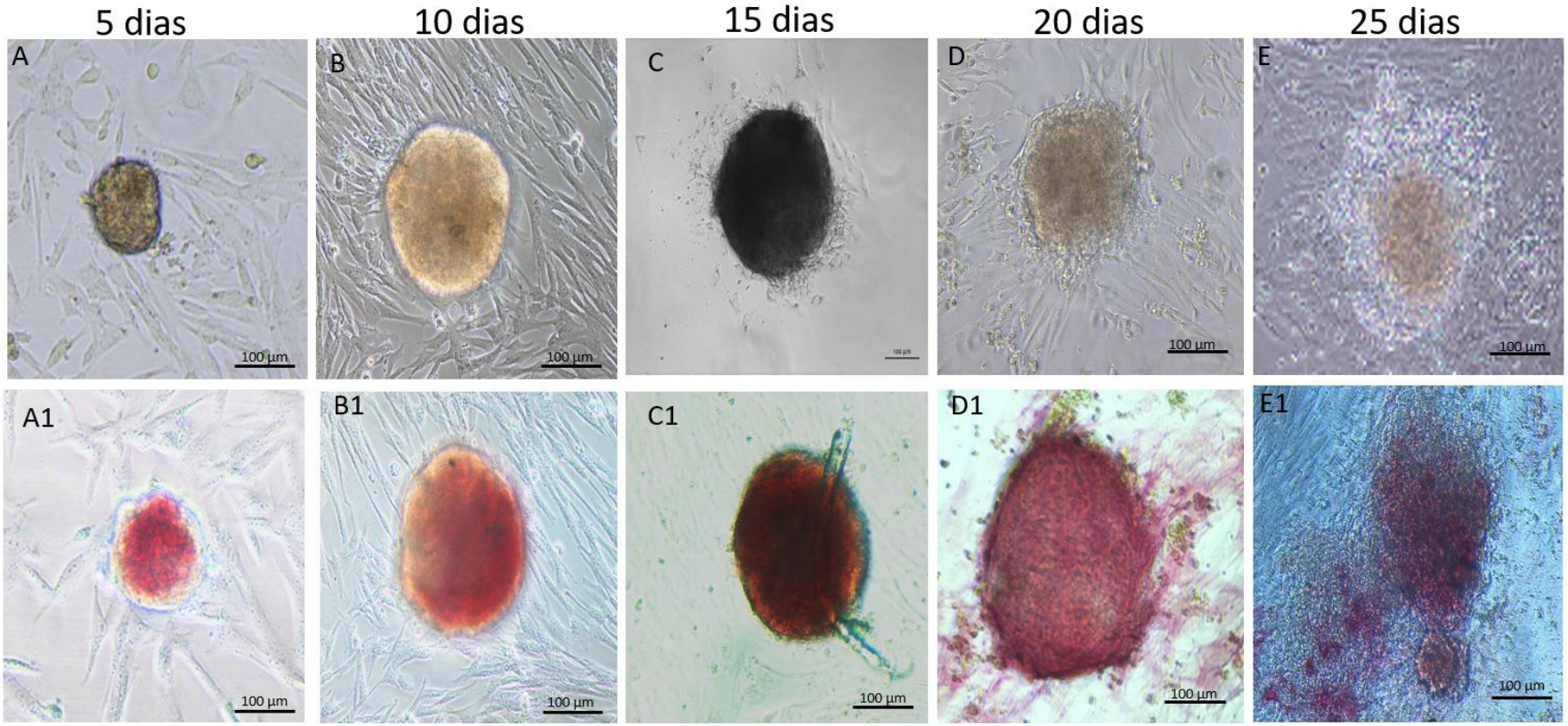


Fonte: SOUZA, A.F.; 2017

Legenda: Fotomicrografias da morfologia das células cCGEs derivadas da crista gônadal. Na figura A demonstramos após 3 dias de cultivo a formação das colônias das células cCGEs. Figura B, após 5 dias de cultivo as colônias possuem a morfologia esférica e/ou alongadas. A figura C, com 10 dias de cultivo as colônias celulares crescem e apresentam uma morfologia mais compactada. A, C, D e E 10X e B 20X (Barra: 1000µm).

Durante os periodos de 3, 5, 10, 15 e 20 dias de cultivo todas a colônias cCGEs foram positivas para os ensaios de Fosfatase Alkalina (Figura 28). Depois de 25 dias de cultura, as cCGEs não aparesentavam positividade para Fosfatase Alkalina e suas caracteristicas morfologicas foram modificadas quando comparadas com as anteriores. Iniciando, um processo de diferenciação em outros tipos celulares, tais como, epiteliais e fibroblastoides.

Figura 28 – Fotomicrografias da morfologia e expressão de Fosfatase Alcina durante o cultivo das cCGEs

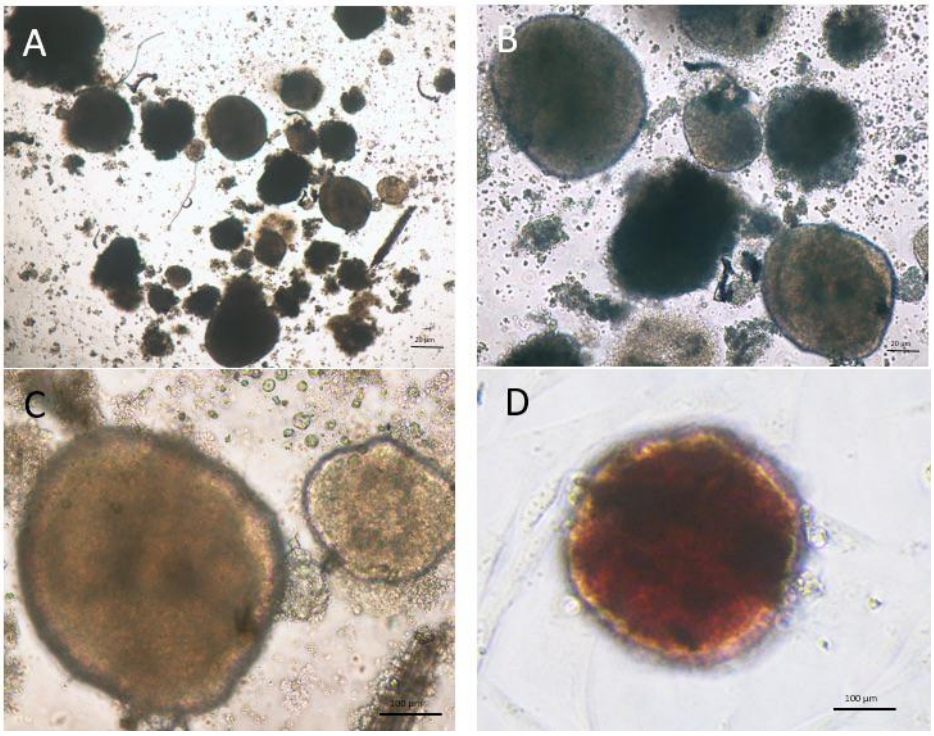


Fonte: SOUZA, A.F.; 2017

Legenda: Fotomicrografias da morfologia e expressão de Fosfatase Alcina durante o cultivo das cCGEs. As figuras A e A1; B e B1: C e C1; D e D1: E e E1 demonstram a morfologia e a positividade em diferentes dias de cultivo para a expressão de Fosfatase Alcalina. Nota-se que na figura E a partir de 25 dias de cultura as células apresentam uma morfologia distinta do início de cultivo e apresenta-se pouco positiva para Fosfatase Alcanina. A e A1;B e B1: C e C1; D e D1: E e E1 20X (Barra: 1000µm).

Quando as cCGEs não foram cultivadas em monocamadas de CEFs, as células formavam côlonias em suspensão com estruturas semelhantes as corpos embrioides (*embryoid bodies-EB*) (Figura 29). Os EBs apresentaram morfologia esférica com bordas definidas. Permaneceram em cultura por até sete dias e todos foram positivos para AP.

Figura 29 – Fotomicrografias da morfologia celular dos corpos embrioides.



Fonte: SOUZA, A.F.; 2017

Legenda: Fotomicrografias da morfologia celular dos corpos embrioides. Na figura A, B e C evidenciamos a formação dos corpos embrioides da cultura de células cCGEs quando cultivadas sem monocamadas fibroblasticas. Nota-se na figura D que o corpo embrioide é positivo para Fosfatase Alcalina. Figura A 4X, figura B 10X e figura C e D 40X (Barra: 100µm).

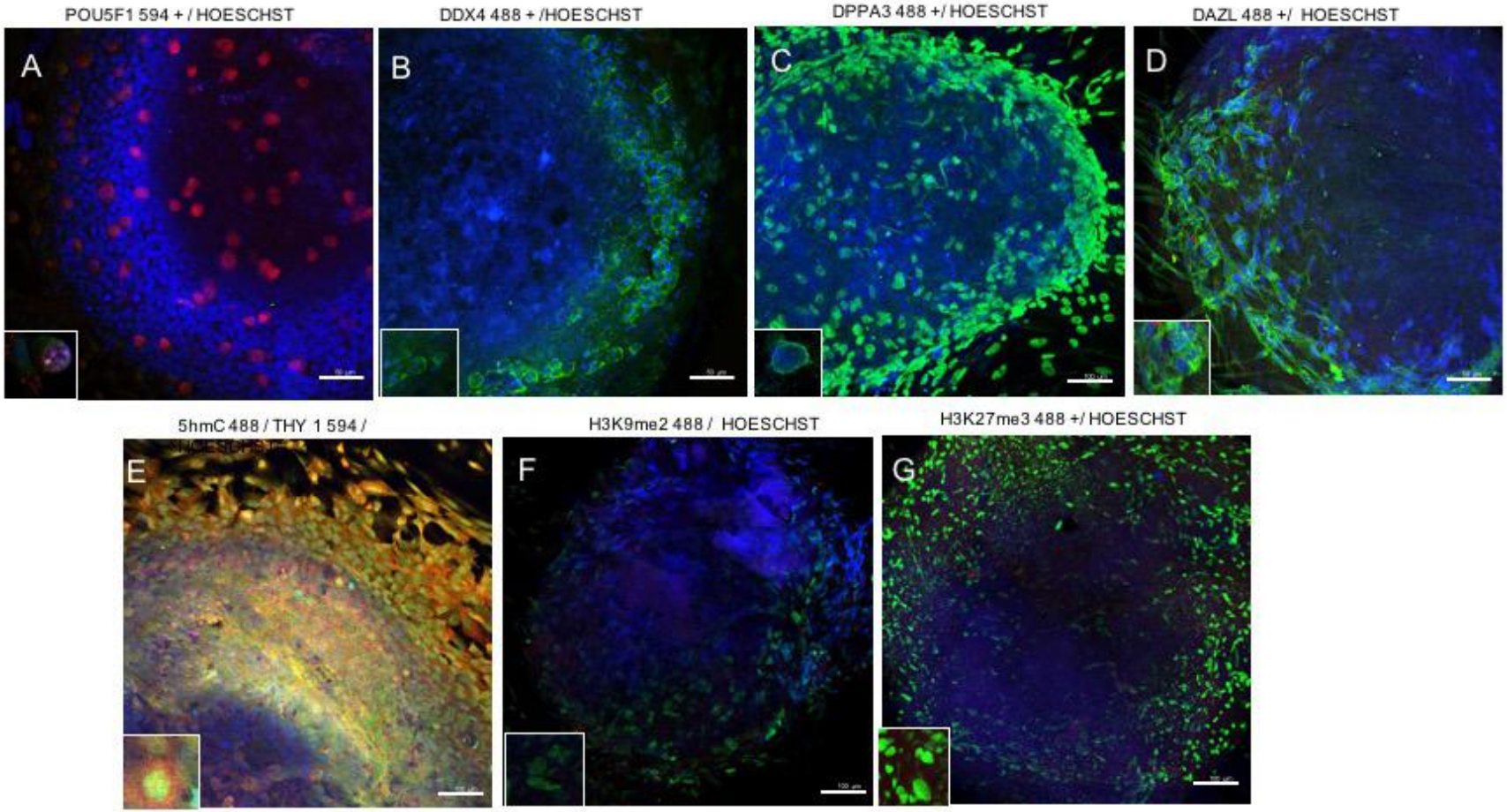
7.2.2. Imunocitoquímica e Extração de RNA, síntese de cDNA e reação polimerase em cadeia em Tempo Real (qPCR)

