

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

CULTIVO E CARACTERIZAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO OBTIDAS
DE BLASTOCISTOS EQUINOS FRESCOS E REFRIGERADOS

BIANCA ANDRIOLO MONTEIRO

Botucatu-SP

2013

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

CULTIVO E CARACTERIZAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO OBTIDAS
DE BLASTOCISTOS EQUINOS FRESCOS E REFRIGERADOS

BIANCA ANDRIOLO MONTEIRO

Dissertação apresentada junto ao Programa
de Pós-Graduação em Medicina Veterinária
para obtenção do Título de Mestre.

Orientador(a): Fernanda da Cruz Landim

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE - CRB 8/5651

Monteiro, Bianca Andriolo.

Cultivo e caracterização de células-tronco obtidas de blastocistos equinos frescos e refrigerados / Bianca Andriolo Monteiro. - Botucatu, 2013

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: Fernanda da Cruz Landim

Capes: 50504002

1. Equino - Embrião. 2. Blastocisto. 3. Células-tronco embrionárias - Pesquisa. 4. Células - Cultura e meios de cultura.

Palavras-chave: Blastocistos; Células-tronco; Equino; Frescos; Refrigerados.

Nome do Autor(a): Bianca Andriolo Monteiro

Título: CULTIVO E CARACTERIZAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO OBTIDAS DE
BLASTOCISTOS EQUINOS FRESCOS E REFRIGERADOS

COMISSÃO EXAMINADORA

Pro^a Dr^a Fernanda da Cruz Landim
Presidente e Orientadora
Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária
FMVZ-UNESP- Botucatu

Prof^o Dr. Ian Martin
Membro
Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária
FMVZ-UNESP- Botucatu

Prof^a Dr^a Cássia Maria Barroso Orlandi
Membro
Departamento de Reprodução Animal
FMVA-UNESP- Araçatuba

Data da Defesa: 29 de Julho de 2013

DEDICATÓRIA

À Deus e aos meus Orixás por me darem forças para chegar até aqui.

Aos meus pais, Wagner Pinheiro Monteiro e Teresa Cristina Andriolo Monteiro, pelo amor incondicional, pela vida e pela dedicação irrestrita para a realização deste sonho!

À minha irmã Olívia Andriolo Monteiro que, apesar de longe, sempre esteve ao meu lado em todos os momentos, tornando a minha vida mais feliz e completa!

AGRADECIMENTOS

Ao meu pai Wagner Pinheiro Monteiro pelas noites de plantão, pelo exemplo, por tornarmos juntos este sonho realidade!

À minha mãe Teresa Cristina Andriolo Monteiro pelo amor, pela força e por ser a guerreira que luta todos os dias para manter a nossa família unida e por manter nossos corações cheios de amor!

À minha irmã Olívia Andriolo Monteiro, pelo amor, pela cumplicidade e pela união! Obrigada por ser a minha metade!

Ao meu cunhado Thiago Santos Thurler pelo exemplo de superação e amor à vida! Aos meus pais de Santo, Mário Thurler e Marilda Santos Thurler por me ensinarem a ser uma pessoa melhor e por ajudarem na minha evolução!

À FMVZ- UNESP de Botucatu pelo aprendizado e realização do trabalho.

À CNPQ pela bolsa de estudo.

À Fapesp pelo auxílio concedido.

À minha orientadora Fernanda da Cruz Landim pelos ensinamentos, pela oportunidade da realização do Mestrado e por acreditar no meu trabalho, mesmo nos momentos difíceis. Obrigada pelo apoio, pela amizade e pelos ensinamentos durante esses anos!

Ao professor Rogério Martins Amorim por disponibilizar os animais para a realização deste trabalho, e pelos ensinamentos ao longo do curso.

Aos professores Frederico Ozanam Papa e Nereu Carlos Prestes pela ajuda com os animais e pelo carinho durante toda a minha trajetória, e à todos os professores do Departamento que contribuíram para a minha formação.

Aos funcionários do Departamento José Luís, Edivaldo, Cristina, Dona Raquel, Valter e Edilson pela ajuda e dedicação que têm com os alunos. E ao funcionário da Clínica de Grandes Animais, Marquinhos pelo carinho e cuidado com os animais!

Aos amigos e também pelos colaboradores deste trabalho, Ian Martin e Midyan Daroz Guastali, por todas as dificuldades vividas, pelo ajuda durante todos os momentos e pela amizade e carinho que sempre tiveram comigo. Devo este trabalho também a vocês.

Ao doutorando Carlos Renato Guaitolini, pela ajuda com a congelação dos embriões e pela convivência ao longo do Mestrado.

À toda a equipe do Lança, Bruna de Vita, Daniela Jaqueta Barberini, Isadora Arruda, Amanda Jerônimo Listoni, Daniela Martins Paschoal, Mateus José Sudando, Luiz Ornelas, Marta Heckler, Camila Chavier Macedo, Letícia Crocomo, Tatiana da Silva Rascado, Leandro Maia pela convivência no laboratório e pela ajuda durante a realização deste trabalho!

Aos pós-graduandos e amigos queridos que me ajudaram com os animais e com o cultivo: Ieda Dalla Pria Blanco, Loreta Lemes Campos, Natália Pereira Paiva Freitas, Bruna de Vita, Yamê Fabres Robaina Sancler da Silva, Isabelle Rayane Oliveira, Carlos Ramires Neto, Gabriel Augusto Monteiro, Rosiara Rosaria Diaz Maziero e Milena Coppola. Obrigada pela amizade e por tornarem a minha vida mais feliz durante este período do Mestrado!

Aos amigos queridos Stephane Vexenat, Fernanda Saules Ignácio, Elisa Sant'ana da Silva, Sabrina Sakashita, Talita Ribas, Thatiane Kievitsbosch, Luana Bicudo, Hélène Resende, Priscilla Nascimento Guasti, Ana Augusta Pagnano Derussi, Ana Paula Bertoni, Felipe Hartwig, Fernando Paixão Lisboa e Camila Fumes.

À todos os residentes que me ajudaram durante toda a realização do Mestrado.

Aos meus padrinhos Ana Maria Andriolo Dunley e Márcio Dunley pelo amor e carinho, e à toda família Andriolo, aos primos, primas, tios e tias pela constante preocupação e pelo carinho durante todo este tempo.

Aos meus amigos queridos Eliana da Silva Gulão, Diego da Silva, Silvana Gomes Araújo, Adônis Moreira, Luiza Barcelos, Thaís Dias da Rocha, Fernanda Erthal, Terezinha Dantas, Alan Marqui, Luzia Raposa, por fazerem parte da minha vida por tantos anos e a todos os meus irmãos que sempre torceram pelo meu sucesso!

E principalmente às minhas éguas, pois sem ela este trabalho não teria se realizado! Com elas aprendi a ter mais paciência, mais respeito e amor incondicional à minha profissão!

À todos que direta e indiretamente colaboraram com a realização deste trabalho!

O Sonho

“Sonhe com aquilo que você quer
porque você possui apenas uma vida
e nela só se tem uma chance
de fazer aquilo que quer

Tenha felicidade bastante para fazê-la doce.
Dificuldades para fazê-la forte.
Tristezas para fazê-la humana.
E esperança suficiente para fazê-la feliz.

As pessoas mais felizes não tem as melhores coisas.
Elas sabem fazer o melhor das oportunidades
que aparecem em seus caminhos.

A felicidade aparece para aqueles que choram
Para aqueles que se machucam.
Para aqueles que buscam e tentam sempre
E para aqueles que reconhecem
a importância das pessoas que passaram por sua
vida.”

Clarice Lispector

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 01 Comportamento das MCI plaqueadas sobre as monocamadas de fibroblastos inativados após 5 dias de cultivo <i>in vitro</i>	25
Tabela 02 Comportamento das MCI plaqueadas sobre as monocamadas de fibroblastos inativados após 5 dias de cultivo <i>in vitro</i>	27
Tabela 03 Resultados do desenvolvimento do cultivo da MCI nos diferentes grupos, avaliados segundo: adesão, cultivo primário e repiques celular.....	29

