



Células-tronco de pluripotência induzida: progressos em animais domésticos

Induced pluripotent stem cells: progress in domestic animals

A.R. Amaral, D. Coimbra, N. Gonçalves¹, C.E. Ambrósio

Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, FZEA, USP, Pirassununga, SP, Brasil.

¹Correspondente: natgcalvesusp@gmail.com

Resumo

A utilização de células-tronco pluripotentes apresenta uma oportunidade promissora para o tratamento de doenças degenerativas que, até o momento, não possuem cura. Contudo, a sua utilização encontra impasses relacionados à ética e à biossegurança. Takahashi e Yamanaka (2006) elaboraram uma alternativa que permite obter células-tronco pluripotentes a partir de células adultas por meio de indução com fatores de transcrição específicos (fatores Yamanaka). Tal feito é capaz de contornar os questionamentos relacionados à destruição de embriões e, também, torna possível a possibilidade de realizar transplantes autólogos, reduzindo os problemas relacionados à biossegurança. A obtenção dessas células também é estudada na medicina veterinária, com o intuito de validar diversos modelos experimentais domésticos e de produção e, além disso, tem a intenção de oferecer alternativas para a conservação de um banco genético de espécies ameaçadas de extinção. Contudo, existem muitas diferenças nos protocolos adotados e nos resultados obtidos entre as diferentes espécies, dificultando a eficácia dos estudos na área. Este trabalho apresenta uma revisão detalhada sobre o que foi efetivo ou não até o presente momento na obtenção de células-tronco pluripotentes induzidas (iPSC) em canídeos, equinos, ruminantes e suínos.

Palavras-chave: animais domésticos, células-tronco, fatores Yamanaka, iPSC, medicina veterinária.

Abstract

The use of pluripotent stem cells is a promising opportunity for the treatment of degenerative diseases that have no cure. The use of those is limited by ethics and biosafety arguments. Takahashi e Yamanaka (2006) developed an alternative that allows the obtainment of pluripotent stem cells from adult cells by induction with specific transcription factors (Yamanaka factors). Such discovery created a way to avoid the questions about embryo destruction also, created the possibility of autologous transplantation decreasing problems related to biosafety. The process for obtaining (iPSC) is also studied in Veterinary Medicine field in order to validate several experimental in domestic and production models. Above that, it is an alternative to create a genomic bank of endangered species. Nevertheless there are many differences on protocols and results obtained hindering the efficiency and effectiveness of the studies in this area. This work presents a detailed review about what was effective or not on the processes of obtaining iPSCs in canine, feline, equine, bovine and swine until this moment.

Keywords: domestic animals, iPSC, stem cells, Veterinary Medicine, Yamanaka factors.

Introdução

A utilização de células-tronco é considerada por muitos autores um avanço na terapia regenerativa, com o potencial de estas serem aplicadas em uma diversidade de doenças para as quais não há tratamento, além de poderem ser utilizadas para realizar testes farmacêuticos, sendo esta a melhor fonte de tecido humano (Schwindt et al., 2005; Ebrahimi, 2015).

Diante dessa situação, Takahashi e Yamanaka (2006) desenvolveram um método de reprogramação celular que permite induzir células diferenciadas (adultas) à desdiferenciação, recuperando, assim, a pluripotência desejada sem ser necessário o uso de células embrionárias.

Esta revisão reúne os procedimentos de indução de células pluripotentes realizados até o momento em animais domésticos (canídeos, equinos, ruminantes e suínos), apontando as semelhanças e as diferenças dos protocolos utilizados, bem como os resultados obtidos, a fim de auxiliar em futuras pesquisas.

Células de pluripotência induzida: perspectivas na medicina veterinária

Do ponto de vista da medicina regenerativa, as células-tronco embrionárias (toti e pluripotentes) representam uma grande oportunidade de realização de transplantes heterólogos e autólogos (VOLTARELLI, 2002).

Diante desse problema, em 2006, Takahashi e Yamanaka selecionaram quatro fatores de transcrição (fatores Yamanaka ou OKSM) responsáveis por promover a expressão de genes que conferem as características de pluripotência de uma célula: OCT4, KLF4, SOX-2 e c-MYC. A identificação desses fatores tornou possível a criação de uma alternativa promissora que permite a utilização de células-tronco sem que seja necessária a destruição de embriões.