Na técnica de imunocitoquímica observou-se que os núcleos das células cCGEs foram positivos para as proteínas POU5F1 e DPPA3 ao longo da colônia celular. Para as proteínas DDX4 e DAZL houve imuno positividade na membrana e no citoplasma celular das cCGEs e, preferencialmente, se localizaram na parte periférica ao longo da colônia celular. Também foi realizado o ensaio de imunocitoquímica com a proteína de membrana THY-1 foi detectado tanto na periferia quanto no interior das colônias das cCGEs (Figura 30), tal resultado

demonstra que as colônias das cCGEs são constituídas, em sua grande maioria, por células somáticas, isto explica a diferenciação rápida em cultura das células cCGEs.

Para o perfil epigenéticos utilizamos os marcadores 5mC, 5hmC, H3K27me3 e H3K9me2 e as colônias celulares apresentaram intensa positividade para o marcador de histona H3K27me3, enquanto, que para H3K9me2 houve pouca células positivas ao redor da periferia da colônia das cCGEs. Interessantemente, o marcador epigenéticos de hidroximetilação, 5hmC, foi positivo nas células somáticas e no interior da colônia das cCGEs (Figura 30).

Figura 30 – Fotomicrografias das análises de imunocitoquímica das colônias cCGEs

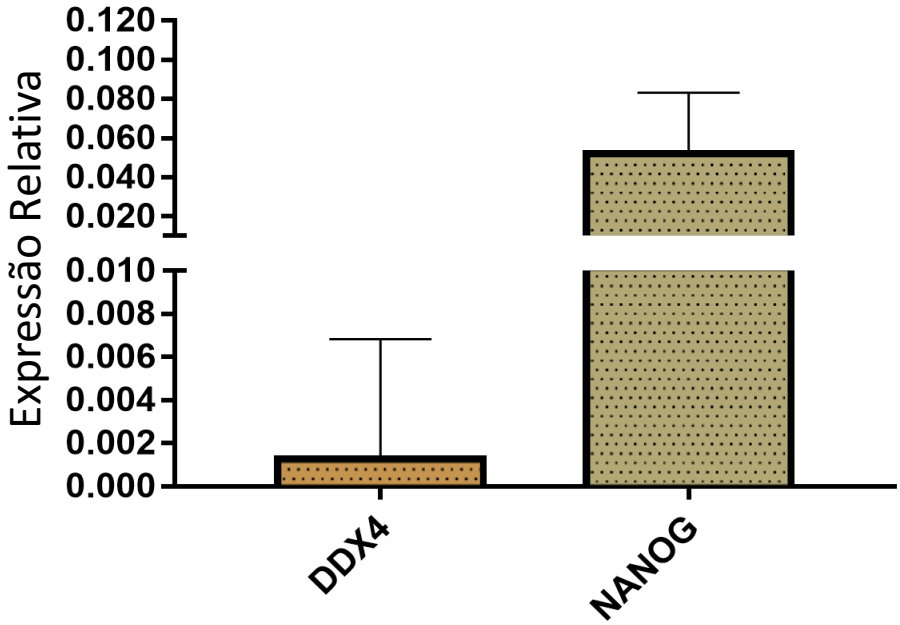


Fonte: SOUZA, A.F.; 2017

Legenda: Fotomicrografias das análises de imunocitoquímica das células cCGEs. Na figura A, observa-se a marcação nuclear para a proteína POU5F1(vermelho) na região interna e na periferia da colônias das cCGEs. Na figura B, imunopositividade na periferia das células cCGEs para a proteína de membrana DDX4 (verde). Na figura C imunomarcação para a proteína nuclear DPPA3 (verde) em toda a colônia cCGEs. Na figura D nota-se marcação citoplasmática para a proteína DAZL (verde). Em E, dupla marcação para o anticorpo de membrana THY-1 (vermelho) e o anticorpo de hidroximetilação 5hmC (verde), ficando assim o *merge* alaranjado. Na Figura F, evidenciamos algumas células positivas para o marcador de histona H3K9me2 (verde). Em G obseva-se positividade nuclear nas células cCGEs para o marcador de histona H3K27me3. As figuras A-G possuem o aumento de 60X (Barra: 100µm).

Pelas as células cCGEs apresentarem uma população celular heterogênea, decidiu-se realizar as análises de RTq-PCR para quantificar os genes transcriptos (NANOG) e (DDX4). Através do teste *T de Student* foi comparada a média de expressão entre esses genes (P<0,10). Pôde-se verificar que houve diferença de expressão dos genes pluripotentes e germinativos NANOG e DDX4 (Gráfico 2). No qual. NANOG teve alta expressão quando comparado durante o cultivo das cCGEs do que DDX4. Tal resultado, torna-se satisfatório, mostrando que as células cCGEs retêm certo nível de pluripotência.

Gráfico 2 - Expressão dos genes pluripotentes e germinativos nas CCGEs, após 10 dias de cultivo.



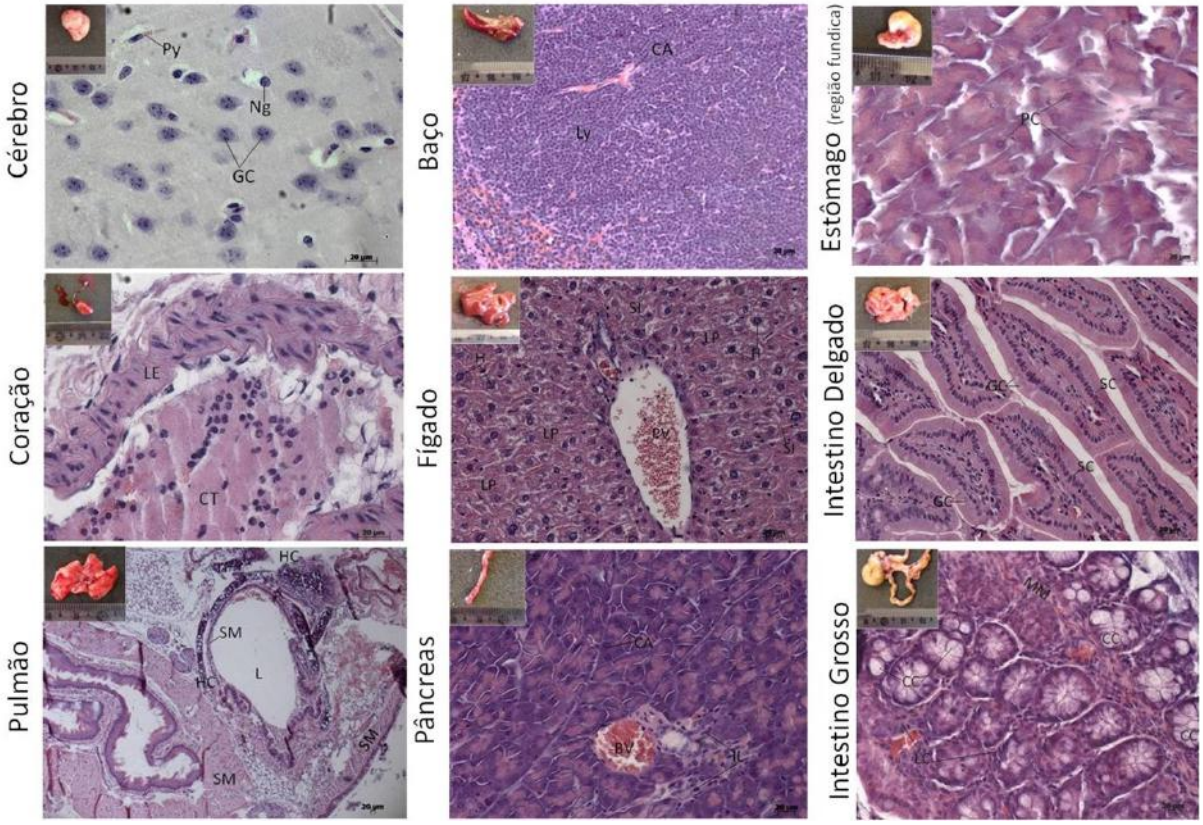
Fonte: SOUZA, A.F.; 2017

7.2.2. Teratoma *in vivo*

Para testar a capacidade de diferenciação *in vivo* das células cCGEs e seu potencial de plutipotência *in vivo* foi realizado o ensaio de formação de teratoma em camundongos imunodeprimidos (Balb/c – nude). As cCGEs foram cultivadas e inoculadas via subcutânea e intraperitoneal nos camundongos e após 8 semanas os animais foram eutanásiados e os pontos de inoculação foram expostos para averiguar possíveis formações de tumores contendo as três camadas germinativas. Não foram registradas quaisquer formações macroscópicas de teratomas nos pontos de injeção, mas mesmo assim realizamos a avaliação histopatológica. Analisou-se

os fragmentos do encéfalo, coração, pulmão, estômago, intestino delgado, cólon, pâncreas, baço e fígado e após processamento histológico, os cortes de ambos os animais foram analisados por médico veterinário patologista e não apresentaram anomalias celulares, com arquitetura preservada, bem como parênquima e tecidos glandulares sem alterações. (Figura 31).