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1	Página
Figura 01 Blastocistos equinos em diferentes fases de desenvolvimento. Setas indicando a MCI dos embriões. A- Blastocisto inicial (Aumento de 10X). B- Blastocisto expandido com 8 dias (Aumento de 40X). C- Blastocisto expandido com 7 dias (Aumento de 20X).....	19
Figura 02 Preparo da monocamada de fibroblastos equinos. A- <i>Slicing</i> dos fibroblastos com auxílio de duas lâminas de bisturi, em estereomicroscópio. B- Fragmentos de pele obtidos após <i>slicing</i> . C- Fragmentos na garrafa de cultivo.....	21
Figura 03 Fragmentos de tecido epitelial de equino. A- <i>Explants</i> utilizados para preparo da monocamada. B- Monocamada de fibroblastos equinos confluentes e bloqueados com Mitomicina C após cultivo (Aumento 20X).....	23
Figura 04 Isolamento da MCI. A- MCI exposta após isolamento mecânico. Seta preta indicando remanescente do embrião isolado e seta branca indicando a MCI. B- Embrião equino (blastocisto expandido) de 10 dias, após isolamento da MCI. C- Aspecto da MCI sobre a monocamada de fibroblastos bovinos, isolada do blastocisto equino expandido de 10 dias, dois dias após plaqueamento.....	24
Figura 05 Estruturas formadas após isolamento da MCI. A e B- Dois dias após o cultivo da MCI. Aumento de 20X.....	24
Figura 06 Cultivo contendo células com morfologia anômala de crescimento exacerbado. Seta preta indicando CTEs (colônia). Seta branca indicando MCI que não aderiu à monocamada dois	25

	dias após plaqueamento. Seta vermelha indicando células de aspecto heterogêneo, observadas três dias após cultivo, indicando possível contaminação do trofoblasto (Aumento de 40X).....	
Figura 07	Colônias de CTEs equinas formadas sobre monocamada de fibroblastos bovinos. A e B- Colônia de CTEs equina formada dois dias após plaqueamento da MCI, em diferentes poços e com diferentes aspectos morfológicos (Aumento de 10X).....	26
Figura 08	Colônia de CTEs formada quatro dias após cultivo da MCI. Cultivada sobre monocamada de fibroblastos equinos (Aumento de 20X).....	26
Figura 09	MCIs isoladas de embriões equinos refrigerados, apresentandocrescimento celular três dias após plaqueamento. A- MCI sobre a monocamada de fibroblastos bovinos, com algumas células em crescimento ao redor (Aumento de 10X). B- MCI ainda em suspensão na monocamada de fibroblastos bovinos (Aumento de 10X).....	27
Figura 10	Colônia de CTEs formada quatro dias após cultivo, sobre monocamada de fibroblasto bovino. Seta preta indicando fibroblastos; seta branca indicando a borda da colônia (Aumento de 40X).....	28
Figura 11	Colônias de CTEs formadas sobre monocamada de fibroblastos bovinos. A- 9 dias após o cultivo (Aumento de 20X). B- 5 dias após o cultivo. (Aumento de 10X).....	28
Figura 12	Colônias de CTEs antes da realização da passagem mecânica, formadas sobre monocamada de fibroblastos equinos 10 dias após o cultivo (Grupo 1). A- Aumento de 10X. B- Aumento de 20X.....	29
Figura 13	Colônias de CTEs após a realização da passagem mecânica, formadas sobre monocamada de fibroblastos equinos 3 dias após o	29

repique celular (Grupo 1). A e B- Aumento de 20X.....

- Figura 14** Colônias de CTEs antes da realização da passagem mecânica, formadas sobre monocamada de fibroblastos equinos 10 dias após o cultivo (Grupo 2). A- Aumento de 10X. B- Aumento de 20X..... 30

Capítulo 2

- Figura 15** Imunomarcacão das colônias de CTEs equinas obtidas de embriões frescos, apresentando marcação positiva para Oct-4. A- Aumento de 10 X e B- Aumento de 20X. C e D: Contra- coloração dos núcleos das CTEs com DAPI. C- Aumento de 10 X e D- Aumento de 20X. Todas as fotos foram obtidas em microscópio invertido de epifluorescência..... 35

- Figura 16** Imunomarcacão das colônias de CTEs equinas obtidas de embriões frescos, apresentando marcação positiva para SSEA-1 (A) e SSEA-4 (B). A- Aumento de 10 X e B- Aumento de 20X. C e D: Contra- coloração dos núcleos das CTEs com DAPI. C- Aumento de 10 X e D- Aumento de 20X. Todas as fotos foram obtidas em microscópio invertido de epifluorescência..... 36

- Figura 17** Imunomarcacão das colônias de CTEs equinas obtidas de embriões frescos, apresentando marcação positiva para TRA-1-60 (A) e TRA-1-81 (B). A e B-Aumento de 10X. Todas as fotos foram obtidas em microscópio invertido de epifluorescência..... 36

- Figura 18** Imunomarcacão das colônias de CTEs equinas obtidas de embriões refrigerados, apresentando marcação positiva para Oct-4 (A) e SSEA-4 (B). C e D- Contra-coloração dos núcleos das CTEs com DAPI. Todas as fotos foram obtidas em microscópio invertido de epifluorescência. Aumento de 10X..... 37

- Figura 19** Imunomarcção das colônias de CTEs equinas obtidas de embriões refrigerados, apresentando marcação positiva para SSEA-1 (A) e SSEA-3 (B). A- Aumento de 10 X e B-Aumento de 20X. C e D- Contra-coloração dos núcleos das CTEs com DAPI. Todas as fotos foram obtidas em microscópio invertido de epifluorescência. C e D- Aumento de 20X..... 38

LISTA DE ABREVIATURAS

- **AFP:** proteína fetal α
- **BMP:** Proteína morfogênica óssea
- **BSA:** Albuma sérica bovina
- **CTEs:** Células tronco embrionárias
- **CTMs:** Células tronco mesenquimais
- **CEs:** Corpos embrióides
- **DMEM:** Meio de cultivo celular (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)
- **DMSO:** Ácido Dimetilsufóxido
- **DNA:** Ácido desoxirribonucléico
- **EDTA:** Ácido etilenodiamino tetra-acético
- **EGF:** Fator de crescimento epidermal
- **ERK:** Quinase regulada por sinalização extracelular
- **F12:** Meio contendo uma mistura de nutrientes
- **FEFC:** Fibroblastos embrionários de fetos de camundongos
- **FFe:** Fibroblastos de fetos equinos
- **FGF:** Fator de crescimento fibroblastóide
- **bFGF:** Fator de crescimento básico de fibroblasto
- **FGF-4:** Fator de crescimento fibroblastóide- 4
- **FITC:** Isotiocianato de fluoresceína
- **FPH:** Fibroblasto de prepúcio humano
- **GCTM-2:** Antígeno monoclonal tumoral de células germinativas 2
- **HBSS:** Solução salina balanceada
- **hCG:** Gonadodrofina coriônica humana
- **JAK:** Proteína tirosina quinase da família Janus quinase
- **LIF:** Fator inibidor de leucemia
- **MCI:** Massa celular interna
- **MEF:** Monocamada Fibroblasto embrionário de camundongo
- **NCBI:** Centro Nacional de Informação sobre Biotecnologia
- **Oct-4:** Proteína de ligação ao octâmero 4
- **PCR:** Reação em cadeia da polimerase
- **PDGF:** Fator de crescimento derivado de plaquetas

- **POU5F1:** POU classe 5 homeobox 1
- **P13K:** Fosfoinosítídeo 3-quinase
- **SCID:** Camundongo com imunodeficiência combinada severa
- **SFB:** Soro fetal bovino
- **SOX-2:** Região Y de determinação do sexo
- **SSEA-1:** Antígeno embrionário estágio-específico 1
- **SSEA-3:** Antígeno embrionário estágio-específico 3
- **SSEA- 4:** Antígeno embrionário estágio-específico 4
- **STAT 3:** Transdutor de sinal e ativador de transcrição 3
- **cTNI:** Troponina cardíaca I
- **TEDS:** Tendão extensor digital superficial
- **TGF β :** Fator de crescimento transformante β
- **TRA-1-60:** Antígeno de rejeição tumoral 1-60
- **TRA-1-81:** Antígeno de rejeição tumoral 1-81
- **UTF1:** Fator 1 de transcrição de célula embrionária indiferenciada

SUMÁRIO

Lista de Tabelas	
Lista de Figuras	
Lista de Abreviaturas	
Resumo	
Abstract	
1. Introdução	01
2. Revisão de Literatura	03
2.1. Definição das CTEs.....	03
2.2. Cultivo e isolamento das CTEs.....	03
2.3. Caracterização das CTEs.....	08
2.4. Diferenciação das CTEs.....	11
2.5. CTEs equinas	14
3.OBJETIVOS E HIPÓTESES.....	17
CAPÍTULO 1.....	18
1.MATERIAL E MÉTODOS.....	18
1.1. Obtenção dos embriões	18
1.2. Preparo da monocamada de sustentação.....	19
1.3. Criopreservação dos fibroblastos	21
1.4. Inativação da monocamada	21
1.5. Isolamento e cultivo da MCI	22
1.6. Análise Estatística.....	22
2. RESULTADOS	23
2.1. Qualidade e inativação da monocamada	23
2.2. Isolamento da MCI e cultivo primário.....	24
2.3. Realização de passagens após o cultivo primário.....	28
3. DISCUSSÃO.....	30
4.CONCLUSÃO.....	33
CAPÍTULO 2.....	34
1.MATERIAL E MÉTODOS.....	34
1.1 Caracterização das CTEs.....	34
2. RESULTADOS.....	35

2.1. Caracterização das CTEs obtidas de embriões frescos.....	35
2.2. Caracterização das CTEs obtidas de embriões refrigerados.....	37
3. DISCUSSÃO.....	38
4. CONCLUSÃO.....	40
REFERÊNCIAS.....	41
ANEXO 1 NORMAS ARTIGO.....	47
ANEXO 2 ARTIGO CIENTÍFICO.....	54

MONTEIRO, B.A. **Cultivo e caracterização de células-tronco obtidas de blastocistos equinos frescos e refrigerados**. Botucatu, 2013. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, São Paulo.