Takahashi e Yamanaka (2006) submeteram fibroblastos murinos a um processo de reprogramação genética em que os fatores de transcrição externos (OCT4, KLF4, SOX-2 e c-MYC) foram introduzidos até que o maquinário interno assumisse o controle da pluripotência celular e as células somáticas fossem capazes de retornar ao seu estado de pluripotência (indiferenciação). Mais tarde, em 2007, esse mesmo processo foi realizado com sucesso utilizando-se fibroblastos humanos (Takahashi et al., 2007).

Desde então, diversos pesquisadores da área de medicina veterinária vêm reproduzindo em laboratório esses procedimentos com células adultas oriundas de diversos tecidos de variadas espécies animais, como cão (Shimada et al., 2010; Luo et al., 2011; Whitworth et al., 2012; Koh et al., 2013), suíno (Esteban et al., 2009; Ezashi et al., 2009; Wu et al., 2009), caprino (Ren et al., 2011), equino (Nagy et al., 2011; Breton et al., 2013), bovino (Han et al., 2011; Cao et al., 2012), coelho (Honda et al., 2010), ovino (Bao et al., 2011), bubalino (Deng et al., 2012), rato (Liao et al., 2009), felino (Verma et al., 2012), macaco-rhesus (Liu et al., 2008), sagui (Wu et al., 2010), macaco-dril (Ben-Nun et al., 2011) e rinoceronte-branco (Ben-Nun et al., 2011).

Atualmente, a terapia celular, em geral, encontra diversas aplicabilidades no campo de atuação de médicos veterinários, funcionando como alternativa viável para o tratamento de doenças degenerativas, principalmente nos pequenos animais, como diabetes melíttus (Will et al., 2012), doença renal (Quimby et al., 2011) e enteropatias crônicas em gatos (Webb e Webb, 2015).

Um enfoque que vem ganhando força na medicina e, mais recentemente, na veterinária é a correção de doenças genéticas por meio de técnicas da edição gênica CRISPR-Cas9 (McGreevy et al., 2015), com o uso de iPSCs. Li et al. (2015) corrigiram a distrofia muscular de Duchenne com CRISPR-CAs9, que tem sido modelo para estudos em Golden Retriever (GRMD). As iPSCs caninas também foram usadas para diferenciação em plaquetas, corrigindo a trombocitopenia, que acomete seres humanos e espécies domésticas, como os cães (Nishimura et al., 2013). O processo de reprogramação nuclear é extremamente desejável e possui importantes contribuições tanto no estudo da ciência básica como da ciência aplicada, por exemplo, no aumento da eficiência das biotécnicas de produção animal, ou ainda na medicina, com a possibilidade de terapia celular autóloga para o tratamento de inúmeras enfermidades.

A utilização das iPSCs em espécies exóticas ou em risco de extinção teria uma grande aplicabilidade nos procedimentos que visam à preservação da biodiversidade animal, como no caso dos estudos realizados por Verma et al. (2012) com o leopardo-das-neves (*Panthera uncia*), e por Ben-Nun et al. (2011), com o macaco-dril (*Mandrillus leucophaeus*) e o rinoceronte-branco (*Ceratotherium simum cottoni*).

Adaptações nos protocolos e diferentes resultados foram encontrados ao longo dos anos, como pode ser observado na Tab. 1.

Tabela 1. Relação de resultados dos procedimentos de indução de pluripotência realizados em cinco espécies domésticas (*Canis lupus familiaris*, *Equus caballus*, *Bos taurus*, *Sus domesticus*) para obtenção de células-tronco pluripotentes induzidas, estando listados: vetores utilizados, fatores utilizados para indução de pluripotência, suplementação e inibidores utilizados no meio de cultivo, expressão de fosfatase alcalina (FA), formação de corpo embriode (CE), capacidade de diferenciação espontânea (Di) e formação tumoral (form. tumoral).