Figura 31 – Fotomicrografias da histopatologia dos órgãos: cérebro, coração, pulmão, baço, fígado, pâncreas, estomâgo, intestino delgado e intestino grosso dos camundongo (*Balb/c – nude*).



Fonte: SOUZA, A.F.; 2017

Legenda: Fotomicrografias da histopatologia dos órgãos: cérebro, coração, pulmão, baço, fígado, pâncreas, estomâgo, intestino delgado e intestino grosso dos camundongo (Balb/c – nude). Figura A demonstra o cérebro com suas células granulares (GC), células neurogliais (Ng) e células Piramidais (Py). Na figura B evidência o macroscopicamente o coração com a camada mais interna, o endocárdio, revestido pelo o tecido conjuntivo (CT) com núcleos (N) evidentes nas entre as fibras de Purkinje (PF). Em B2 observa-se a luz do ventrículo que apresenta um folheto de válvula (LE). Figura C, destaca o pulmão com o brônquio intrapulmonar revestido por músculo liso (SM), placas de cartilagem hialina (HC). Figura D, o órgão baço com uma espessa cápsula (CA) de tecido conjuntivo e linfócitos (Ly). Figura E demonstra o fígado com sua veia porta (PV) e as placas de células hepáticas (LP) compostas de hepatócito (H). Figura F demonstra o pâncreas, evidenciando as células centroacinares (CA) da porção exócrina; na porção endócrina nota-se células com morfologia pequena e esférica chamadas de ilhoras de Langerhans (IL) do qual recebem o suprimento sanguíneo (BV). Na figura G demonstra o estômago, evidencia-se as glândulas fúndicas com células parietais (CP) com sua morfologia arrendondada. Na figura H a porção do intestino delgado demonstrando, as criptas de Lieberkühn compostas pelas células calciforme (CC) das quais produzem muco e células fonte (CF). Na figura I, elucidamos o cólon, exibe as células calciformes (CC), células linfoides (CL) e a musculatura da mucosa (MM). Todas as figuras possuem o aumento de 40X (Barra: 20µm).

7.3 DISCUSSÃO

A obtenção *in vitro* de células germinativas tem criado uma grande expectativa entre os pesquisadores, uma vez que estabelecida, essa linhagem celular poderá ser usada em transplantes para auxiliar na produção de gametas maduros e nas tecnologias voltadas à reprodução (HENDRIKS et al., 2015).

Com os avanços de técnicas de reprogramação celular, recentes pesquisas, como as de Irie et al., (2015) e Sasaki et al., (2015), demonstram que as células *iPS* podem ser reprogramadas a uma população de células Epiblasto-*like* ou mesodérmicas-*like* e, desta, na geração de *CGPs-like.* Contudo, as CGPs-*like* ainda são uma linhagem celular recente e ocorrem muitas incertezas na possível utilização destas nas terapias celulares. Uma vez que, para a obtenção final das *CGPs-like,* as células passam por vários estágios de reprogramação, podem ocorrer alterações epigenéticas anormais prejudicando o cultivo *in vitro.* Deste modo, torna-se interessante a pesquisa de obtenção de células germinativas sem a inserção de fatores de reprogramação. Na literatura são demonstradas que as CGPs colocadas em cultura, juntamente com suplementos, são capazes de gerar uma nova linha celular as CGEs (LEITCH et al., 2010; SHAMBLOTT et al., 1998).

Assim, em concordância com as pesquisas realizadas anteriormente, demonstramos neste estudo pela a primeira vez, que as CGPs caninas de machos são capazes de derivar as CGEs caninas. Pesquisa como a de PARK et al., (2004) demonstrou que CGEs não foram derivados de testículos que possuíam mais de 13 semanas de gestação. Desta forma, com base na literatura e pelos os resultados obtidos com o experimento 1 deste estudo, acreditamos que poderia ser benéfico obter gônadas embrionárias de 30 dias de gestação (das quais possuem tanto marcadores pluripotentes quanto germinativos) a fim de obter CGEs caninas.

Depois de isoladas as cCGPs, cuidados especiais precisaram ser requeridos durante a degradação enzimática e no cultivo para evitar a apoptose celular. Como demonstrado em outros estudos de células-tronco de cães, a ação exclusiva de um único agente enzimático, como a tripsina ou colagenase, causa injúria no cultivo celular (HATOYA et al., 2006). Assim, um apropriado conjunto de enzimas, como dispase, hialuronidase e EDTA, foi utilizado para melhor promover a desagregação das cristas gonadais. A ação e a eficiência dessas enzimas foram comprovadas em estudos realizados com CGEs humanas e células-tronco de cães (HATOYA et al., 2006; TURNPENNY et al., 2006a).

Por isso, para promover a melhor condição de cultura nas células cCGEs foram necessários meios específicos e suplementos. Usualmente, nas espécies de mamíferos as CGEs têm sido realizado com o co-cultivo sobre uma monocamada embrionária ou fetal de fibroblastos de camundongos inativados mitoticamente. De acordo com Koh et al., 2013, as monocamadas fibroblásticas auxiliam na produção de fatores de crescimento, que controlam o crescimento e a diferenciação celular. Assim, neste estudo decidiu-se promover essa monocamada utilizando o próprio fibroblasto embrionário canino. A utilização das monocamadas nos cultivos de cCGEs ajudaram as colônias celulares a se fixarem na placa de cultura e permanecerem em cultivo por um período prolongado.

Condições particulares, como a adição de suplementos foram também requeridos para o desenvolvimento e proliferação na cultura das cCGEs. Suplementos, como o LIF, auxiliaram para manter o estado indiferenciado das células, mantendo os níveis de pluripotência e reduzindo os níveis de morte celular (DUNGLISON; BARLOW; SARGENT, 1996; ZHANG et al., 2006). O aditivo bFGF é importante no início da cultura das CGEs humanas e CGEs de camundongos porque funciona como um mitógeno potente para as células (HAIG; GRAHAM; HOLMES, 1991; HAÏK et al., 2000). Outro importante suplemento utilizado é o fator forscolin. Pesquisas em CGEs humanas e de camundongos demonstraram que ao adicionar este suplemento aumenta o número das colônias, pois aumenta os níveis de CAMP intracelular estimulando o ciclo adimilato da proteína Kinase A, promovendo a auto-renovação (DOLCI; PESCE; FELICI, 1993; TURNPENNY, et al., 2003). Ao adicionar todos esses fatores no cultivo de cCGEs, como demonstraram os resultados, verificou-se formações de colônias sendo todas positivas para AP até o vigésimo dia de cultura. A marcação de AP é comumente utilizada para marcar células pluripotentes e possui um importante papel na identificação das CGPs, bem como nas CGEs (MacGREGOR et al., 1995; YABUTA et al., 2006). Desta forma, os resultados com CGEs caninas estão de acordo com os encontrados nas CGEs humanas, de camundongos e suínos (DURCOVA-HILLS et al., 2003; PARK et al., 2004; PETKOV et al., 2011; PIEDRAHITA et al., 1998). Contudo, na ausência destes suplementos e da monocamada fibroblástica houve falhas na sobrevivência das cCGEs, não derivando colônias e as CGES foram, facilmente, modificando sua morfologia em outros tipos celulares, como células epitelias e fibroblastoídes.

Quando as cCGEs foram colocadas em cultura com todos os suplementos, mas na ausência de monocamadas fibroblásticas, notou-se formar pequenos agregados esféricos com características de corpos embrioides positivos, fortemente marcados para AP. A habilidade de se diferenciar em corpos embrioides, em culturas suspensões *in vitro,* é uma das características

de células-tronco pluripotentes. Deste modo, as cCGEs vão de encontro com descrito em CGEs humanas, onde foi possível a formação de células com características de EBs (SHAMBLOTT et al., 1998).

As colônias das cCGEs foram positivas para os anticorpos POU5F1, DDX4, DAZL, DPPA3 e THY-1 e expressaram o gene pluripotente NANOG. Tal resultado sugeriu as características de uma colônia CGEs, as quais possuem positividade para ambos os marcadores pluripotentes quanto germinativos (TANG et al., 2016). Tais resultados vão de encontro com o encontrado nas CGEs de humanos, camundongos, suínos e coelhos (KAKEGAWA et al., 2008; KERR et al., 2008; MCLAREN, 2003; PETKOV et al., 2011b). Infelizmente, não houve imunomarcação para o anticorpo SSEA1, sendo considerado um marcador chave para identificar as CGEs de camundongos e humanos (DURCOVA-HILLS; AINSCOUGH; MCLAREN, 2001; TURNPENNY et al., 2006b). Porém, a falta da imunomarcação de SSEA1 em células-tronco e iPS de cães é variável, pois em alguns estudos relatam a expressão e em outros são ausentes (HATOYA et al., 2006; VAAGS et al., 2009; WHITWORTH; OVCHINNIKOV; WOLVETANG, 2012).

Reprogramações epigenéticas também foram analisadas nas colônias das cCGEs pela técnica de imunocitoquímica. Geralmente, o cultivo *in vitro* de células-tronco está suscetível à mudança na metilação do DNA (DEAN et al., 1998). Essas mudanças epigenéticas durante cultivo implicam no uso restrito dessas células quando aplicadas à medicina regenerativa, pois podem apresentar tumorogênesis e restrição na diferenciação em outros tipos celulares (CINZIA et al., 2004). Neste estudo com cCGEs, verificamos que as colônias não apresentaram positividade para o marcador de metilação 5mC, contudo houve a presença do anticorpo 5hmC. Este resultado difere do encontrado nas gônadas masculinas *in vivo* (experimento 1), em que houve a marcação de 5mC e ausência de 5hmC. Tais resultados sugerem que o cultivo *in vitro* das cCGEs modificam seu estados de metilação do DNA, exibindo a oxidação de 5mC à 5hmC.