RESUMO

Células-tronco embrionárias (CTEs) são células pluripotentes derivadas da massa celular interna, obtidas de blastocistos pré-implantados. Devido à sua pluripotência podem se diferenciar nos derivados das três camadas germinativas, endoderma, ectoderma e mesoderma, tanto *in vitro* como *in vivo*. O objetivo deste trabalho foi isolar e cultivar células da MCI de blastocistos equinos frescos e refrigerados, e caracterizar o cultivo destas células por meio da expressão dos marcadores Oct-4, SSEA-1, SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60 e TRA-1-81. Para tal foram utilizadas 10 éguas, das quais foram obtidos 40 embriões, divididos em dois grupos, sendo o Grupo 1 de embriões frescos, totalizando 26 embriões, e o Grupo 2 de embriões refrigerados, totalizando 14 embriões. No grupo 1 de embriões frescos, 73,1% das MCIs aderiram à monocamada dois dias após o cultivo, 65,4% mantiveram-se aderidas 4 dias após o cultivo, 19,2% foram submetidas à primeira passagem e nenhuma foi submetida à segunda passagem. Já no Grupo 2 de embriões refrigerados, 85,7% das MCIs aderiram à monocamada 2 dias após o cultivo, 85,7% das células permaneceram aderidas à monocamada 4 dias após o cultivo, 21,4% foram submetidas à primeira passagem, e 7,1% à segunda passagem. As colônias de CTEs equinas obtidas de embriões frescos foram marcadas com os anticorpos Oct-4, SSEA-1, SSEA-4, TRA-1-60 e TRA-1-81. Já as colônias de CTEs obtidas de embriões refrigerados foram marcadas com os anticorpos Oct-4, SSEA-1, SSEA-3 e SSEA-4. As células da MCI quando isoladas dos blastocistos equinos frescos e refrigerados, foram capazes de formar colônias semelhantes às colônias de CTEs. Quando cultivadas sobre monocamada de fibroblastos equinos e inativadas com Mitomicina C, apresentaram crescimento celular e foram capazes de formar colônias de CTEs. As CTEs equinas obtidas de embriões frescos expressaram os marcadores de pluripotência, Oct-4, SSEA-1 e SSEA-4, e os anticorpos TRA-1-60 e TRA-1-81 foram marcados com menos intensidade. Já as CTEs equinas obtidas de embriões refrigerados expressaram os marcadores Oct-4, SSEA-1 e SSEA-4.

Palavras-chave: Células-tronco; blastocistos; frescos; refrigerados; equinos.

ABSTRACT

Embryonic stem cells are pluripotent cells, derived from inner cell mass, obtained from pre-implanted blastocysts. Because of their pluripotency, they can differentiate into derivatives of three germ layers, endoderm, ectoderm and mesoderm, both *in vitro* as *in vivo*. The aim of this study was to isolate and culture inner cell mass (ICM) cells from fresh and cooled equine blastocysts and characterize stem cells culture obtained from fresh and cooled equine embryos, by the expression of pluripotency markers as Oct-4, SSEA-1, SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60 and TRA-1-81. For this, 10 mares were used, from which were obtained 40 embryos, divided into two different groups, Group 1 from fresh embryos, with a total of 26 embryos, and Group 2 from cooled embryos, with a total of 14 embryos. In Group 1 of fresh equine embryos, 73,1% of ICM adhered to monolayer two days after culture, 65,4% maintained adhered four days after culture, 19,2% were submitted to first passage and none were submitted to second passage. Whereas in the Group 2 of cooled embryos, 85,7% of ICM adhered to monolayer two days after culture, 85,7% maintained adhered to the monolayer 4 days after culture, 21,4% were submitted to first passage and 7,1% to second passage. The equine embryonic like-stem cells obtained from fresh embryos were stained with the antibodies Oct-4, SSEA-1, SSEA-4, TRA-1-60 and TRA-1-81. While the embryonic like-stem cells obtained from cooled embryos were stained with the antibodies Oct-4, SSEA-1, SSEA-3 and SSEA-4. The ICM cells when isolated from fresh and cooled equine blastocysts were capable to form embryonic stem cells-like colonies. When they were cultured under an equine fibroblasts monolayer and inactivated with Mitomycin C, showed cellular development and were able to form colonies. Equine embryonic like-stem cells obtained from fresh embryos expressed the pluripotency markers Oct-4, SSEA-1 and SSEA-4, however the antibodies TRA-1-60 and TRA-1-81 were expressed with low intensity. Though equine embryonic like-stem cells like-cells obtained from cooled embryos expressed the markers Oct-4, SSEA-1 and SSEA-4. The embryonic stem cells colonies from cooled embryos expressed the markers Oct-4, SSEA-1 and SSEA-4.

Key-words: Stem cells; blastocyst; fresh; cooled; equine.

1. INTRODUÇÃO

As células-tronco desempenham um importante papel na medicina veterinária e, atualmente diversas terapias com células tronco estão sendo desenvolvidas em animais. Algumas delas, como o tratamento de tendinite em equinos, por meio do uso de células-tronco mesenquimais (CTMs), já são inclusive aceitas comercialmente. Além disso, animais domésticos podem ser utilizados como modelo experimental para estudar as propriedades e o potencial das células-tronco em futuras aplicações na medicina humana (RIBTSCH et al., 2010).

Os últimos anos tiveram um aumento exponencial em experimentos com objetivo de melhorar as condições de cultivo (XU et al. 2001; AMIT et al. 2003), manipulação genética (ZWAKA & THOMSON, 2003) e métodos de diferenciação para produzir células-tronco embrionárias humanas para transplante e testes de drogas (ASSADY et al. 2001; KAUFMAN et al. 2001; ZHANG et al. 2001; KEHAT et al. 2002; SHULZ et al. 2003). Entretanto, o desafio permanece em produzir derivados maduros e funcionais de linhagens celulares que podem ser utilizadas para tentativas de transplantes.

No Brasil, os Ministérios da Ciência, Tecnologia e da Saúde, bem como outras instituições têm investido recursos consideráveis em pesquisas com terapia celular, visando manter o país em posição destaque na área (ZAGO & COVAS, 2006).

Adicionalmente, há diversos grupos de pesquisa que trabalham, ou que buscam instituir na rotina de hospitais públicos e privados, a terapia celular em pacientes com doenças cardíacas, diabetes melito, câncer, pneumopatias e doenças articulares, as quais constituem importantes causas de morte e morbidade na sociedade.

A primeira derivação de sucesso de células-tronco embrionárias (CTEs) humanas foi relatada por Thomson et al. (1998), na qual os autores isolaram células da MCI cultivadas sobre monocamada de células de fibroblasto embrionário de camundongo, conhecido como MEF, mitoticamente inativadas. Dois anos depois Reubinooff et al. (2000) confirmaram que as CTEs humanas poderiam ser eficientemente derivadas de embriões, demonstrando ao mesmo tempo o potencial de diferenciação destas células sob condições *in vitro*.

Desde então, foi iniciado um rápido processo e diversos estudos descreveram a derivação de novas linhagens de CTEs, incluindo métodos de crescimento tanto de CTEs indiferenciadas quanto de progênes diferenciadas. Esses relatos contribuíram

fortemente para o progresso gradual que ocorreu nos últimos anos, quando células-tronco murinas, células-tronco de primatas e células de carcinoma embrionário derivadas de teratomas testiculares foram extensivamente caracterizadas (DRAPER et al. 2002; DRAPER & FOX, 2003).

Em animais domésticos o estabelecimento de colônias de CTEs representa um importante instrumento de estudo da biologia do desenvolvimento e diferenciação celular, além de ser importante para o estabelecimento de tecnologias ligadas à multiplicação de animais geneticamente superiores e produção de animais transgênicos. De fato, linhagens de células pluripotentes já foram isoladas em espécies como ovelha, hamster, coelho, rato, bovinos, suínos e equinos entre outras.

No entanto, é essencial para o aprimoramento das terapias e tratamentos celulares que o processo de manutenção e caracterização do cultivo das células-tronco, seja dominado e que se conheça o processo de diferenciação celular. Os modelos experimentais de células-tronco em camundongos têm propiciado informações relevantes para transplantes de células-tronco em outras espécies animais. No entanto, apesar de compartilharem similaridades quanto à morfologia e alguns marcadores de superfície celular e expressão gênica, as CTEs possuem características únicas em cada espécie. Além disso, a contínua propagação de linhas de CTEs inapropriadamente caracterizadas podem induzir os pesquisadores ao erro e, dessa forma, prejudicar a descoberta de condições de cultivo mais adequadas ao cultivo de verdadeiras CTEs.