Autor, Ano	Espécie	Vetor	Fatores	Supl./Inib	FA	CE	Di.	Form. tumoral
Shimada et al., 2010	<i>Canis lupus familiaris</i>	Retrovírus	OKSM	bFGF, hLIF, PD0325901, CHIR99021	+	-	+	-
Luo et al., 2011	<i>Canis lupus familiaris</i>	Lentivírus	OKSM	hLIF e bFGF	-	+	+	-
Whitworth et al., 2012	<i>Canis lupus familiaris</i>	Lentivírus	OKSM, LIN28, NANOG	bFGF, mLIF, PD0325901, CHIR99021, TGF-β	+	+	+	+
Koh et al., 2013	<i>Canis lupus familiaris</i>	Retrovírus	OKSM	FGF2, hLIF, PD0325901, CHIR99021	+	+	+	+
Nagy et al., 2011	<i>Equus caballus</i>	Transposon	OKSM	LIF, bFGF, PD0325901, CHIR99021, TGF-β	+	+	+	+
Breton et al., 2013	<i>Equus caballus</i>	Retrovírus	OKSM	hLIF, bFGF	+	+	+	+
Verma et al., 2012	<i>Panthera uncia</i>	Retrovírus	OKSM, NANOG	mLIF	+	+	+	+
Sumer et al., 2011	<i>Bos taurus</i>	Retrovírus	OKSM, NANOG	bFGF	+	+	+	+
Cao et al., 2012	<i>Bos taurus</i>	Lentivírus	OKSM	mLIF, bFGF	+	+	+	+
Talluri et al., 2015	<i>Bos taurus</i>	Transposon	OKSM, NANOG, LIN28	bFGF, hLIF	+	-	+	+
Esteban et al., 2009	<i>Sus domesticus</i>	Retrovírus	OKSM	bFGF, mLIF	+	-	+	+
Wu et al., 2009	<i>Sus domesticus</i>	Lentivírus	OKSM, NANOG, Lin28	bFGF	+	+	+	+
Ezashi et al., 2009	<i>Sus domesticus</i>	Lentivírus	OKSM	bFGF	+	+	+	+

Canídeos

De acordo com Whitworth et al. (2012), os cães são o modelo experimental que apresenta maior relevância clínica para o estudo de doenças hereditárias no homem e, portanto, a obtenção de células-tronco desses seria de grande aplicabilidade nas terapias relacionadas à medicina regenerativa.

Shimada et al. (2010) foram os pioneiros a obterem iPSCs de fibroblasto fetal de cães da raça Beagle, com a introdução dos fatores Yamanaka via retrovírus. Em um primeiro momento, os autores suplementaram o cultivo com fator de crescimento fibroblástico básico (bFGF) e fator inibidor de leucemia humano (hLIF), mas não obtiveram sucesso, e concluíram que somente estes fatores eram insuficientes para manter as colônias. Em seguida, desenvolveram, então, um novo procedimento, no qual foram adicionados: inibidor de proteínas quinases ativadas por mitógenos (MEK), inibidores de glicogênio sintase quinase 3 beta (GSK3 β) e antagonista de fator de transformação do crescimento (TGF- β). Com o emprego deste novo protocolo, foi possível obter colônias após uma semana, e, depois de aproximadamente 20 dias, elas apresentaram morfologia similar às células-tronco caninas previamente caracterizadas por Hayes et al., em 2008. As colônias foram capazes de se diferenciarem nos três folhetos embrionários.

Ao contrário dos autores supracitados, Luo et al. (2011) geraram iPSCs de fibroblastos oriundos de testículo de filhotes da raça Braco Alemão de pelo curto apenas com a inclusão de hLIF e bFGF. Nesse trabalho, os autores mencionam que, ao retirarem um dos inibidores (LIF ou bFGF), ocorria perda dos marcadores celulares de pluripotência e apoptose (severa, caso fosse retirado, em especial, LIF), o que ressalta a importância da utilização da associação de ambos os inibidores, diferindo do que ocorre com iPSCs de seres humanos e ratos. Com relação à formação tumoral, após diversos esforços, os autores não obtiveram sucesso e argumentam que o modelo animal (rato imunodeficiente) no qual foram injetadas as células não seria adequado para serem inoculadas as iPSCs de cães e gatos.