Como houve uma diferença do estado de metilação do DNA, durante o cultivo *in vitro* das cCGEs, decidiu-se realizar o teste de formação de teratoma para averiguar o potencial tumorogênico destas células. Este teste também é usualmente realizado em células CGEs de camundongos para a comprovação dos três folhetos germinativos, avaliando-se assim, seu potencial de pluripotência (DURCOVA-HILLS; SURANI, 2008). Contudo, neste estudo, após oito semanas de inoculação, não foram evidenciados quaisquer formações tumorais nos camundongos *Balb/c Nude*. Em cães não existem pesquisas relatando formações de teratomas com CGEs. Os únicos estudos relacionados à formação de tumores em cães são em células a partir de iPS e, mesmo assim, os resultados são divergentes. Dados na literatura como as

pesquisas de Luo et al., (2011); Shimada et al., (2010), não obtiveram sucesso na formação tumoral de células iPS caninas após 7-12 semanas de inoculação, sugerindo que a injeção destas células em camundongos imuno suprimidos não fosse a forma mais adequada para a formação de tumores. Contudo, Whitworth; Ovchinnikov; Wolvetang, (2012) injetaram as células iPS caninas em oito linhagens de camundongos *nudes* e relataram formações tumorais após 16 semanas em apenas dois camundongos. Os tumores possuíam discretas formações de cordões com características germinativas assemelhando-se a tumores germinativos. Koh; Piedrahita, (2014), após sete semanas de inoculação de células iPS caninas, são os únicos autores que relatam as formações tumorais provenientes dos três folhetos germinativos. Em humanos, é comum a formação de tumores em células-tronco embrionárias com a evidência dos três folhetos germinativos (DONOVAN, 2003). Contudo, em hCGEs não existem relatos de formação de tumores *in vivo* (LI et al., 2014; PAN et al., 2005; LIU et al., 2004; PARK et al., 2004; SHAMBLOTT et al., 2001). De acordo com Turnpenny et al., 2006, a ausência de formações tumorais não significa que as células hCGEs não possuem pluripotência, e sim, que estas células possuem respostas ambientais diferentes quando injetadas em camundongos imuno suprimidos. O fato das CGEs caninas não formarem tumores, primeiramente, sugere que elas são mais semelhantes às hCGEs e possuem respostas biológicas diferentes das CGEs de camundongos. E, segundo, pode ser que, aumentando às semanas pós inoculação das cCGEs, ocorra à evidência da formação tumoral, como visto nas iPS caninas.

Variações na cultura de CGEs têm sido descritos, principalmente, em células germinativas embrionárias humanas (hCGEs) (BAZLEY et al., 2015). Na revisão realizada por Turnpenny et al., (2006b), sobre as hCGEs, relatou a existência de dois tipos celulares, uma nomeada de proliferação pobre (PP), a qual demonstra ausência de colônias celulares, fracamente positivas para AP e que permanecia em cultura por tempo limitado. O segundo tipo celular são as de proliferações vigorosas (VP), as quais formam numerosas colônias, que são fortemente positivas para AP e permanecem em cultura por aproximadamente 14 passagens. Neste estudo foi constado que as cCGEs exibiram a formação de colônias que são fortemente positivas para AP e expressam marcadores pluripotentes e germinativos. Contudo, a taxa de proliferação decai constantemente conforme os dias de cultura, produzindo uma linhagem de cCGEs instável que perde a capacidade pluripotente.

7.4 CONCLUSÕES PRELIMINARES

A derivação das CGEs foi relatada em diversas espécies e por vários grupos de pesquisas e continua sendo tema de pesquisas atuais. Isto é devido à capacidade das CGPs abrir uma gama de oportunidades, pois se torna um modelo desejável de pesquisa na área reprodutiva e uma fonte potencial de produção futura de gametas *in vitro*. Neste estudo, teve-se como objetivo derivar as cCGEs e identificar qual é a dinâmica de marcadores pluripotentes, germinativos e epigenéticos que são importantes durante o seu desenvolvimento. Assim, verificou-se que:

- ✓ Foi possível derivar CGEs, a partir de embriões com 30 dias de gestação, pois estes apresentavam células germinativas juntamente com a expressão de genes e marcadores pluripotentes.
- ✓ As colônias de CGEs são positivas fortemente para AP, expressam o gene pluripotente NANOG e o marcador pluripotente POU5F1 e germinativos DDX4, DAZL e DPPA3.
- ✓ São capazes de formar corpos embrioides positivos AP.
- ✓ Não apresentou formação de teratomas *in vivo*.
- ✓ Apresentou alteração dos marcadores epigenéticos 5mC e 5hmC quando comparados com o embrião *in vivo*.
- ✓ Mesmo sobre condições particulares de cultura, como os suplementos, não foram capazes de manterem-se em cultura em longo prazo.

8.0 CONCLUSÃO GERAL

1)No experimento 1, vimos que durante o desenvolvimento das gônadas á testículo fetal as CGPs masculinas são epigeneticamente reprogramadas no perido inicial ao 22pF.

2)No experimento 2, verificamos que as CGPs masculinas caninas possuem a capacidade de se diferenciarem em CGEs, contudo possuem um tempo limitado durante sua cultura celular.

9.0 PERSPECTIVAS FUTURAS

Cães têm sido usados como modelo animal em terapias de doenças e transplantes há mais de uma década. Quando comparados os cães com a espécie camundongo, percebeu-se que os cães possuem vida útil longa, são geneticamente e fisiologicamente mais parecidos com os humanos do que os roedores. Isto faz do cão um ótimo modelo de estudo para transpor os conhecimentos a humanos em terapias celulares e na manipulação genética.

Ao ser capaz de identificar as assinaturas moleculares das cCGPs e cCGEs, pode tornar-se uma ferramenta valiosa para isolar esta população de células germinativas distinta para análise citológica e molecular. De grande interesse é o período de desenvolvimento no destino das células germinativas estudado nesta pesquisa, pois é o momento em que as células germinativas caninas demonstram ter a capacidade de formar cCGEs. Esta informação poderá auxiliar em futuras pesquisas para a identificação das células progenitoras, as cCGEs, bem como nos mecanismos envolvidos na sua conversão.

REFERÊNCIA

AGUERO, T.; KASSMER, S.; ALBERIO, R.; JOHNSON, A.; KING, M.L. mechanisms of vertebrate germ cell determination. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 953, p. 383-440, 2017.

ALLEGRUCCI, C.; DENNING, C.; PRIDDLE, H. L. Y. Stem-cell consequences of embryo epigenetic defects. **Lancet**, v. 364, p. 206-208, 2004.

ALBRECHT, K. H.; EICHER, E. M. Evidence that Sry is expressed in pre-Sertoli cells and Sertoli and granulosa cells have a common precursor. **Developmental biology**, v. 240, n. 1, p. 92-107, 2001.

ANANTHAKRISHNAN, R.; EHRLICHER, A. The forces behind cell movement. **International journal of biological sciences**, v. 3, n. 5, p. 303-317, 2007.

ANDERSON, R. A; NORMA, FULTON; GILLIAN, COWAN; SHONA, COUTTS.; PHILIPPA, T. K.;SAUNDERS, P. Y. Conserved and divergent patterns of expression of DAZL, VASA and OCT4 in the germ cells of the human fetal ovary and testis. **BMC developmental biology**, v. 7, p. 136, 2007.

ARNOLD, S. J.; MARETTO, S; ISLAM, A.; BIKOFF, E. K.; ROBERTSON, E. J. Dose-dependent Smad1 , Smad5 and Smad8 signaling in the early mouse embryo. **Developmental Biolology**, v. 296, p. 104-118, 2006.

BAZLEY, F.; LIU, C. F.; YUAN, X.; HAO, H.; ALL, A. H.; DE LOS ANGELES, A.; ZAMBIDIS, E. T.; GEARHART, J. D.;KERR, C. L. Direct reprogramming of human primordial germ cells into induced pluripotent stem cells: efficient generation of genetically engineered germ cells. **Stem cells and development**, v. 24, n. 22, p. 2634-48, 2015.

BERNSTEIN, B. E.; MEISSNER, A.; LANDER, E. S. Review The mammalian epigenome. **Stem cells and development**, v. 4, n, p. 669-681, 2007.

BHIN, J.; JEONG, H. S.; KIM, J. S.; SHIN, J. O.; HONG, K. S.; JUNG, H. S.; KIM, C.; HWANG, D.; KIM, K. S. PGC-Enriched miRNAs control germ cell development. **Molecular cell**, v. 38, n. 10, p. 895-903, 2015.

BIASON-LAUBER, A. Control of sex development. **Best Practice & Research Clinical**

Endocrinology & Metabolism, v. 24, n. 2, p. 163-186, 2010.

BOWLES, J.; KNIGHT, D.; SMITH, C.; WILHELM, D.; RICHMAN, J.; MAMIYA, S.; YASHIRO, K.; CHAWENGSAKSOPHAK, K.; WILSON, M. J.; ROSSANT, J.; HAMADA, H.; KOOPMAN, P. Retinoid signaling determines germ cell fate in mice. **Science**, v. 312, n. 5773, p. 596–600, 2006.

BUCAY, N.; YEBRA, M.; CIRULLI, V.; AFRIKANOVA, I.; KAIDO, T.; HAYEK, A.; MONTGOMERY, A. M. A novel approach for the derivation of putative primordial germ cells and sertoli cells from human embryonic stem cells. **Stem cells**, v. 27, n. 1, p. 68-77, 2009.

BULLEJOS, M.; KOOPMAN, P. Spatially Dynamic Expression of Sry in Mouse. **Development Dynanimic**., v. 205, n. Jan., p. 201-205, 2001.

CASTRILLON, D. H.; QUADE, B. J.; WANG, T. Y.; QUIGLEY, C.; CRUM, C. P. The human VASA gene is specifically expressed in the germ cell lineage. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 17, p. 9585-90, 15 ago., 2000.

CHANG, H.; MATZUK, M. M. Smad5 is required for mouse primordial germ cell development. **Mechanisms of Development**,v. 104, p. 61-67, 2001.

CHASTANT-MAILLARD, S.; CHEBROUT, M.; THOUMIRE, S.; SAINT-DIZIER, M.; CHODKIEWICZ, M.; REYNAUD. K. Embryo biotechnology in the dog: a review. **Reproduction, fertility, and development**, v. 22, n. 7, p. 1049-56, jan. 2010.

CHEN, H-H.; WELLING, M.; BLOCH, D. B.; MUÑOZ, J.; MIENTJES, E.; CHEN, X.; TRAMP, C.; WU, J.; YABUUCHI, A.; CHOU, Y-F.; BUECKER, C.; KRAINER, A.; WILLEMSEN, R.; HECK, A. J.; GEIJSEN, N. DAZL limits pluripotency, differentiation, and apoptosis in developing primordial germ cells. **Stem Cell Repor ts**, p. 892–904, 2014.