Diferentemente de cultivos celulares tradicionais que visam à obtenção de produtos protéicos ou vírus a partir das células, o cultivo de células-tronco apresenta como desafio um cultivo cujo objetivo final é o aumento do número dessas próprias células em seu estado indiferenciado. Apesar do alto potencial biomédico das CTEs ainda existem dificuldades na manutenção da pluripotência *in vitro* destas células nas espécies domésticas. Existem muitos estudos envolvendo o cultivo de CTEs de murinos e primatas, no entanto, pouca informação existe para a espécie equina.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Definição das CTEs

Células-tronco são conhecidas por possuir a capacidade *in vivo* de se auto-renovar, e se diferenciar em um ou mais tipos celulares. A capacidade de diferenciação é conhecida como potência (KOCH et al., 2008). As células-tronco são células

indiferenciadas com capacidade prolongada ou ilimitada de multiplicação. Estas ao se dividir, podem produzir dois tipos de células: a indiferenciada, igual à célula original, sendo capaz de manter suas características de indiferenciação, e outra que iniciará seu processo de diferenciação celular (MINGRONI-NETTO & DESSEN, 2008).

As CTEs são células pluripotentes derivadas da massa celular interna (MCI), obtidas de blastocistos pré-implantados. Devido à sua pluripotência, podem se diferenciar nos derivados das três camadas germinativas, endoderma, ectoderma e mesoderma, tanto *in vitro* como *in vivo* (CONLEY et al. 2004; DRAPER et al. 2002; DRAPER & FOX, 2003; STOJKOVIC et al. 2004; YU & THOMSON, 2008).

Estas células produzem linhagens de células pluripotentes com a capacidade de auto- renovação e ampla plasticidade de diferenciação, as quais são obtidas de embriões pré-implantados, ou seja, em estágio inicial, e são consideradas homogêneas, conseguindo manter uma população celular não comprometida com a diferenciação por um período quase que ilimitado, sem perder sua pluripotência e seu cariótipo estável. Além disso, são capazes de se auto-renovar *in vitro* por tempo indeterminado podendo se diferenciar em todos os tipos celulares (PRELLE et al., 2002; STOJKOVIC et al. 2004; YU & THOMSON, 2008).

A capacidade destas células de se multiplicar em cultivo, sem perder sua pluripotência, bem como a possibilidade de induzir sua diferenciação em tipos celulares específicos, fez com que as CTEs se tornassem uma poderosa ferramenta de pesquisa e uma promissora fonte de tecidos para transplante (PEREIRA, 2006).

Pelas suas características de pluripotência, as CTEs podem ser uma alternativa para as desvantagens encontradas na utilização de CTMs no reparo de tecidos, pois oferecerem um potencial ilimitado de proliferação e longevidade (PARIS & STOUT, 2010) tendo a capacidade de se desenvolver de forma estável, diferenciando-se em células das camadas germinativas. Além disso, a diferenciação *in vitro* em neurônios, células hematopoiéticas e músculo cardíaco também tem sido relatada (SAITO et al., 2002).

2.2. Cultivo e isolamento das CTEs

• Isolamento da MCI

De acordo com o primeiro protocolo que descreve a propagação de CTEs humanas, a camada externa do trofoectoderma do blastocisto foi primeiramente removida por imunocirurgia, e as células da MCI posteriormente cultivadas em MEF

(monocamada de fibroblasto embrionário de camundongo) irradiadas ou tratadas com Mitomicina C. Após vários dias de cultivo, colônias de CTEs começaram a se formar. Essas colônias foram então transferidas para novas MEFs, uma exigência para a manutenção das CTEs num estado pluripotente (CONLEY et al. 2004).

O isolamento das CTEs humanas foi inicialmente feito por meio da adaptação de métodos descritos com CTEs de camundongos e primatas. Para estabelecer uma nova linhagem da MCI, o blastocisto é primeiramente incubado com pronase, a qual digere a zona pelúcida do embrião. Sequencialmente, a zona pelúcida do blastocisto é tratada com anticorpo anti-humano e complemento de cobaia (AMÉEN et al. 2008).

Este processo, que é denominado de imunocirurgia, lisa o trofoblasto ou trofoectoderma através de uma reação anticorpo/complemento. A MCI isolada é então transferida para uma monocamada de MEF mitoticamente inativada, numa placa de cultivo. As colônias de CTEs obtidas no cultivo são normalmente dissecadas e transferidas para uma nova placa de cultivo após 7 a 14 dias (AMÉEN et al. 2008).

Apesar de a imunocirurgia ser muito utilizada na derivação de linhagens de CTEs murinas e ser um procedimento simples que não requer equipamentos de valor elevado, ela utiliza produtos derivados de origem animal como os anticorpos de coelho, camundongos e complemento de cobaias. Desta forma, as CTEs obtidas não são ideais para a utilização em transplante por não serem cultivadas em condições *Xeno-free*.

O isolamento por separação mecânica foi descrito em 2005 por Simon et al. e consiste no corte do embrião pela utilização de lâminas e agulhas, separando o trofoblasto e fazendo o plaqueamento sequente.

Ellerstrom et al. (2006) publicaram outra variação da técnica, a partir do plaqueamento prévio do embrião intacto; após adesão e expansão das células do trofoblasto, a MCI foi separada mecanicamente, com aproveitamento de 26% no total de blastocistos humanos utilizados.

Em humanos, a eliminação de todo o material animal, tanto na derivação e no cultivo à longo prazo das CTEs humanas é necessário antes da aplicação clínica das CTEs humanas. As consequentes possibilidades de transplantar CTEs humanas contaminadas, assim como o aumento do risco de rejeição e a possibilidade de transferência de patógenos, tornam a aplicação das CTEs humanas inadequadas para utilizações clínicas (ELLERSTROM et al. 2006).

- **Cultivo**

Para o crescimento e sobrevivência, as CTEs requerem adesão a uma matriz celular ou extracelular (Nieto et al., 2007). Geralmente são cocultivadas com fibroblastos mitoticamente inativos mas, metabolicamente ativos, permitindo a síntese estável de receptores e citocinas necessários ao crescimento das CTEs (ROY et al., 2001). Sendo assim, para inativar o crescimento da monocamada de fibroblastos e inibir a replicação de DNA, são utilizados métodos como a inativação química, por meio de Mitomicina C e a inativação por irradiação gama (ROY et al., 2001).

A camada de fibroblastos inativos, também chamada de *feeder*, contribui com vários fatores essenciais para a manutenção da auto-renovação das CTEs. Acredita-se que seja um conjunto de fatores de crescimento, moléculas de superfície celular, matriz extracelular, neutralizantes de produtos tóxicos e metabólitos produzidos pelas CTEs, que contribuem para a manutenção do estado indiferenciado (PEDERSEN, 2002).

Além disso, sabe-se que fibroblastos secretam fatores promotores da manutenção do estado indiferenciado como o FGF (fator de crescimento fibroblastóide), TGF β (fator de crescimento transformante β), ativinas, proteínas WNT e antagonistas da sinalização de BMP (proteína morfogênica óssea), que promovem a manutenção do estado indiferenciado (WANG et al., 2005).

Por outro lado, Pedersen (2002) relata que alguns pesquisadores identificaram o LIF (fator inibidor de leucemia) como sendo um fator liberado por fibroblastos embrionários de camundongo. Uma proteína que atua como mediador da comunicação celular e que tem aplicação nas atividades biológicas celulares, incluindo diferenciação, crescimento, proliferação, tropismo, proteção celular, entre outras (PEDERSEN, 2002) portanto, essa molécula ajuda na prevenção da diferenciação e manutenção da sua capacidade de auto-renovação (SMITH et al., 1988; NIWA et al., 1998; MATSUDA et al., 1999).

De fato, já foi comprovado que CTEs humanas podem crescer na ausência de células da *feeder* num substrato de crescimento como a MatrigelTM, utilizando meio de MEF condicionado (AMÉEN et al. 2008). Contudo, a ausência de uma monocamada ou meio condicionado de MEF durante o cultivo de células da MCI de outros mamíferos, resulta em diferenciação espontânea com aparecimento de populações heterogêneas de células diferenciadas morfológicamente semelhantes nas colônias de CTEs (CONLEY et al. 2004).

Nieto et al. (2007) avaliaram o efeito da Mitomicina C em fibroblastos de prepúcio humano (FPH) utilizados como *feeder* para o cultivo de CTEs humanas, através de imunocitoquímica e citometria de fluxo. Dessa forma, foi testada a capacidade da Mitomicina C em impedir a proliferação dos FPH bem como sua capacidade de induzir apoptose. Sendo assim, a Mitomicina C foi capaz de inibir a proliferação dos FPH numa concentração de 10 µg/ml por um período de duas horas e meia, demonstrando uma diminuição no índice de proliferação, mensurado pelo anticorpo Ki-67 e pelas fases S e G2/M do ciclo celular relacionados com os FPH ativos.

Além disso, foi observado por Nieto et al. (2007) por meio de imunomarcação do anticorpo Ki-67, juntamente com as análises do ciclo celular e morte celular por citometria de fluxo, que a Mitomicina C não impede completamente a proliferação das células da *feeder*. Sendo assim, algumas células permanecem ativas, contribuindo para a manutenção da densidade da *feeder*, principalmente quando as células morrem sem nenhuma influência do crescimento das CTEs humanas indiferenciadas.