Após Whitworth et al. (2012) inocularem as células obtidas em oito camundongos, somente dois deles manifestaram a ocorrência de formações tumorais características. As observações foram realizadas ao longo de 16 semanas. Diferentemente dos estudos citados anteriormente, apesar de inocularem diversos suplementos no meio de cultivo das células, os autores notaram que, a partir da 40ª passagem, as colônias cultivadas apenas com LIF murino mantiveram sua pluripotência e habilidade de autorrenovação. Quando eram cultivadas com mLIF e bFGF concomitantemente, elas diferenciaram-se em células semelhantes a fibroblastos ou entravam em processo de apoptose. Quando cultivadas apenas com bFGF ou na ausência de mLIF e bFGF concomitantemente, as colônias se diferenciavam apenas em células semelhantes a fibroblastos.

Koh et al. (2013) também obtiveram sucesso ao induzirem a formação de células pluripotentes provenientes da pele da região abdominal de cães adultos da raça Beagle. Essas células, entretanto, foram cultivadas em três meios de cultura diferentes, que variavam com a inclusão ou não de fator de crescimento fibroblástico 2 (FGF2) e hLIF. Em uma delas, foram adicionados ambos os fatores; em outra, somente foi adicionado FGF2, e na última, somente hLIF. O protocolo realizado também foi efetivo para cultivar as células, de modo que fossem positivas para os principais testes comprobatórios de pluripotência, devendo-se chamar atenção para alguns fatos: foi possível observar a formação de tumor após a aplicação de todas as iPSCs em camundongos, embora as células inoculadas na quarta passagem apresentassem maior tempo de latência, enquanto as que foram inoculadas na terceira passagem apresentaram menor tempo para formação tumoral; o menor tempo de latência, entretanto, refere-se àquelas cultivadas com hLIF e FGF2 concomitantemente na terceira passagem. Além disso, observaram que, para todas as linhagens celulares, aquelas cultivadas simultaneamente com os marcadores acima mencionados apresentaram coloração mais forte para o teste da fosfatase alcalina. Por fim, aquelas que foram cultivadas na ausência de um destes inibidores apresentaram perdas de alguns marcadores de pluripotência após análises de PCR. Este trabalho, portanto, corrobora com Luo et al. (2011) e conclui que é necessário o uso de FGF2 e hLIF, MAP2K1 e GSK3 para manter a pluripotência celular após a indução inicial e ainda relata a ocorrência de aberrações cromossômicas presentes nas células induzidas.

No Brasil, alguns trabalhos visam ao estabelecimento de linhagens em espécies domésticas. As iPSCs de cão, importantes para o estabelecimento do modelo animal de estudo, estão sendo estudadas por Gonçalves et al. (2012), e sua geração ainda está sendo usada para a correção de doenças com a distrofia muscular de Duchenne, com o uso de técnicas de edição gênica (Gonçalves e Ambrósio, 2016).

Equinos

Os estudos realizados em equinos têm grande importância no âmbito das pesquisas de medicina regenerativa relacionadas às afecções ósseas (fraturas), às rupturas de ligamentos, tendões e às injúrias musculares. Ambos os ensaios elencados nesta revisão obtiveram sucesso ao gerarem células-tronco pluripotentes induzidas, e, além disso, Nagy et al. (2011) utilizaram um método diferente dos anteriormente realizados em humanos ou animais para introdução dos fatores de pluripotência: a inserção de um plasmídeo contendo os fatores OKSM. Esta técnica foi empregada em fibroblastos de fetos equinos com, aproximadamente, 55 dias de gestação, provenientes de abatedouro, e as colônias obtidas expressaram os principais marcadores de

pluripotência celular. Além disso, essas colônias não apresentaram alterações de cariótipo, mesmo após um longo prazo de cultivo, o que pode estar relacionado à produção de colônias sem integração viral.