CHUVA, S. M.; HAYASHI, K.; SHOVLIN, T.C.; MIFSUD, W,; SURANI, M.A.; MCLAREN, A. X Chromosome activity in mouse XX Primordial Germ Cells.**Plosone genetics**, v. 4, n. 2, p. 0001-0008, 2008.

CHUVA DE SOUSA LOPES, S. M.; ROELEN, B. A J. On the formation of germ cells: The good, the bad and the ugly. **Differentiation; Research In Biological Diversity**, v. 79, n. 3, p. 131-40, mar. 2010.

CINALLI, R. M.; RANGAN, P.; LEHMANN, R. Germ cells are forever. **Cell**, v. 132, n. 4, p. 559-62, 22 fev. 2008.

CONG, Y.; MA, J,; SUN, R.; WANG, J.; XUE, B.; WANG, J.; XIE, B.; WANG, J.; HU, K.; LIU, Z. Derivation of putative porcine embryonic germ cells and analysis of their multi-lineage differentiation potential. **Journal of Genetics and Genomics**, v. 40, n. 9, p. 453-464, 2013.

COVENEY, D.; COOL, J.; OLIVER, T.;CAPEL, B. Four-dimensional analysis of vascularization during primary development of an organ , the gonad. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, p. 7212-7, 2008.

DAHL, C.; GRØNBÆK, K.; GULDBERG, P. Advances in DNA methylation: 5-hydroxymethylcytosine revisited. **Clinica chimica acta:** International Journal of Clinical Chemistry, v. 412, n. 11–12, p. 831-6, 12 maio 2011.

DAVIS, T. L.;. YANG, G. J.; MCCARREY, J. R.; BARTOLOMEI, M. S. The H19 methylation imprint is erased and re-established differentially on the parental alleles during male germ cell development. **Human molecular genetics**, v. 9, n. 19, p. 2885-2894, 2000.

DE FELICI, M. Nuclear reprogramming in mouse primordial germ cells: epigenetic contribution. **Stem Cells International**, v. 2011, ID. 425863, jan. 2011.

DEAN, W.; BOWDEN, L.; AITCHISON, A.; KLOSE, J.; MOORE, T.; MENESES, J. J.; REIK, W.; FEIL, R. Altered imprinted gene methylation and expression in completely ES cell- derived mouse fetuses : association with aberrant phenotypes. **Development**, v. 2282, p. 2273-2282, 1998.

DECHIARA, T. M.; ROBERTSON, E. J.; EFSTRATIADIS, A. parental imprinting of the mouse insulin-like growth factor II gene. **Cell**, v. 64, n. 4, p. 849–59, 22 fev. 1991.

DEICHMANN, U. Epigenetics : The origins and evolution of a fashionable topic. **Developmental biology**, v. 416, p. 249-254, 2016.

DOLCI, S.; PESCE, M.; FELICI, M. D. E. Combined Action of Stem Cell Factor, Leukemia Inhibitory Factor, and cAMP. **Molecular Reproduction and Development.**, v. 139, p. 134-139, 1993.

DOLCI, S.; WILLIAMS, D. E.; ERNST, M. K.; RESNICK, J. L.; BRANNAN, C. I.; LOCK,

L. F.; LYMAN, S. D.; BOSWELL, H.S. D. P. Requirement for mast cell growth factor for primordial germ cell survival in culture. **Nature**, v. 352, p. 809-11, 1991.

DONOVAN, P. J; MIGUEL, M. P. Turning germ cells into stem cells. **Current Opinion In Genetics & Development**, v. 13, p. 463-471, 2003.

DUNGLISON, G. F.; BARLOW, D. H.; SARGENT, I. L. Leukaemia inhibitory factor significantly enhances the blastocyst formation rates of human embryos cultured in serum-free medium. **Human Reproduction**, v. 11, n. 1, p. 191-196, 1996.

DURCOVA-HILLS, G.; TOKUNAGA, T.; KUROSAKA, S.; YAMAGUCHI, M.; TAKAHASHI, S.; IMAI, H. Immunomagnetic isolation of primordial germ cells and the establishment of embryonic germ cell lines in the mouse**. Cloning**, v. 1, n. 4, p. 217-224, 2000.

DURCOVA-HILLS, G.; WIANNY, F.; MERRIMAN, J.; ZERNICKA-GOETZ, M.; MCLAREN, A. Developmental fate of embryonic germ cells (EGCs), in vivo and in vitro. **Differentiation; research in biological diversity**, v. 71, n. 2, p. 135-41, mar. 2003.

DURCOVA-HILLS, G.; AINSCOUGH, J. F.-X.; MCLAREN, A. Pluripotential stem cells derived from migrating primordial germ cells. **Differentiation**, v. 68, n. 4/5, p. 220-226, 2001.

DURCOVA-HILLS, G.; SURANI, A. Reprogramming primordial germ cells (PGC) to embryonic germ (EG) cells. **Current protocols in stem cell biology**, v. Chapter 1, n. Apr., p 2008.

EGERMANN, M.; GOLDHAHN, J.; SCHNEIDER, E. Animal models for fracture treatment in osteoporosis. **Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA**, v. 16, p. S129-38, 2005. Supplement 2.

ERAN ALTMAN, M. D; PAMELA YANGO, B. S.; RADWA MOUSTAFA, B. S.; JAMES F. SMITH, M. D.; MS3,KLATSKY, P. C.; TRAN, N. D.; FRANCISCO, S. Characterization of human spermatogonial stem cell markers in fetal, pediatric, and adult testicular tissues. **Reproduction**, v. 148, n. 4, p. 417-427, 2015.

FELICI, M. D. E. Primordial germ cell biology at the beginning of the XXI Century. **International Journal of Developmental Biology**, v. 53, p. 891-894, 2009.

FENG, S.; JACOBSEN, S. E.; REIK, W. Epigenetic reprogramming in plant and animal development. **Science**, v. 330, n. 6004, p. 622-7, 2010.

FUJIMOTO, T.; MIYAYAMA, Y.; FUYUTA, M. The origin, migration and fine morphology of human primordial germ cell **Anatomical Record**, v. 188, n. 3, p. 315-30, jul. 1977.

FUJIWARA, Y.; KOMIYA, T.; KAWABATA, H.; SATO, M.; FUJIMOTO, H.; FURUSAWA, M.; NOCE, T. Isolation of a DEAD-family protein gene that encodes a murine homolog of Drosophila vasa and its specific expression in germ cell lineage. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 91, n. 25, p. 12258-62, 6 dez. 1994.

GIER, H. T.; MARION, G. B. Development of mammalian testes and genital ducts. **Biology of Reproduction**, v. 23, p. 1-23, 1969.

GODMANN, M.; LAMBROT, R.; KIMMINS, S. The Dynamic Epigenetic Program in Male Germ Cells : Its Role in Spermatogenesis , Testis Cancer , and Its Response to the Environment. **Microscopy Research and Technique**, v. 619, p. 603-619, 2009.

HACKETT, J. A; ZYLICZ, J. J.; SURANI, M. A. Parallel mechanisms of epigenetic reprogramming in the germline. **Trends in genetics :** TIG, v. 28, n. 4, p. 164-74, 2012.

HAIG, D.; GRAHAM, C.; HOLMES, H. S. Genomic imprinting and the strange case of the insulin-like growth factor II receptor: minireview. **Cell**, v. 94, p. 1045-1046, 1991.

HAJKOVA, P.; ERHARDT, S.; LANE, N.; HAAF, T.; EL-MAARRI, O.; REIK, W.; WALTER, J.; SURANI, M.A. Epigenetic reprogramming in mouse primordial germ cells. **Mechanisms of Development**, v. 117, n. 1/2, p. 15-23, 2002.

HAJKOVA, P.; ANCELIN, K.; WALDMANN, T.; LACOSTE, N.; LANGE, U. C.; CESARI, F.; LEE, C.; ALMOUZNI, G.; SCHNEIDER, R.; SURANI, M.A. Chromatin dynamics during epigenetic reprogramming in the mouse germ line. **Nature**, v. 452, n. 7189, p. 877-81, 17 abr., 2008.

HANNA, C. W.; KELSEY, G. The specification of imprints in mammals. **Heredity**, v. 113, n. 2, p. 176-83, ago., 2014.

HAÏK, S.; GAUTHIER, L. R.; GRANOTIER, C.; PEYRIN, J. M.; LAGES, C. S.; DORMONT, D.; BOUSSIN, F. D. Fibroblast growth factor 2 up regulates telomerase activity in neural precursor cells. **Oncongene**, v. 19, p. 2957-66, 2000.

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, n. 3, p. 298-305, 2006.

HAYASHI, K.; KOBAYASHI, T.; UMINO, T.; GOITSUKA, R.; MATSUI, Y.; KITAMURA, D. SMAD1 signaling is critical for initial commitment of germ cell lineage from mouse epiblast. **Mechanism of Devevelopment.**, v. 118, p. 99-109, 2002.

HAYASHI, K.; CHUVA DE SOUSA LOPES, S. M.; KANEDA, M.; TANG, F.; HAJKOVA, P.; LAO, K.; O'CARROLL, D.; DAS, P. P.; TARAKHOVSKY, A.; MISKA, E. A.; SURANI, M. A. MicroRNA biogenesis is required for mouse primordial germ cell development and spermatogenesis. **Plosone**, v. 3, n. 3, p. 1-9, 2008.

HAYASHI, K.; OHTA, H.; KURIMOTO, K.; ARAMAKI, S.; SAITOU, M. Reconstitution of the mouse germ cell specification pathway in culture by pluripotent stem cells. **Cell**, v. 146, n. 4, p. 519-32, 19 ago. 2011.

HAYASHI, K.; DE SOUSA LOPES, S. M. C.; SURANI, M. A. Germ cell specification in mice. **Science** , v. 316, n. 5823, p. 394-6, 2007.

HAYASHI, Y.; SAITOU, M.; YAMANAKA, S. Germline development from human pluripotent stem cells toward disease modeling of infertility. **Fertility and Sterility**, v. 97, n. 6, p. 1250-9, 2012.

HEEREN, A. M.; VAN IPEREN, A. L.; KLOOTWIJK, D. B.; DE MELO, BERNARDO, A.; ROOST, M. S.; GOMES FERNANDES, M. M.; LOUWE, L. A.; HILDERS, C. G.; HELMERHORST, F. M.; VAN DER WESTERLAKEN, L. A.; LOPES, S. M. C. de S. Development of the follicular basement membrane during human gametogenesis and early folliculogenesis. **BMC Developmental Biology**, v. 15, p. 4, 2015.