Além disso, foi detectada uma baixa porcentagem de células com características de necrose e apoptose, em diferentes momentos do cultivo. Na maior parte do tempo, as células permaneceram num estado mitoticamente inativado, sendo que a porcentagem de células apoptóticas aumentou do 2º ao 10º dia, da mesma forma foi observado um aumento das células necróticas. No entanto, as células dos FPH foram capazes de manter as CTEs humanas num estado indiferenciado ao longo do estudo (NIETO et al., 2007).

A manutenção adequada e expansão das CTEs humanas é umas das etapas mais importantes no estudo das CTEs, pois essa etapa gera o material inicial para todos os passos seguintes e, além disso, determina o padrão de qualidade do cultivo (AMÉEN et al. 2008).

O método mais utilizado para manter CTEs normais de alta qualidade é a expansão através da realização de passagens utilizando microdissecção manual. Neste processo delicado, micropipetas ou pipetas de Pasteur são utilizadas para dissecar colônias de CTEs individuais, transformando-as em pedaços pequenos e, posteriormente transferindo-as para novas placas de cultivos. Este procedimento é normalmente repetido a cada 4 a 5 dias. Sendo assim, a sua maior vantagem é a ausência da utilização de enzimas de dissociação celular e a seleção da colônia a cada passagem, por meio do isolamento de CTEs indiferenciadas ao invés das células mais diferenciadas. No entanto

este método é demorado, tornando-o difícil de processar várias células ao mesmo tempo (AMÉEN et al. 2008).

O uso de enzimas para a dissociação celular durante a passagem é obvio e consideravelmente mais rápido e mais simples do que a microdissecção. Durante a passagem, as colônias de CTEs são incubadas com enzimas antes da suspensão do *cluster* ser realizada. De acordo com diversos relatos, o uso de enzimas para a passagem de CTEs aumenta o risco de introduzir aberrações cromossômicas durante a propagação *in vitro* (AMÉEN et al. 2008). A passagem química, embora tenha sido realizada com sucesso em camundongos, ainda não está bem padronizada para humanos e principalmente para outras espécies, como os animais domésticos.

- **LIF**

Como mencionado anteriormente, o protocolo padrão para expansão das CTEs consiste na utilização do co-cultivo de MEF. Tal monocamada é necessária porque os fibroblastos fornecem o LIF, que é necessário para promover a auto-renovação e impedir a diferenciação das CTEs (GARFIELD, 2010).

O LIF é uma glicoproteína solúvel da família de citocinas IL-6, cuja função consiste em se ligar ao receptor LIFR e a proteína gp130, formando um heterodímero e induzindo a ativação de JAK (proteína tirosina quinase da família Janus quinase), a qual ativa a proteína STAT3 (Sinal de transdução e ativador transcrricional) permitindo assim a manutenção das CTEs num estado indiferenciado (BOEUF et al., 1997; NIWA et al., 1998). Sendo assim, o heterodímero LIFR-gp130 também induz a associação de SHP-2 (tirosina fosfatase) e da proteína adaptadora Gab1 com ativação da ERK (proteína regulada por sinais extracelulares), levando a diferenciação das CTEs (KAWAHARA et al., 2009). Dessa forma, o equilíbrio entre a ativação de STAT3 e a inibição de ERK por P13K (fosfoinositídeo quinase) permite que as CTEs continuem proliferando em cultivo sem que ocorra diferenciação (TISCORNIA & BELMONT, 2010).

A adição de LIF ao meio de cultivo pode manter as CTEs murinas num estado indiferenciado, não havendo necessidade da utilização da monocamada de MEF. Porém, essa citocina não é suficiente para manter a pluripotência das CTEs humanas cultivadas na ausência de MEF (HOFFMAN & CARPENTER, 2005). Tal fato ainda não é totalmente esclarecido, mas alguns pesquisadores acreditam que há uma baixa ativação da via STAT3 em células humanas (SATO et al., 2004). Outros sugerem que possa ser

devido à ausência ou ao baixo nível de expressão dos componentes da via de ativação do LIF (RICHARDS et al., 2004).

O estabelecimento de linhagens de CTEs permitiu o desenvolvimento de estratégias alternativas para este tipo de estudos. Enquanto cultivadas sobre uma camada de fibroblastos fetais e na presença de LIF, estas células se mantêm indiferenciadas. Porém, a remoção dos fibroblastos fetais e de LIF e seu cultivo em suspensão podem induzi-las a entrar em um programa de diferenciação *in vitro* de forma sincronizada (KAWAHARA et al., 2009).

2.3. Caracterização das CTEs

• Morfologia das células-tronco embrionárias

A morfologia das CTEs apresenta tamanho uniforme (10-15 µm de diâmetro) e forma circular ou oval. A característica que melhor diferencia as CTEs de outros tipos celulares é a presença de um núcleo evidente, o qual pode conter de um a dois nucléolos circundados por um citoplasma agranular (ESHKIND et al., 2002).

Em bovinos, as CTEs devem apresentar tamanho pequeno, aspecto arredondado e alto índice núcleo/citoplasma. Esta classificação é particularmente importante, pois com frequência ocorre a contaminação do cultivo por células do trofoectoderma, bem como por células do endoderma visceral (hipoblasto) (MUÑOZ et al., 2008).

CTEs humanas pluripotentes podem ser caracterizadas fenotipicamente pela sua morfologia e pelo seu perfil de expressão de marcadores. CTEs indiferenciadas crescem como colônias com bordas distintas. As CTEs humanas são pequenas, densamente comprimidas e exibem uma morfologia típica com uma alta relação núcleo/citoplasma e um nucléolo grande (AMÉEN et al. 2008).

A morfologia das colônias das CTEs diferenciadas espontaneamente é claramente diferente e pode tomar várias formas. As colônias podem perder sua borda firme e as células no interior da colônia também podem começar a expandir, alongar, separar ou empilhar e se tornarem espessas e opacas (AMÉEN et al. 2008).

Apesar de compartilharem similaridades quanto à morfologia, e alguns marcadores de superfície celular e de expressão gênica, as CTEs possuem características únicas em cada espécie. As CTEs murinas apresentam colônias espessas com células sobrepostas e com bordas não definidas, enquanto as células embrionárias humanas e equinas formam colônias de espessura fina e com bordas bem definidas (LI et al., 2006).

A manutenção *in vitro* das CTEs num estado indiferenciado pode ser caracterizada por meio de sua morfologia típica. Essas células apresentam uma alta razão núcleo/citoplasma e um nucléolo grande, formando colônias compactas com bordas bem definidas. As colônias formadas pelas células CTEs humanas são achatadas enquanto que as colônias de CTEs murinas são esféricas (THOMSON et al., 1998; AMIT & ITSKOVITZ-ELDOR, 2002).

- **Expressão de marcadores de pluripotência**

Linhagens de CTEs inteiramente caracterizadas são aquelas que apresentam marcadores de células-tronco típicos, possuem cariótipo normal e potencial de diferenciação *in vitro* e *in vivo* e, preferencialmente mantêm essas características por períodos prolongados em cultivo. Muitas linhagens novas de CTEs são descritas sem completa caracterização. Por exemplo, a formação de teratomas após a inoculação em camundongos imunodeprimidos e a demonstração da estabilidade de cariótipo após crescimento a longo prazo são, constantemente omitidos (STOJIKOVIC et al.2004).

As células pluripotentes apresentam algumas características que indicam tratar-se de uma célula indiferenciada, tais como: a atividade de fosfatase alcalina, presença do fator de transcrição Oct-4 (Proteína de ligação ao octâmero 4), alta atividade da telomerase e além de uma variedade de marcadores celulares. O perfil genético das CTEs apresenta dados controversos. Apesar de muitos genes terem sido identificados nas células, somente poucos são consenso entre a comunidade científica. A presença dos marcadores Oct-3/4, Nanog, fosfatase alcalina, SSEA3, SSEA4, TRA-1-60 e TRA-1-81 são consideradas fidedignas e mais utilizadas na identificação de CTEs (DONOVAN & GEARHART, 2001).

Os marcadores de superfície celular característicos de CTEs humanas indiferenciadas são SSEA-3 e SSEA-4 (antígenos embrionários estágio-específicos 3 e 4), as glicoproteínas de alto peso molecular, TRA-1-60 e TRA-1-81 (antígeno de rejeição tumoral 1-60 e 1-81), e o GCTM-2 (antígeno monoclonal tumoral de células germinativas 2). Diferente das CTEs murinas, CTEs humanas indiferenciadas não expressam SSEA-1 (AMÉEN et al. 2008).

A caracterização de linhagens de CTEs de ungulados está menos definida, mas também deve ser acompanhada pela expressão de marcadores específicos para os tipos celulares contaminantes do cultivo, ou seja, transferrina ou fosfatase alcalina, que são utilizadas para detecção de células da endoderme, e o interferon-tau ou Gata6 que é

utilizado para detecção de células do trofoectoderma de bovinos. Também, a citoqueratina pode ser utilizada para detecção de células da ectoderma, incluindo o trofoblasto (KEEFER et al., 2007).