Dois anos após este estudo, Breton et al. (2013) também obtiveram sucesso ao induzirem pluripotência celular de fibroblastos provenientes da pele de equino. O experimento foi realizado com fibroblastos de potro e de um animal adulto com dois anos de idade. As células obtidas, ao serem inoculadas em camundongos imunossuprimidos, formaram teratomas em um período de cinco a oito semanas.

Ruminantes

O primeiro grupo a obter iPSC de bovinos foi publicado por Sumer et al., em 2011. Neste, os autores relatam que só obtiveram sucesso após a adição de NANOG. Os bovinos são de extrema importância, com valor comercial significativo, além de serem um modelo de grande porte atrativo para as pesquisas biomédicas e biotecnológicas. As iPSC bovinas podem redefinir a habilidade em desenvolver gado transgênico, para a produção de proteínas terapêuticas em seu leite, para introduzir resistência a doenças como a mastite e para introduzir material genético para desenvolver modelos animais para a pesquisa.

Cao et al. (2012) utilizaram um lentivírus para a transdução dos fatores OKSM com sucesso na obtenção das iPSC bovinas de fibroblastos fetais. Em 2015, Talluri et al. –sucedidos ao utilizarem um método não viral para a derivação de células iPSC bovinas, empregando sistemas de transposons Sleeping Beauty (SB) e piggyBac (PB) codificando diferentes combinações de fatores de reprogramação.

Recentemente, dois grupos produziram iPSCs de caprinos (Sandmaier et al., 2015; Tai et al., 2015), sendo o primeiro com a combinação OSKM e o segundo com os mesmos fatores somados de LIN-28 e Nanog; todas foram positivas para os testes *in vitro* e para a formação de teratoma *in vivo*. Já no caso dos ovinos, Shi et al. (2015) lançaram mão de duas tecnologias, o uso dos fatores Yamanaka + Nanog + Lin28 + SV40LT + hTERT somado a RNAs de interferência (RNAi) com suplementação por ácido valproico e vitamina C, mostrando que tal combinação aumentou a eficiência de obtenção de iPSCs. As linhagens foram positivas para os testes de caracterização *in vitro* e *in vivo* e representam um avanço para pequenos ruminantes.

Suínos

Os pioneiros no desenvolvimento de iPSCs de suínos foram Esteban et al. (2009), Ezashi et al. (2009) e Wu et al. (2009). Esteban et al. (2009) obtiveram com sucesso iPSCs de células de fibroblasto de porco miniatura tibetano. A escolha desse animal foi devido ao seu tamanho reduzido e consequente facilidade de manutenção e de experimentação.

Os suínos como modelo de estudo são de extrema relevância por sua semelhança ou homologia com doenças em humanos. O tamanho dos principais órgãos das duas espécies é equivalente. O suíno é a espécie mais promissora para xenotransplantes, que é o transplante de órgãos entre espécies, além de representar importante modelo para o estudo de certas doenças humanas e avaliar a aplicação das iPSCs em um modelo animal.

Baseando-se nesses aspectos citados, Ying et al. (2014) obtiveram iPSCs de fibroblastos provenientes da orelha de suínos para, posteriormente, submetê-las à diferenciação em hepatócitos, fornecendo, assim, uma alternativa aos transplantes de fígado para aqueles que esperam pela doação do órgão. As células foram obtidas mediante reprogramação genética, por meio de infecção lentiviral dos fatores de Yamanaka (OKSM) humanos, e cultivadas com bFGF e mLIF (fator inibidor de leucemia murino). As primeiras colônias surgiram após três semanas de infecção viral.

Todos os autores acima relatados utilizaram, de maneira efetiva, os fatores OKSM para a reprogramação celular. Apenas Montserrat et al. (2012) relataram, pela primeira vez, a obtenção de iPSCs derivadas de fibroblastos retirados da orelha de suínos, sem a utilização do fator Oct-4. Além disso, comentam que, além de este fator ter sido completamente dispensável, a sua expressão afetou negativamente o potencial de reprogramação e sugerem, em razão de diversos fatores, um papel diferenciado e menos importante deste fator no desenvolvimento dessa espécie.

Conclusão

É possível concluir que a utilização de iPSC é uma alternativa promissora para o tratamento de doenças que, até o momento, não possuem cura e para as terapias em medicina regenerativa tanto para humanos quanto para animais domésticos, sendo ainda uma ótima alternativa para manejar problemas relativos à conservação de espécies em perigo de extinção.