HEEREN, A. M.; HE, N.; SOUZA, A. F. de, GOERCHARN-RAMLAL, VAN IPEREN, A. L.; ROOST, M. S.; FERNANDES, M. M. G.; VAN DER WESTERLAKEN, L. A. J.; LOPES, S. M. C. de S On the development of extragonadal and gonadal human germ cells. **Biology open**, v. 5, n. 2, p. 185-94, Jan. 2016.

HEIKKILA, M.; PRUNSKAITE, R.; NAILLA,T. F.; ITÄRANTA, P.;VUORISTO, J.; LEPPÄLUOTO, J.; PELTOKETO, H.; VAINIO, S.The partial female to male sex reversal in Wnt-4: deficient females involves induced expression of testosterone biosynthetic genes and testosterone production , and depends on androgen action. **Endocrinology**, v. 146, n. Jan., p.

4016-4023, 2005.

HENDRIKS, S.; DANCET, E. A.; VAN PELT, A. M.; HAMER, G.; REPPING, S.Artificial gametes: a systematic review of biological progress towards clinical application. **Human Reproduction Update**, v. 21, n. 6, p. 285-96, 2015.

HOEI-HANSEN, C. E.; ALMSTRUP, K.; NIELSEN, J.E.; BRASK SONNE, S.; GRAEM, N.; SKAKKEBAEK, N.E.; LEFFERS, H.; RAJPERT-DE MEYTS, E. Stem cell pluripotency factor NANOG is expressed in human fetal gonocytes , testicular carcinoma in situ and germ cell tumours. **Histopathology**, v. 47, p. 48-56, 2005.

HOUSTON, C. S.; OPITZ, J. M.; SPRANGER, J. W.; MACPHERSON, R. I.; REED, M. H.; GILBERT, E. F.;HERRMANN, J.;SCHINZEL, A. The Campomelic syndrome review: report of 17 cases , and follow-up on the currently 17-year-old boy first reported by Maroteaux et al in 1971. **American Journal of Medid Genetics**, v. 28, p. 3-28, 1983.

HØYER, P. E.; BYSKOV, A. G.; MØLLGÅRD, K. Stem cell factor and c-Kit in human primordial germ cells and fetal ovaries. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 234, n. 1/2, p. 1-10, 2005.

HUIDOBRO, C.; FERNANDEZ, A. F.; FRAGA, M. F. Molecular aspects of medicine aging epigenetics : causes and consequences. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 34, n. 4, p. 765-781, 2013.

HUMMITZSCH, K.; IRVING-RODGERS, H. F.; HATZIRODOS, N.; BONNER, W.; SABATIER, L.; REINHARDT, D. P.; SADO, Y.; NINOMIYA, Y.; WILHELM, D.; RODGERS, R. J. A new model of development of the mammalian ovary and follicles. **Plosone**, v. 8, n. 2, p. e55578, 2013.

HYLDIG, S.M.W; OSTRUP, O; VEJLSTED, M; THOMSEN, P.D. Changes of DNA Methylation Level and Spatial Arragement of Primordial Germ Cells in Embryonic Day 15 to Embryonic Day 28 Pig Embryos. **Biology of Reproduction**, v.84, p. 1087-1093, 2011.

HYTTEL, P.; SINOWATZ, F.;VEJLSTED, M.; BETTERIDGE, K. Essentials of domestic animal embryology. 11th ed. Toronto: Elsevier, 2010. p.208-215.

IRIE, N.; WEINBERGER, L.; TANG, W.W.; KOBAYASHI, T.; VIUKOV, S.; MANOR, Y.S.; DIETMANN, S.; HANNA, J.H.; SURANI, M.A. .SOX17 is a critical specifier of human primordial germ cell fate. **Cell**, v. 160, n. 1/2, p. 253-268, dec. 2014.

J JESKE, Y.; W., BOWLES.;J., GREENFIELD.; A., KOOPMAN, P. Expression of a linear SRY transcript in the mouse genital ridge. **Nature**, v. 10, p. 480-482, 1995.

JIMÉNEZ, R. Ovarian organogenesis in mammals : mice cannot tell us everything. **Sexual Development**, v. 3, p. 291-301, 2009.
JONES, P. A. Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. **NatureReviews. Genetics**, v. 13, n. 7, p. 484-92, 2012.

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, n. 1, p. 173-82, 2007.

KAFRI, T.; ARIEL, M.; BRANDEIS, M.; SHEMER, R.; URVEN, L.; MCCARREY, J.; CEDAR, H.; RAZIN, A. Developmental pattern of gene-specific DNA methylation in the mouse embryo and germ line. **Genes & Development**, v. 6, n. 5, p. 705-714, 1992.

KAKEGAWA, R.; TERAMURA, T.; TAKEHARA, T.; ANZAI, M.; MITANI, T.; MATSUMOTO, 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. 352-7, 2008.

KATSUHIKO HAYASHI, SUSANA M. CHUVA DE SOUSA LOPES, M. A. S. Germ cell specification in mice. **science**, v. 316, n. l, p. 394-397, 2007.

KAWASAKI, Y.; LEE, J.; MATSUZAWA, A.; KOHDA, T.; KANEKO-ISHINO, T.; ISHINO, F. Active DNA demethylation is required for complete imprint erasure in primordial germ cells. **Scientific reports**, v. 4, p. 3658, jan. 2014.

KEHLER, J.; TOLKUNOVA, E.; KOSCHORZ, B.; PESCE, M.; GENTILE, L.; BOIANI, M.; LOMELÍ, H.; NAGY, A.; MCLAUGHLIN, K.J.; SCHÖLER, H.R.; TOMILIN, A. Oct4 is required for primordial germ cell survival. **Embo Reports**, v. 5, n. 11, p. 1078-83, 2004.

KERR, C. L.;HILL, C. M.; BLUMENTHAL, P. D.; GEARHART, J. D. Expression of pluripotent stem cell markers in the human fetal ovary. **Human Reproduction**, v. 23, p. 589-599, 2008.

KIM, J. N.; LEE, Y. M.; PARK, T.; 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, n. 4, p. 1038-49, 2005.

KIM, Y.; KOBAYASHI, A.; SEKIDO, R.; DINAPOLI, L.; BRENNAN, J.; CHABOISSIER, M. C.; POULAT, F.; BEHRINGER, R. R.; LOVELL-BADGE, R.; CAPEL, B. Fgf9 and Wnt4 act as antagonistic signals to regulate mammalian sex determination. **Plosone**, v. 4, n. 6, p. 1000-1009, 2006.

KIMURA, T.; NAKANO, T. Induction of pluripotency in primordial germ cells Histology and. **Histology Histopathol**, v. 5, p. 643–650, 2011.

KIRKNESS, E. F. The dog genome : survey sequencing and comparative. **Science**, v. 301, n. 2003, p. 1898-903, 2003.

KOH, S.; THOMAS, R,; TSAI, S.; BISCHOFF, S.; LIM, J. H.; BREEN, M.; OLBY, N.J .; PIEDRAHITA, J. A. Growth requirements and chromosomal instability of induced pluripotent stem cells generated from adult canine fibroblasts. **Stem Cells and Development**, v. 22, n. 6, p. 951-63, 2013.

KOUBOVA, J.; MENKE, D. B.; ZHOU, Q.; CAPEL, B.; GRISWOLD, M. .; PAGE, D. C. Retinoic acid regulates sex-specific timing of meiotic initiation in mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 8, p. 2474-9, 21 fev. 2006.

KUMAR, S.; CUNNINGHAM, T. J.; DUESTER, G. Resolving molecular events in the regulation of meiosis in male and female germ cells. **Science signaling**, v. 6, n. 288, p. pe25, 13 ago. 2013.

LAI, D.; XU, M.; ZHANG, Q.; CHEN, Y.; LI, T.; WANG, Q.; GAO, Y.; WEI, C.; Identification and characterization of epithelial cells derived from human ovarian follicular fluid. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 6, p. 1-13, 2015.

LAWSON, K. A.; DUNN, N. R.; ROELEN, B. A.; ZEINSTRA, L. M.; DAVIS, A. M.; WRIGHT, C. V.; KORVING, J. P.; HOGAN, B. L. Bmp4 is required for the generation of primordial germ cells in the mouse embryo. **Genes & development**, v. 13, n. 4, p. 424-36, 15 fev. 1999.

LEE, J.; KIM, H.K.; RHO, J.Y.; HAN, Y.M.; KIM, J.The human OCT-4 isoforms differ in their ability to confer self-renewal. **Journal of biological chemistry**, v. 281, n. 44, p. 33554-65, 2006.

LEE, K. H.; LEE, R.; LEE, W.Y.; KIM, D.H.; CHUNG, H.J.; KIM, J.H.; KIM, N.H.;, CHOI, S.H.; KIM, J.H.; SONG, H. Identification and in vitro derivation of spermatogonia in Beagle

testis. **Plosone**, v. 9, n. 10, p. 1-9, 2014.

LEITCH, H. G.; BLAIR, K.; MANSFIELD, W.; AYETEY, H.; HUMPHREYS, P.; NICHOLS, J.; SURANI, M.A.; SMITH, A. Embryonic germ cells from mice and rats exhibit properties consistent with a generic pluripotent ground state. **Development**, v. 137, n. 14, p. 2279-87, jul. 2010.
LI, E. Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development. **Nature reviews. Genetics**, v. 3, n. 9, p. 662-73, set. 2002.

LI, Y.; HONG, W. X.; LAN, B.; XU, X.; LIU, Y.; KONG, L.; LI, Y.; ZHOU, S.; LIU, Y.; FENG, R.; JIANG, S.; HE, Q.; TAN, J. PDGF mediates derivation of human embryonic germ cells. **Differentiation; Research in Biological Diversity**, v. 86, n. 4-5, p. 141-8, 2014.

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 and Tissue Research**, v. 318, n. 3, p. 525-31, 2004.

LOBASCIO, A. M; KLINGER, F. G; SCALDAFERRI, M. L.; FARINI, D.; DE FELICI, M. Analysis of programmed cell death in mouse fetal oocytes. **Reproduction**, v.134, p.241-252, 2007.

LUCIFERO D.; MANN M.R.; BARTOLOMEI, M. S.;TRASLER, J. M. Gene-specific timing and epigenetic memory in oocyte imprinting. **Human Molecular Genetics**, v. 13, n. 8, p. 839-849, 2004.