O gene POU5F1 (POU classe 5 homeobox 1), que se localiza no braço esquerdo do cromossomo humano, e codifica a proteína Oct-4, está presente somente nas células da MCI do blastocisto e no epiblasto (ZAGO & COVAS, 2006) em camundongos, mas tem expressão diferenciada tanto na MCI como no trofoblasto em ungulados.

Apesar do gene Oct-4 ser necessário para a manutenção da pluripotência de CTEs ele sozinho não é excludente de diferenciação. Blastocistos humanos em diferentes estágios de desenvolvimento apresentam variados níveis de expressão de Oct-4, também encontrado em células diferenciadas, como as do trofoblasto (CAUFFMAN et al., 2005).

As células da MCI do blastocisto, sabidamente, dão origem a linhagens de CTEs, mas não se diferenciam nas membranas fetais, enquanto as células do trofoblasto dão origem a uma linhagem de células-tronco trofoectodérmicas. Ambas as linhagens têm características de células-tronco, com restrita potencialidade de diferenciação, porém somente as CTEs podem expressar o Oct-4 (ZAGO & COVAS, 2006).

Desde 1998, quando a primeira linhagem de células-tronco humana foi isolada, o bFGF (fator de crescimento básico de fibroblasto) tem sido utilizado para manter as células num estado indiferenciado. O seu mecanismo de ação ainda não é totalmente esclarecido, mas acredita-se que atue na fosforização da tirosina de várias proteínas, e também na ativação da sinalização extracelular das kinases ERK1/2 (quinase regulada por sinalização extracelular) (VALLIER et al., 2005).

Dessa forma, a retirada de FGF (fator de crescimento fibroblastóide) ou a adição de FGF-4 (fator de crescimento fibroblastóide-4) e heparina ao meio de cultivo, pode desativar o Oct-4, fazendo com que as linhagens de CTEs se diferenciem em células trofoblásticas, ou transforme-se em células-tronco trofoectodérmicas (ZAGO & COVAS, 2006).

Outro gene relacionado com o estado indiferenciado e pluripotência é o Nanog, o qual se localiza no cromossomo 12 humano, equivalente ao cromossomo 6 no camundongo. Tal gene codifica um fator de transcrição com domínio *homeobox* (ZAGO & COVAS, 2006).

O Nanog é um gene que possui *homeobox* para manutenção da pluripotência. Não está diretamente relacionado com o Oct-4 e previne as células de se diferenciarem

em endoderme extra-embriônica (CHAMBERS et al., 2003). Sua hiperexpressão permite o crescimento em sistemas livres do cocultivo e melhora a eficiência na produção de células clone (DARR et al., 2006). Tanto em humanos como em camundongos, sua supressão induz a diferenciação para tecidos extraembrionários (HYSLOP et al., 2005).

Não existem na literatura dados sobre a expressão do gene Nanog em CTEs equinas, cuja sequência gênica está predita no banco de dados NCBI e cuja detecção no cultivo servirá como ferramenta para comprovar a pluripotência celular.

A identificação do fator de transcrição Nanog possibilitou melhor compreensão das vias de sinalização Oct-4, LIF/STAT3 para a regulação da pluripotência das CTEs (CHAMBERS et al., 2003; MITSUI et al., 2003). Chambers et al. e Mitsui et al. (2003) demonstraram que uma alta expressão de Nanog em conjunto com a ativação de LIF/STAT3 mantém a auto-renovação das CTEs. Outro fato observado foi que a alta expressão de Nanog não afetou a auto-renovação das CTEs pela ativação de STAT3 e vice-versa, indicando que Nanog e STAT3 atuam independentemente. Além disso, Nanog e Oct-4 trabalham juntos para manter a pluripotência e auto-renovação das CTEs. Esta conclusão foi baseada em duas observações: Nanog foi expresso em embriões Oct-4-deficientes e a alta expressão de Nanog não pode reverter o programa de diferenciação induzido pela baixa regulação de Oct-4 em CTEs.

Os marcadores de CTEs humanas também apresentam algumas características fundamentais da linhagem murina, tais como a expressão de Oct-4 e atividade da telomerase (THOMSON et al., 1998). Ao contrário das CTEs de camundongo, as CTEs humanas apresentam marcadores típicos, como as proteoglicanas TRA-1-60, TRA-1-81, GCTM-2 e os antígenos embrionários estágio-específicos SSEA-3, SSEA-4, os quais estão ausentes em CTEs de camundongo. A identificação desses marcadores, tanto para CTEs murinas quanto para CTEs humanas, têm sido importante para monitorar e quantificar a pluripotência de CTEs submetidas a diferentes condições de cultivo (ITSKOVITZ-ELDOR et al., 2000; REUBINOFF et al., 2000).

2.4. Diferenciação das CTEs

Uma vez obtido o isolamento da MCI e o cultivo de CTEs, diversos testes podem ser realizados para comprovar o potencial pluripotente das células. O ideal é que sejam realizadas provas concomitantes, uma vez que, um resultado positivo em apenas

um teste não garante que o material isolado apresente as características desejadas (SAITO et al., 2002; LI et al., 2006).

O potencial pluripotente das CTEs pode ser avaliado *in vitro* através da indução da diferenciação celular. No entanto, a melhor maneira de se caracterizar a pluripotência de CTEs é a indução de sua diferenciação para linhagens celulares com origem ectodermal, mesodermal e endodermal (HEINS et al. 2004).

Em contraste com células embrionárias de carcinoma, as CTEs indiferenciadas tem uma grande capacidade de se diferenciar espontaneamente em vários tipos celulares *in vitro*. Pouco se sabe sobre os mecanismos que podem engatilhar a diferenciação espontânea de CTEs pluripotentes, pois ocorre uma associação aparentemente heterogênea de diferentes tipos celulares. A diferenciação espontânea indesejada é observada num grau variável em todas as rotinas de cultivo e ainda são consideradas como um dos maiores obstáculos no cultivo de CTEs atuais (AMÉEN et al. 2008).

A diferenciação espontânea das CTEs pode ser aproveitada de outra maneira, para recapitular certos aspectos do desenvolvimento embrionário humano *in vitro* e para gerar facilmente diversas progênies de CTEs. A diferenciação espontânea simples das CTEs pode ser iniciada experimentalmente pela ausência de passagens das colônias ou pela retirada do meio condicionado. Dessa forma, um método simples de verificar a diferenciação espontânea, é o cultivo por um período superior a 7 dias, sem que as CTEs humanas sejam replicadas (HEINS et al., 2004). Além disso, pode ser feita uma diferenciação espontânea mais complexa através do cultivo das CTEs como agregados tridimensionais (AMÉEN et al. 2008).

A utilização da combinação de fatores de crescimento e sistemas de indução celular permitiram estabelecer estratégias alternativas para a diferenciação direta das células numa linhagem desejada. De acordo com uma dessas estratégias, entretanto, ainda permanece uma heterogeneidade relativamente alta de linhagem celular, ainda permanece necessitando de uma subsequente purificação, incluindo dissecção mecânica e utilização de meios específicos, além de avaliações imunocitoquímicas (CONLEY et al. 2004).

Ao cultivar CTEs em suspensão, ou através da retirada dos fatores de indução do estado indiferenciado do cultivo, as CTEs devem formar agregados tridimensionais de células diferenciadas denominados corpos embrióides (CEs) (SCHULDINER et al., 2000).

Para iniciar a formação dos CEs, as colônias de CTEs são removidas da *feeder* e mantidas para se agregar em esferas. Estas são normalmente mantidas em suspensão e dão origem a células fenotipicamente diferenciadas nas três camadas germinativas, que originam um padrão complexo de indução. A diferenciação pode ser obtida pelo sequente plaqueamento dos CEs ou das células liberadas por estes, em matriz extracelular específica (AMÉEN et al. 2008).

A formação do CE tem sido utilizada como uma etapa inicial em vários estudos, com o objetivo de diferenciar tanto as CTEs de camundongo quanto as humanas em tipos celulares específicos e desejados (CONLEY et al. 2004).

Além disso, os CEs recapitulam diversos aspectos do desenvolvimento inicial, exibindo programas de diferenciação regional- específicos em derivados das três camadas germinativas (SCHULDINER et al. 2000; CONLEY et al. 2004).

Uma maneira de confirmar o potencial de diferenciação celular das linhagens estabelecidas é a indução de formação de teratomas após transferência para camundongos imunodeprimidos. Dessa forma, inocula-se uma solução com alta concentração de CTEs no testículo de camundongos imunodeprimidos e observa-se a formação de teratoma durante as 12 semanas seguintes. No entanto, na espécie equina trabalhos anteriores não tiveram sucesso na indução de teratomas após a transferência de CTEs (SAITO et al., 2002; LI et al., 2006).