Além disso, os animais domésticos podem ser utilizados como ótimos modelos experimentais, tornando possível o estudo e o tratamento de doenças incuráveis que acometem os seres humanos.

Observa-se, com este levantamento bibliográfico, que a indução da pluripotência deve ser encarada como um procedimento único a cada espécie, que requer diferentes protocolos e suplementações para o sucesso



da reprogramação.

O conhecimento da biologia de cada espécie torna-se essencial para o sucesso da obtenção de colônias completamente reprogramadas, ao lançar mão de diferentes estratégias e, assim, encontrar a que melhor se adapte a cada espécie doméstica, produzindo linhagens cada vez mais próximas do perfil molecular e epigenético de células-tronco pluripotentes verdadeiras.

Agradecimentos

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pelo apoio financeiro (Processo Fapesp 2013/09302-9 e 2015/09575-1).

Referências

- Bao L, He L, Chen J, Wu Z, Liao J, Rao L, Ren J, Li H, Zhu H, Qian L, Gu Y, Dai H, Xu X, Zhou J, Wang W, Cui C, Xiao L.** Reprogramming of ovine adult fibroblasts to pluripotency via drug-inducible expression of defined factors. *Cell Res*, v.21, p.600-608, 2011.
- Ben-Nun IF, Montague SC, Houck ML, Tran HT, Garitaonandia I, Leonardo TR, Wang Y, Charter SJ, Laurent LC, Ryder OA, Loring JF.** Induced pluripotent stem cells from highly endangered species. *Nature Methods* v.8, 829-831, 2011.
- Breton A, Sharma R, Diaz AC, Parham AG, Graham A, Neil C, Whitelaw CB, Milne E, Donadeu FX.** Derivation and characterization of induced pluripotent stem cells from equine fibroblasts. *Stem Cells Dev*, v.22, p.611-621, 2013.
- Cao H, Yang P, Pu Y, Sun X, Yin H, Zhang Y, Zhang Y, Li Y, Liu Y, Fang F, Zhang Z, Tao Y, Zhang X.** Characterization of bovine induced pluripotent stem cells by lentiviral transduction of reprogramming factor fusion proteins. *Int J Biol Sci*, v.8, p.498-511, 2012.
- Deng Y, Liu Q, Luo C, Chen S, Li X, Wang C, Liu Z, Lei X, Zhang H, Sun H, Lu F, Jiang J, Shi D.** Generation of Induced Pluripotent Stem Cell Lines induced pluripotent stem cells from buffalo (*Bubalus bubalis*) fetal fibroblasts with buffalo defined factors. *Stem Cells Dev*, v.21, p.2485-2494, 2012.
- Ebrahimi B.** Reprogramming barriers and enhancers: strategies to enhance the efficiency and kinetics of induced pluripotency. *Cell Regen (Lond)*, v.11, p.1-12, 2015.
- Esteban MA, Xu J, Yang J, Peng M, Qin D, Li W, Jiang Z, Chen J, Deng K, Zhong M, Cai J, Lai L, Pei D.** Generation of induced pluripotent stem cell lines from Tibetan miniature pig. *J Biol Chem*, v.284, p.17634-17640, 2009.