LUO, J.; SUHR, S. T; CHANG, E. A.; WANG, K.; ROSS, P. J.; NELSON, L .L.; VENTA, P. J.; KNOTT, J. G.; CIBELLI, J .B. Generation of leukemia inhibitory factor and basic fibroblast growth factor-dependent induced. **Stem Cells and Development**, v. 20, n. 10, p. 1669-1678, 2011.

MACGREGOR, G. R.; ZAMBROWICZ, B. P.; SORIANO, P. Tissue non-specific alkaline phosphatase is expressed in both embryonic and extraembryonic lineages during mouse embryogenesis but is not required for migration of primordial germ cells. **Development**, v. 121, n. 5, p. 1487-96, maio 1995.

MAGNÚSDÓTTIR, E; GILLICH A.; GRABOLE, N.; SURANI, M.A. Combinatorial control of cell fate and reprogramming in the mammalian germline. **Current Opinion in Genetics & Development**, v. 22, n. 5, p. 466-74, out. 2012.

MATSUI, Y.; ZSEBO, K.; HOGAN, B. L. Derivation of pluripotential embryonic stem cells

from murine primordial germ cells in culture. **Cell**, v. 70, n. 5, p. 841-7, 4 set. 1992.

MCLAREN, A. Primordial germ cells in the mouse. **Developmental Biology**, v. 262, n. 1, p. 1-15, 2003.

MEDRANO, J. V.; MARQUÉS-MARÍ, A. I.; AGUILAR, C. E.; RIBOLDI, M.; GARRIDO, N.; MARTÍNEZ-ROMERO, A.; O'CONNOR, E.; GIL-SALOM, M,.; SIMÓN, C. Comparative analysis of the germ cell markers c-KIT, SSEA-1 and VASA in testicular biopsies from secretory and obstructive azoospermias. **Molecular Human Reproduction**, v. 16, n. 11, p. 811-7, 2010.

HARKEY, M. A.; H.; ASANO, A.; ZOULAS, M. E.; TOTOK-STORB, B.; NAGASHIMA J.; TRAVIS, A. Isolation, genetic manipulation, and transplantation of canine spermatogonial stem cells: progress toward transgenesis through the male germ-line. **Reproduction**, v. 146, n. 1, p. 75-90, 2013.

MOAREFI, A. H.; CHÉDIN, F. ICF syndrome mutations cause a broad spectrum of biochemical defects in DNMT3B-mediated de novo DNA methylation. **Journal of Molecular Biology**, v. 409, n. 5, p. 758-72, jun. 2011.

MOÏSE, N. S. Inherited arrhythmias in the dog: potential experimental models of cardiac disease. **Cardiovascular Research**, v. 44, n. 1, p. 37-46, out. 1999.

NAGAI, T.; YAMAHA, E.; ARAI, K. Differentiation of primordial germ cells in zebrafish. **Zoology Science**., v. 18, p. 215-223, 2001.

NAGAMATSU, G; KOSAKA, T.; SAITO, S.; TAKUBO, K.; AKIYAMA, H.; SUDO, T.; HORIMOTO, K.; OYA, M.; SUDA, T. Tracing the conversion process from primordial germ cells to pluripotent stem cells in mice. **Biology of Reproduction**, v. 86, n. 6, p. 182, 2012a.

NANDA, S.; DEFALCO, T. J.; LOH, S. H.; PHOCHANUKUL, N.; CAMARA, N.; VAN, DOREN M.; RUSSELL, S. Sox100B , a drosophila group e sox-domain gene , is required for somatic testis differentiation. **Sexual Development**, v. 26, p. 26-37, 2009.

NAKAMURA, T.; ARAI, Y.; UMEHARA, H.; MASUHARA, M.; KIMURA, T.; TANIGUCHI, H.; SEKIMOTO, T.; IKAWA, M.; YONEDA, Y.; OKABE, M.; TANAKA, S.; SHIOTA, K.; NAKANO, T.PGC7/Stella protects against DNA demethylation in early embryogenesis. **Nature Cell Biology**, v.9, n. 1, p. 64-71, 2007.

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, n. 3, p. 379-91, 1998.

NIEHRS, C. The complex world of WNT receptor signalling. **Nature Publishing Group**, v. 13, n. 12, p. 767-779, 2012.

OHINATA, Y.; PAYER, B.; O'CARROLL, D.; ANCELIN, K.; ONO, Y.; SANO, M.; BARTON, S.C.; OBUKHANYCH, T.; NUSSENZWEIG, M.; TARAKHOVSKY, A.; SAITOU, M.; SURANI, M.A. Blimp1 is a critical determinant of the germ cell lineage in mice. **Nature**, v. 436, n. 7048, p. 207-13, 2005.

OKAMURA, D.; HAYASHI, K.; MATSUI, Y. Mouse epiblasts change responsiveness to BMP4 signal required for PGC formation through functions of extraembryonic ectoderm. **Molecular Reproduction and Development**, v. 70, n. 1, p. 20-9, 2005.

OVITT, C. E.; SCHÖLER, H. R. The molecular biology of Oct-4 in the early mouse embryo. **Molecular Human Reproduction**, v. 4, n. 11, p. 1021-31, 1998.

PAN, Y.; CHEN, X.; WANG, S.; YANG, S.; BAI, X.; CHI, X.; LI, K.; LIU, B.; LI, L. In vitro neuronal differentiation of cultured human embryonic germ cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 327, n. 2, p. 548-56, 11 fev. 2005.

PARK, T. S.; GALIC, Z.; CONWAY, A. E.; LINDGREN, A.; VAN HANDEL, B. J.; MAGNUSSON, M.; RICHTER, L.; TEITELL, M. A.; MIKKOLA, H. K.; LOWRY, W. E.; PLATH, K.; CLARK, A.T. Derivation of primordial germ cells from human embryonic and induced pluripotent stem cells is significantly improved by coculture with human fetal gonadal cells. **Stem cells**, v. 27, n. 4, p. 783-95, 2009.

PARK, J.H.; KIM, S.J.; LEE, J.B.; SONG, J.M.; KIM, C.G.; ROH, S. Y. H. Establishment of a human embryonic germ cell line and comparison with mouse and human embryonic stem cells. **Molecular Cells**, v. 17, p. 309-15, 2004.

PARKER, H. G.; OSTRANDER, E. A. Canine genomics and genetics: running with the pack. **PLos genetics**, v. 1, n. 5, p. e58, 2005.

PAYER, B.; SAITOU, M.; BARTON, S.C.; THRESHER, R.; DIXON, J.P.; ZAHN, D.; COLLEDGE, W.H.; CARLTON, M.B.; NAKANO, T.; SURANI, M.A. Stella is a maternal effect gene required for normal early development in mice. **Current Biology :** CB, v. 13, p.

2110-2117, 2003.

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

PESCE, M.; WANG, X.; WOLGEMUTH, D.J.; SCHÖLER, H. Differential expression of the Oct-4 transcription factor during mouse germ cell differentiation. **Mechanisms of Development**, v. 71, n. 1-2, p. 89-98, fev. 1998.

PETKOV, S. G.; MARKS, H.; KLEIN, T.; GARCIA, R.S.; GAO, Y.; STUNNENBERG, 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. 226-37, maio 2011a.
PIEDRAHITA, J. A.; MOORE, K.; OETAMA, B.; LEE, C.K.; SCALES, N.; RAMSOONDAR, J.; BAZER, F.W. Generation of transgenic porcine chimeras using primordial germ cell-derived colonies. **Biology of Reproduction**, v. 58, n. 5, p. 1321-9, 1998.

PIERI, N. C. G.; SOUZA, A. F.; MANÇANARES, A.; ROBALLO, K.; CASALS, J. B.; AMBROSIO, C. E.; MARTINS, D. S. Immunolocalization of proteins in the spermatogenesis process of canine. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 51, p. 1-7, 2016.

PIERI, N. C. G.; SOUZA, A. F.; CASALS, J. B.; ROBALLO, K.; AMBROSIO, C. E.; MARTINS, D. S. Comparative development of embryonic age by organogenesis in domestic dogs and cats. **Reproduction in domestic animals**, v. 50, p. 625-31, 2015.

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, jul. 2012.

RADDATZ, G.; GUZZARDO, P. M.; OLOVA, N.; FANTAPPIÉ, M. R.; RAMPP, M.; SCHAEFER, M.; REIK, W.; HANNON, G. J.; LYKO, F. Dnmt2-dependent methylomes lack defined DNA methylation patterns. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 21, p. 8627-31, 21 2013.

REIK, W.; DEAN, W. DNA methylation and mammalian epigenetics. **Electrophoresis**, v. 22, n. 14, p. 2838-43, 2001.

REIK, W.; SANTOS, F.; DEAN, W. Mammalian epigenomics: reprogramming the genome for development and therapy. **Theriogenology**, v. 59, n. 1, p. 21–32, 2003.

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

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

RIVERA, P.; EULER, H. VON. Molecular biological aspects on canine and human mammary tumors. **Veterinary Pathology**, v. 48, n. 1, p. 132-146, 2011.

ROSSI, P. Transcriptional control of KIT gene expression during germ cell development. v. 184, n. June, p. 179-184, 2013.

RUNYAN, C.; SCHAIBLE, K.; MOLYNEAUX, K.; WANG, Z.; LEVIN, L.; WYLIE, C. Steel factor controls midline cell death of primordial germ cells and is essential for their normal proliferation and migration. **Development**, v. 133, n. 24, p. 4861-9, 2006.

SAITOU, M; PAYER, B.; O'CARROLL, D.; OHINATA, Y.; SURANI, M.A. Blimp1 and the Emergence of the Germ Line during Development in the mouse. **Cell Cycle**, v. 4, n. Dec. p. 1736-1740, 2005.

SAITOU, M.; BARTON, S. C.; SURANI, M. A. A molecular programme for the specification of germ cell fate in mice. **Nature**, v. 418, n. July, p. 293-300, 2002.

SANTOS, A. C.; LEHMANN, R. Germ cell specification and migration in Drosophila and beyond. **Current biology :** CB, v. 14, n. 14, p. R578-89, 27 July 2004.

S Sasaki, K.; Yokobayashi, S.; Nakamura, T.; Okamoto, I.; Yabuta, Y.; Kurimoto, K.; Ohta, H.; Moritoki, Y. ; Iwatani, C.; Tsuchiya, H.; Nakamura, S.; Sekiguchi, K.; Sakuma, T.; Yamamoto, T.; Mori, T.; Woltjen, K.; Nakagawa, M.; Yamamoto, T.; Takahashi, K.; Yamanaka, S.; Mitinori, S. Robust in vitro induction of human germ cell fate from pluripotent stem cells. **Cell stem cell**, v. 17, n. 2, p. 178-94, 2015.