Nestas condições, ao formar os CEs, as CTEs simulam o desenvolvimento de um embrião pré-implantado. Nos primeiros dois a quatro dias de cultivo em suspensão, observa-se a formação de endoderma na superfície dos agregados das CTEs. Após alguns dias em cultivo, forma-se uma cavidade cística, células do endoderma e ectoderma aparecem, e a seguir, uma série de linhagens embrionárias se desenvolve, incluindo linhagens hematopoiética, neuronal, endotelial, cardíaca e muscular (BAUTCH et al., 1996; FRAICHARD et al., 1995; LING & NEBEN, 1997). Assim, a diferenciação de CTEs em suspensão representa um modelo *in vitro* promissor para o estudo da determinação das linhagens embrionárias durante o desenvolvimento mamífero.

Se após dois a quatro dias em cultivo os CEs forem cultivados na presença de diferentes fatores, a diferenciação pode ser dirigida para seguir uma programação tecido-específica. Assim, as CTEs também são consideradas um modelo experimental para o estudo de determinação e diferenciação celular. Além disso, outros processos que acontecem no início do desenvolvimento embrionário, como a iniciação da inativação

do cromossomo X e os efeitos de substâncias tóxicas e biologicamente ativas no desenvolvimento embrionário, também podem ser estudados nestas células (HEARD et al., 1999; KELLER, 1995; SCHOLZ et al., 1999).

2.5. CTEs equinas

O uso da CTEs pode ser considerado promissor no tratamento regenerativo de atletas da espécie equina. Danos articulares representam não somente a limitação na carreira do animal, mas também podem ser utilizados como modelo experimental para avaliar doenças humanas.

Sendo assim, o estudo das CTEs equinas auxilia na compreensão de enfermidades que acometem a espécie humana, como a osteoartrite, que nos equinos ocorre de forma natural e não induzida, diferentemente dos modelos experimentais murinos (TROUNSON et al., 2007). Outra possível aplicação das CTEs equinas é a recriação de gametas de animais de alto valor.

Além da aplicação clínica, as CTEs podem elucidar um número ilimitado de processos fisiológicos relacionados aos grandes animais, utilizando o equino como modelo.

Saito et al. (2002) isolaram 2 linhagens de células semelhantes a CTEs equinas, derivadas de blastocistos congelados/descongelados, os quais foram cultivados numa camada de fibroblastos oriundos do cordão umbilical de bovinos. As duas linhagens de CTEs mantiveram um cariótipo diplóide normal quando cultivados *in vitro*, e, expressaram marcadores que são característicos de CTEs de camundongos, como fosfatase alcalina, SSEA-1, STAT-3 e Oct-4.

Após o cultivo das células-tronco *in vitro* por mais de 17 passagens, algumas CTEs diferenciaram-se em precursores de células neurais, na presença de bFGF, EGF (fator de crescimento epidermal) e PDGF (fator de crescimento derivado de plaqueta). Além disso, tais autores confirmaram a capacidade de diferenciação dessas células-tronco em linhagens endoteliais e hematopoiéticas (SAITO et al., 2002).

As CTEs de diversas espécies têm expressado antígenos de superfície celular encontrados tanto em CTEs humanas como em murinas. Com base nesta informação, Guest & Allen (2007) investigaram padrões de expressão gênica em blastocistos de 7 dias, dos quais as CTEs são originadas. Os genes estudados incluíram SSEA-1, SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60, TRA-1-81, fosfatase alcalina, sendo a maioria encontrada na MCI.

Neste estudo, as CTEs foram marcadas por meio de imunocitoquímica e imunofluorescência. As CTEs marcadas por meio de imunocitoquímica expressaram atividade da fosfatase alcalina, enquanto os marcadores SSEA-1, SSEA-4, TRA-1-60, TRA-1-81 foram marcados no citoplasma da célula e a marcação do Oct-4 foi observada no núcleo. Já a marcação do SSEA-3 não foi observada nas CTEs (GUEST & ALLEN, 2007).

Em relação aos mesmos marcadores, foram obtidos diferentes padrões de localização no blastocisto equino de 7 dias. Sendo assim, os marcadores SSEA-1, SSEA-4 foram encontrados tanto na MCI quanto no trofoblasto, já os antígenos TRA-1-60 e TRA-1-81 marcaram predominantemente a MCI, com uma marcação menos intensa no trofoblasto. O Oct-4 e a fosfatase alcalina foram observados quase que exclusivamente na MCI, com pouca marcação no trofoblasto (GUEST & ALLEN, 2007).

Dessa forma, tal fato demonstra que a espécie equina, assim como a murina e a humana, possui seu próprio padrão de expressão de marcadores específicos de CTEs. As CTEs equinas diferem das CTEs humanas e das murinas, as quais expressam tanto Oct-4 e a fosfatase alcalina, enquanto as CTEs humanas expressam SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60, TRA-1-81 e não expressam SSEA-1. Ao invés disso, as CTEs murinas expressam somente SSEA-1 e não expressam SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60 e TRA-1-81 (GUEST & ALLEN, 2007).

Num outro estudo, células da MCI foram isoladas imunocirurgicamente de embriões equinos de 7 e 8 dias, e após a proliferação *in vitro* por 15 a 28 passagens, três linhagens de células confirmaram ser células-tronco pela expressão contínua da fosfatase alcalina, e pela capacidade de se ligar ao anticorpo específico pelos marcadores de células-tronco SSEA-1, TRA-1-60, TRA-1-81 e Oct-4 (LI et al., 2006).

Sendo assim, foram isoladas um total de 18 MCIs de 24 embriões com 7 e 8 dias. Após 7 dias de cultivo em monocamada contendo fibroblastos de fetos equinos (FFe) e fibroblastos embrionários de fetos de camundongos (FEFC), células das 18 MCIs formaram colônias (LI et al., 2006).

A marcação das CTEs equinas com 5 marcadores comumente utilizados para identificar células-tronco humanas e murinas, mostrou que a expressão da fosfatase alcalina se manteve, e também dos marcadores SSEA-1, SSEA-4, TRA-1-60, TRA-1-81 após 26 passagens (LI et al., 2006).

Quando mantidas em monocamada livre de fibroblastos, as três linhagens de células se diferenciaram nas células da endoderma, mesoderma e ectoderma. Apesar disso, não se observou a formação de teratomas quando inoculadas no testículo de camundongos imunodeprimidos (LI et al., 2006).

Guest et al. (2010) inocularam CTMs e CTEs em diferentes áreas do tendão extensor digital superficial (TEDS), em 8 cavalos puro-sangue. Foram feitas pequenas lesões em três pontos diferentes do TEDS do membro anterior. E as células foram inoculadas com soro autólogo, diretamente no tendão lesionado, guiado por ultrassom. Foram inoculados soro autólogo, CTMs autólogas e alogênicas (GUEST et al., 2010)

Nem as CTMs nem as CTEs manifestaram sinais de resposta celular imunomediada ou formação tumoral. A sobrevivência das CTEs foi maior e foram mantidos níveis constantes durante 90 dias. Tais células estavam presentes em todos os locais da lesão. No entanto, as CTMs demonstraram uma taxa de sobrevivência menor que 5% em 10 dias, e foram observados menores índices ao longo do estudo (GUEST et al., 2010).

As CTEs sobreviveram de forma mais relevante do que as CTMs no tendão lesado, e não induziram resposta imune ou formaram tumor no local da inoculação por 90 dias. As CTEs também mostraram capacidade de migrar para outras áreas da lesão dentro do mesmo tendão, enquanto as CTMs foram observadas somente no local em que foram inoculadas (GUEST et al., 2010).

3. **OBJETIVOS e HIPÓTESES**

Objetivos gerais

- Isolar e cultivar CTEs da MCI obtidas de blastocistos equinos frescos e refrigerados
- Caracterizar o cultivo de células-tronco obtidas de embriões equinos frescos e refrigerados através da expressão dos fatores Oct-4, SSEA-1, SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60, TRA-1-81 e a atividade da fosfatase alcalina.
- Diferenciar as células da MCI nas três camadas germinativas (endoderma, ectoderma e mesoderma).

Objetivos específicos

- Avaliar o cultivo de células da MCI através da análise de seu potencial de adesão e proliferação sobre monocamada de fibroblastos equinos.
- Comparar a utilização de embriões equinos frescos e refrigerados como fonte de células da MCI destinadas ao cultivo *in vitro*.
- Confirmar as linhagens de células da MCI por meio da expressão de genes marcadores de pluripotência (Oct-4, SSEA-1, SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60 e TRA-1-81) e atividade da fosfatase alcalina.
- Diferenciar as células da MCI em cultivo nas três camadas germinativas, endoderma, ectoderma e mesoderma.

Hipóteses

- O potencial de crescimento e diferenciação *in vitro* será semelhante utilizando-se MCI de embriões frescos e refrigerados.
- Obtenção ou sucesso no isolamento da MCI, com formação de colônias de CTEs.
- Obtenção de corpos embrióides na ausência da monocamada e ausência de LIF.

CAPÍTULO I:

ISOLAMENTO E CULTIVO DA MASSA CELULAR INTERNA

1. MATERIAL E MÉTODOS

O presente experimento foi desenvolvido na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP, Campus de Botucatu, Distrito de Rubião Júnior, no Laboratório de Reprodução Avançada e Terapia Celular.