- Ezashi T, Telugu BP, Alexenko AP, Sachdev S, Sinha S, Roberts RM.** Derivation of induced pluripotent stem cells from pig somatic cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, v.106, p.10993-10998, 2009.
- Gonçalves NJN, Ambrósio CE.** Uma ferramenta para editar o DNA. *Rev FAPESP*, v.140, p.38-42, 2016.
- Gonçalves NJN, Bressan FF, Souza A, Martins DS, Miglino, MA, Meirelles FV, Perecin F, Ambrosio CE.** Canine fibroblasts expressing human transcription factors: what is in the route for the production of canine induced pluripotent stem cells. *Reprod Domest Anim*, v.47, p.84-87, 2012.
- Han X, Han J, Ding F, Cao S, Lim SS, Dai Y, Zhang R, Zhang Y, Lim, B, Li N.** Generation of induced pluripotent stem cells from bovine embryonic fibroblast cells. *Cell Res*, v.21, p.1509-1512, 2011.
- Hayes B, Fagerlie SR, Ramakrishnan A, Baran S, Harkey M, Graf L, Bar M, Bendoraite A, Tewari M, Torok-Storb B.** Derivation, characterization, and in vitro differentiation of canine embryonic stem cells. *Stem Cells*, v.26, p.465-473, 2008.
- Honda A, Hirose M, Hatori M, Matoba S, Miyoshi H, Inoue K, Ogura A.** Generation of induced pluripotent stem cells in rabbits: potential experimental models for human regenerative medicine. *J Biol Chem*, v.285, p.31362-31369, 2010.
- Koh S, Thomas R, Tsai S, Bischoff S, Lim JH, Breen M, Olby NJ, Piedrahita JA.** Growth requirements and chromosomal instability of induced pluripotent stem cells generated from adult canine fibroblasts. *Stem Cells Dev*, v.22, p.951-963, 2013.
- Li HL, Fujimoto N, Sasakawa N, Shirai S, Ohkame T, Sakuma T, Tanaka M, Amano N, Watanabe A, Sakurai H, Yamamoto T, Yamanaka S, Hotta A.** Precise correction of the dystrophin gene in duchenne muscular dystrophy patient induced pluripotent stem cells by TALEN and CRISPR-Cas9. *Stem Cell Rep*, v.4, p.143-154, 2015.
- Liao J, Cui C, Chen S, Ren J, Chen J, Gao Y, Li H, Jia N, Cheng L, Xiao H, Xiao, L.** Generation of induced pluripotent stem cell lines from adult rat cells. *Stem Cell*, v.4, p.11-15, 2009.
- Liu H, Zhu F, Yong J, Zhang P, Hou P, Li H, Jiang W, Cai J, Liu M, Cui K, Qu X, Xiang T, Lu D, Chi X, Gao G, Ji W, Ding M, Deng H.** Generation of induced pluripotent stem cells from adult rhesus monkey fibroblasts. *Stem Cell*, v.3, p.587-590, 2008.
- Luo J, Suhr ST, Chang EA, Wang K, Ross PJ, Nelson LL, Venta PJ, Knott JG, Cibelli JB.** Generation of leukemia inhibitory factor and basic fibroblast growth factor-dependent induced pluripotent stem cells from