SATO, M.; KIMURA, T.; KUROKAWA, K.; FUJITA, Y.; ABE, K.; MASUHARA, M.; YASUNAGA, T.; RYO, A.; YAMAMOTO, M.; NAKANO ,T. Identification of PGC7 , a new gene expressed specifically in preimplantation embryos and germ cells. **Mechanism of Development**, v. 113, p. 91-94, 2002.

SEHWON KOH, J. A. P. From “ES-like” cells to induced pluripotent stem cells: a historical

perspective in domestic animals. **Theriogenology**, v. 81, n. 1, p. 1-17, 2014.

SEKI, Y.; HAYASHI, K.; ITOH, K.; MIZUGAKI, M.; SAITOU, M.; MATSUI, Y. Extensive and orderly reprogramming of genome-wide chromatin modifications associated with specification and early development of germ cells in mice. **Developmental Biology**, v. 278, n. 2, p. 440-58, 15 fev. 2005.

SEKI, Y.; YAMAJI, M.; YABUTA, Y.; SANO, M.; SHIGETA, M.; MATSUI, Y.; SAGA, Y.; TACHIBANA, M.; SHINKAI, Y.; SAITOU, M. Cellular dynamics associated with the genome-wide epigenetic reprogramming in migrating primordial germ cells in mice. **Development**, v. 134, n. 14, p. 2627-38, 2007a.

SELIGMAN, J.; PAGE, D. C. The Dazh gene is expressed in male and female embryonic gonads before germ cell sex differentiation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 882, n. 245, p. 878-882, 1998.

SHAMBLOTT, M. J.; AXELMAN, J.; WANG, S.; BUGG, E. M.; LITTLEFIELD, J. W.; DONOVAN, P. J.; BLUMENTHAL, P. D.; HUGGINS, G. R.; GEARHART, J. D. Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, n. 23, p. 13726–31, 1998.

SHAMBLOTT, M. J.; AXELMAN, J.; LITTLEFIELD, J. W.; BLUMENTHAL, P. D.; HUGGINS, G. R.; CUI, Y.; CHENG, L.; GEARHART, J. D. Human embryonic germ cell derivatives express a broad range of developmentally distinct markers and proliferate extensively in vitro. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 1, p. 113-8, 2001.

SHIMADA, H.; NAKADA, A.; HASHIMOTO, Y.; SHIGENO, K.; SHIONOYA, Y.; NAKAMURA, T. Generation of canine induced pluripotent stem cells by retroviral transduction and chemical inhibitors. **Molecular reproduction and development**, v. 77, n. 1, p. 2, 2010.

SMITH, E. Y.; RESNICK, J. L. Genomic imprinting. methods in molecular biology. v. 925, p. 61-66, 2012.

STARZ-GAIANO, M.; CHO, N. K.; FORBES, A.; LEHMANN, R. Spatially restricted activity of a Drosophila lipid phosphatase guides migrating germ cells.**Development**, v. 991, p. 983-991, 2001.

STOOP, H., HONECKER, F.; COOLS, M.; DE KRIJGER, R.; BOKEMEYER, C.;

LOOIJENGA, L. H. Differentiation and development of human female germ cells during prenatal gonadogenesis : an immunohistochemical study. **Human Reproduction**, v. 20, n. 6, p. 1466-1476, 2005.

STURM RA, H. W. The POU domain is a bipartite DNA-binding structure. **Nature Letters**, v. 336, p. 601-4, 1988.

SURANI, M. A; DURCOVA-HILLS, G.; HAJKOVA, P.; HAYASHI, K.; TEE, W. W. Germ line, stem cells, and epigenetic reprogramming. **Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology**, v. 73, p. 9-15, 2008.

SURANI, M. A.; HAYASHI, K.; HAJKOVA, P. Genetic and epigenetic regulators of pluripotency. **Cell**, v. 128, n. 4, p. 747-62, 23 fev. 2007.

SWYGERT, S. G.; PETERSON, C. L. Chromatin dynamics: Interplay between remodeling enzymes and histone modifications. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1839, n. 8, p. 728-736, 2014.

TAHILIANI, M.; KOH, K. P.; SHEN, Y.; PASTOR, W. A.; BANDUKWALA, H.; BRUDNO, Y.; AGARWAL, S.; IYER, L.M.; LIU, D. R.; ARAVIND, L.; RAO, A. Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. **Science**, v. 324, n. 5929, p. 930-5, 2009.

TAMMEN, S. A.; FRISO, S.; CHOI, S. Molecular aspects of medicine epigenetics : the link between nature and nurture. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 34, n. 4, p. 753-764, 2013.

TANAKA, S. S.; TOYOOKA, Y.; AKASU, R.; KATOH-FUKUI, Y.; NAKAHARA, Y.; SUZUKI, R.; YOKOYAMA, M.; NOCE, T. The mouse homolog of Drosophila Vasa is required for the development of male germ cells. **Genes & development**, v. 14, n. 7, p. 841-53, 2000.

TANG, W. W. C.; DIETMANN, S.; IRIE, N.; LEITCH, H. G.; FLOROS, V. I.; BRADSHAW, C. R.; HACKETT, J. A.; CHINNERY, P. F.; SURANI, M. A. Unique gene regulatory network resets the human germline epigenome for development. **Cell**, v. 161, n. 6, p. 1453-1467, jun. 2015.

TANG, W. W. C.; KOBAYASHI, T.; IRIE, N.; DIETMANN, S.; SURANI, M.A. Specification and epigenetic programming of the human germ line. **Nature Publishing Group**, v. 17, n. 10, p. 585-600, 2016.

TARBASHEVICH, K.; RAZ, E. The nuts and bolts of germ-cell migration. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 22, n. 6, p. 715-21, 2010.

TEE, W.-W.; PARDO, M.; THEUNISSEN, T. W, YU, L.; CHOUDHARY, J. S.; HAJKOVA, P.; SURANI, M. A. Prmt5 is essential for early mouse development and acts in the cytoplasm to maintain ES cell pluripotency. **Genes & development**, v. 24, n. 24, p. 2772-7, 2010.

TILGNER, K.; ATKINSON, S. P.; GOLEBIEWSKA, A.; STOJKOVIC, M.; LAKO, M.; ARMSTRONG, L. Isolation of primordial germ cells from differentiating human embryonic stem cells. **Stem Cells** , v. 26, n. 12, p. 3075-85, 2008.

TOYOOKA, Y.; TSUNEKAWA, N.; TAKAHASHI, Y.; MATSUI, Y.; SATOH, M.; NOCE, T. Expression and intracellular localization of mouse Vasa-homologue protein during germ cell development. **Mechanisms of Development**, v. 93, n. 1/2, p. 139-49, 2000.

TURNPENNY, L.; BRICKWOOD, S.; SPALLUTO, C. M.; PIPER, K.; CAMERON, I. T.; WILSON, D. I.; HANLEY, N. A. Derivation of human embryonic germ cells: an alternative source of pluripotent stem cells. **Stem Cell Repor ts**, n. Mp 808, p. 598-609, 2003.

TURNPENNY, L.; SPALLUTO, C. M.; PERRETT, R. M.; O'SHEA, M.; HANLEY, K. P.; CAMERON, I. T.; WILSON, D. I.; HANLEY, N. A. Evaluating human embryonic germ cells: concord and conflict as pluripotent stem cells. **Stem cells**, v. 24, n. 2, p. 212-20, 2006a.

VAAGS, A. K.; VAAGS, A. K.; ROSIC-KABLAR, S.; GARTLEY, C. J.; ZHENG, Y. Z.; CHESNEY, A.; VILLAGÓMEZ, D. A.; KRUTH, S. A.; HOUGH, M.R. Derivation and characterization of canine embryonic stem cell lines with in vitro and in vivo differentiation potential. **Stem Cells**, v. 27, n. 2, p. 329-40, 2009.

VILLAR-GAREA, A.; IMHOF, A. The analysis of histone modifications. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1764, n. 12, p. 1932-9, 2006.

VINCENT, S. D.; DUNN, N.R.; SCIAMMAS, R.; SHAPIRO-SHALEF, M.; DAVIS, M. M.; CALAME, K.; BIKOFF, E. K.; ROBERTSON, E. J. The zinc finger transcriptional repressor Blimp1 / Prdm1 is dispensable for early axis formation but is required for specification of primordial germ cells in the mouse. **Development**, v.132 p. 1315-1325, 2005.

WESTERN, P.; MALDONADO-SALDIVIA, J.; VAN DEN BERGEN, J.; HAJKOVA, P.; SAITOU, M.; BARTON, S.; SURANI, M. A. Analysis of Esg1 expression in pluripotent cells and the germline reveals similarities with Oct4 and Sox2 and differences between human pluripotent cell lines. **Stem Cells**, v. 23, n. 10, p. 1436-1442, 2005.

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, n. 12, p. 2288-97, 2012.

XU, D.; BAI, J.; DUAN, Q.; COSTA, M.; DAI, W. Covalent modifications of histones during mitosis and meiosis. **Cell Cycle** , v. 8, n. 22, p. 3688-94, 2009.

ZHANG, X.; STOJKOVIC, P.; PRZYBORSKI, S.; COOKE, M.; ARMSTRONG, L.; LAKO, M. S. M..; AHMAD, S.; MURDOCH, A. Derivation of human embryonic stem cells from developing and arrested embryos. **Stem Cell**, v. 24, p. 2669-76, 2006.

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, n. 5, p. 705-16, 2006.

YAMAGUCHI, S.; KIMURA, H.; TADA, M.; NAKATSUJI N, TADA. T. Nanog expression in mouse germ cell development. **Gene Expression Patterns**, v. 5, p. 639-646, 2005.

YAMAGUCHI, S.; HONG, K.; LIU, R.; INOUE, A.; SHEN, L.; ZHANG, K.; ZHANG, Y. Dynamics of 5-methylcytosine and 5-hydroxymethylcytosine during germ cell reprogramming. **Cell Research**, v. 23, n. 3, p. 329-39, 2013.

YOON, C.; KAWAKAMI, K.; HOPKINS, N. Zebrafish vasa homologue RNA is localized to the cleavage planes of 2- and 4-cell-stage embryos and is expressed in the primordial germ cells. **Development ,** v. 124, n. 16, p. 3157-65, 1997.