- canine adult somatic cells. *Stem Cells Dev*, v.20, p.1669-1678, 2011.
- McGreevy JW, Hakim CH, McIntosh MA, Duan D.** Animal models of duchenne muscular dystrophy: from basic mechanisms to gene therapy. *Dis Model Mech*, v.8, p.195-213, 2015.
- Montserrat N, Oñate L, Garreta E, González F, Adamo A, Eguizábal C, Hafner S, Vassena R, Belmonte JCI.** Generation of feeder-free pig induced pluripotent stem cells without Pou5f1. *Cell Transplant*, v.21, p.815-825, 2012.
- Nagy K, Sung HK, Zhang P, Laflamme S, Vincent P, Agha-Mohammadi S, Woltjen K, Monetti C, Michael IP, Smith LC, Nagy A.** Induced pluripotent stem cell lines derived from equine fibroblasts. *Stem Cell Rev Rep*, v.7, p.693-702, 2011.
- Nishimura T, Hatoya S, Kanegi R, Sugiura K, Wijewardana V, Kuwamura M, Tanaka M, Yamate J, Izawa T, Takahashi M, Kawate N, Tamada H, Imai H, Inaba T.** Generation of functional platelets from canine induced pluripotent stem cells. *Stem Cells Dev*, v.22, p.2026-2035, 2013.
- Quimby JM, Webb TL, Gibbons DS, Dow SW.** Evaluation of intrarenal mesenchymal stem cell injection for treatment of chronic kidney disease in cats: a pilot study. *J Feline Med Surg*, v.113, p.418-426, 2011.
- Ren J, Pak Y, He L, Qian L, Gu Y, Li H, Rao L, Liao J, Cui C, Xu X, Zhou J, Ri H, Xiao L.** Generation of hircine-induced pluripotent stem cells by somatic cell reprogramming. *Cell Res*, v.21, p.849-853, 2011.
- Sandmaier SE, Nandal A, Powell A, Garret W, Blomberg L, Donovan DM, Talbot N, Telugu BP.** Generation of induced pluripotent stem cell from domestic goats. *Mol Reprod Dev*, v.82, p.709-21, 2015.
- Schwindt TT, Barnabé GF, Mello LEAM.** Proliferar ou diferenciar? Perspectivas de destino das células-tronco. *J Bras Neurocirurg*, v.16, p.13-19, 2005.
- Shi H, Fu Q, Li G, Ren Y, Ni W, Guo F, Shi M, Meng L, Zhang H, Qiao J, Guo Z, Chen C.** Roles of p53 and ASF1A in the reprogramming of sheep kidney cells to pluripotent cells. *Cell Reprogram*, v.17, p.441-452, 2015.
- Shimada H, Nakada A, Hashimoto Y.** Generation of canine induced pluripotent stem cells by retroviral transduction and chemical inhibitors. *Mol Reprod Dev*, v.77, p.2, 2010.
- Sumer H, Liu J, Malaver-Ortega LF, Lim ML, Khodadadi K, Verma PJ.** NANOG is a key factor for induction of pluripotency in bovine adult fibroblasts. *J Anim Sci*, v.89, p.2708-2716, 2011.
- Tai D, Liu P, Gao J, Jin M, Xu T, Zuo Y, Liang H, Liu D.** Generation of Arbas Cashmere goat induced pluripotent stem cells through fibroblast reprogramming. *Cell Reprogram*, v.17, p.297-305, 2015.
- Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S.** Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*, v.131, p.1-12, 2007.
- Takahashi K, Yamanaka S.** Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, v.126, p.663-676, 2006.
- Talluri TR, Kumar D, Glage S, Garrels W, Ivics Z, Debowski K, Behr R, Niemann H, Kues WA.** Derivation and characterization of bovine induced pluripotent stem cells by transposon-mediated reprogramming. *Cell Reprogram*, v.17 p.131-140, 2015.
- Verma R, Holland MK, Temple-Smith P, Verma PJ.** Inducing pluripotency in somatic cells from the snow leopard (*Panthera uncia*), an endangered felid. *Theriogenology*, v.77, p.220-228, 2012.
- Voltarelli JC.** Transplante de células-tronco hematopoéticas para doenças auto-imunes no Brasil. *Rev Bras Hematol Hemoter*, v.24, p.9-13, 2002.
- Webb TL, Webb CB.** Stem Cell therapy in cats with chronic enteropathy: a proof-of-concept study. *J Feline Med Surg*, v.17, p.901-908, 2015.
- Whitworth DJ, Ovchinnikov DA, Wolvetang EJ.** Generation and characterization of LIF-dependent canine induced pluripotent stem cells from adult dermal fibroblasts. *Stem Cells Dev*, v.23, p.1515-23, 2012.
- Will SEAL, Morini Júnior JC, Alcântara D, Fratini P, Favaron F, Miglino MA, Assis Neto AC.** Stem cell therapy to restore pancreatic function in dogs and cats. *Braz J Vet Pathol*, v.5, p.99-105, 2012.
- Wu Y, Zhahang Y, Mishra A, Tardif SD, Hornsby PJ.** Generation of induced pluripotent stem cells from newborn marmoset skin fibroblasts. *Stem Cell Res*, v.4, p.180-188, 2010.
- Wu Z, Chen J, Ren J, Bao L, Liao J, Cui C, Rao L, Li H, Gu Y, Dai H, Zhu H, Teng X, Cheng L, Xiao L.** Generation of pig induced pluripotent stem cells with a drug-inducible system. *J Mol Cell Biol*, v.1, p.46-54, 2009.
- Ying A, Mich-Basso JD, Lin B, Yang L.** High efficient differentiation of functional hepatocytes from porcine induced pluripotent stem cells. *Plos One*, doi: 10.1371/journal.pone.0100417, 2014.
-