1.1. Obtenção dos embriões

- **Acompanhamento folicular e inseminação artificial**

Para a coleta dos embriões, foram utilizadas 10 éguas, sem raça definida, em bom estado geral de saúde, com idade variando de 5 a 10 anos, pesando entre 300 a 450 Kg e com bom histórico reprodutivo. Estes animais foram mantidos em piquetes livres do Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia- Unesp, Campus de Botucatu, Distrito de Rubião Júnior. As éguas foram alimentadas com feno, capim picado e ração, e água fornecida à vontade.

Para o acompanhamento folicular foram utilizadas palpação retal e ultrassonografia, todos os dias até que o maior folículo (dominante) fosse detectado e acompanhado até atingir 35 mm de diâmetro, quando então era aplicado 1000 UI de hCG, via intravenosa, para acelerar o processo de maturação folicular e oocitária. Após 24 horas da indução com hCG, foi realizada a inseminação artificial, via transvaginal, com 8×10^8 a 1×10^9 espermatozóides viáveis, frescos ou refrigerados por 24 horas em caixas térmicas, modelo Botuflex[®] (Botupharma, Botucatu, SP).

As coletas de sêmen foram realizadas com vagina artificial, modelo Botupharma[®], sendo utilizados somente garanhões férteis. O sêmen foi avaliado macro e microscopicamente, e então adicionado de diluente Botu Sêmen[®] (Botupharma, Botucatu, SP) de acordo com a concentração observada.

A inseminação foi realizada 24 horas após a indução da ovulação, por via transvaginal. Em seguida, foram realizadas palpações retais e exame ultrassonográficos, até o momento da ovulação ser detectado, sendo o dia da ovulação considerado como dia 0.

- **Coleta dos embriões**

Os embriões foram coletados no 8º dia após a ovulação (Figura 1).

As coletas de embrião foram realizadas de forma não cirúrgica transcervical. Após o término da lavagem uterina, foi administrado 1 ml (5mg) por via intramuscular de luteolítico (Lutalyse[®], Dinoprost, Pfizer, São Paulo) para que uma nova onda folicular pudesse ser iniciada e também para impedir uma possível gestação, caso a recuperação embrionária não tivesse ocorrido.

Após a coleta, os embriões foram avaliados em estereomicroscópio, e foram lavados dez vezes, por passagens sucessivas em gotas de meio de manutenção TQC[®] (Holding Plus, Nutricell, Campinas, SP).

- **Embriões frescos**

Foram coletados 26 embriões frescos, os quais foram avaliados e cultivados logo após a recuperação e a remoção da massa celular interna.

- **Embriões refrigerados**

Foram obtidos 14 embriões refrigerados, os quais foram destinados à refrigeração em caixas térmicas, modelo Botuflex[®] (Botupharma, Botucatu, SP) a 15°C, por 24 horas, mantidos em meio de manutenção TQC[®] (Holding Plus, Nutricell, Campinas, SP).

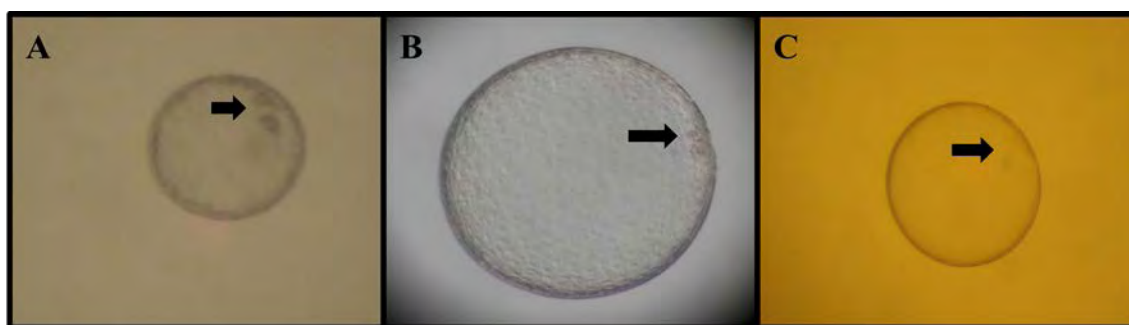


Figura 1: Blastocistos equinos em diferentes fases de desenvolvimento. Setas indicando a MCI dos embriões. A- Blastocisto inicial (Aumento de 10X). B- Blastocisto expandido com 8 dias (Aumento de 40X). C- Blastocisto expandido com 7 dias (Aumento de 20X).

1.2. Preparo da monocamada de sustentação

Foram coletadas amostras com aproximadamente 2 cm² de tecido epitelial de equinos adultos (Figura 2), as quais foram lavadas em HBSS (Gibco, Life

Techonologies), contendo antibiótico e antimicótico. As amostras foram processadas em placas de Petri (de 60mm de diâmetro) contendo meio de cultivo, composto por DMEM alta glicose/ F12 (Gibco, Life Techonologies) 20% de SFB (Gibco, Life Techonologies), 100UI/ml penicilina/ 100µg/ml estreptomicina (Gibco, Technologies), 3µg/ml anfotericina B (Gibco, Life Technologies).

O tecido foi fragmentado em pedaços diminutos (média de 1 mm² cada pedaço) com o auxílio de duas lâminas 11 de bisturi tipo Bard-Paker. Os fragmentos foram lavados duas vezes com HBSS (Gibco, Life Techonologies).

Os fragmentos foram semeados distribuindo a suspensão celular em quatro frascos de cultivo de 25cm² e incubados durante meia hora em estufa a 37°C em atmosfera úmida contendo 95% de ar e 5% de CO₂, para favorecer sua adesão à superfície. Após este tempo foi adicionado cerca de 3 ml de meio fresco em cada frasco. Os frascos foram devidamente identificados, datados e levados à estufa de cultivo com as tampas semi-abertas.

A monitoração do crescimento celular e de sua evolução foi feita a cada 48 horas utilizando-se microscópio de observação direta, para detecção precoce de qualquer anomalia. Após 10 dias foi realizada a primeira troca de meio de cultivo. Uma vez que se iniciou o crescimento celular ao redor dos *explants*, o meio de cultivo foi renovado a cada 3 dias. Quando 70% do fundo da garrafa de cultivo estava coberto por células (subconfluência), esta cultura primária foi sub-cultivada.

Para tanto, as garrafas confluentes passaram por tripsinização: depois de retirado todo meio de cultivo das garrafas, estas foram lavadas com solução de PBS, e adicionadas de 2 ml de Tripsina (Tryple Express®, Gibco, Life Techonologies) à 37° C. As garrafas foram mantidas em estufa a 37°C por 6 minutos, ou até que todas as células se soltassem do fundo.

Foi realizada então, a neutralização com meio de cultivo descrito anteriormente. Uma amostra de 50 µl desta mistura células + meio foi retirada e adicionada a 50 µl do corante Tripan Blue (Gibco, Life Technologies) onde as células azuis que permitiram a passagem do corante foram consideradas mortas e as células translúcidas que não permitiram a passagem do corante foram consideradas vivas. A mistura foi então, destinada ao preenchimento da Câmara de Neubauer para contagem das células translúcidas dos 4 quadrantes mais externos.

O valor encontrado foi colocado na fórmula abaixo:

$$\frac{\text{N}^{\circ}\text{células contadas} \times 2 \text{ (fator de diluição)} \times 10^4}{4 \text{ (quadrantes contados na Câmara)}}$$

4 (quadrantes contados na Câmara)

O resultado obtido foi considerado como a concentração inicial (Ci) e foi colocado na fórmula seguinte para identificar o quanto do volume inicial (Vi) das garrafas deve ser dividido para cada nova garrafa de cultivo celular: $C_i \times V_i = C_f$ (concentração final, 2×10^6) $\times V_f$ (volume final de meio na garrafa).

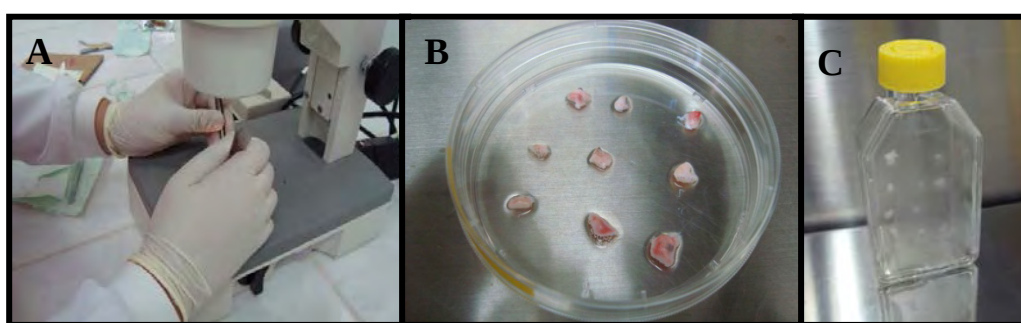


Figura 2: Preparo da monocamada de fibroblastos equinos. A- *Slicing* dos fibroblastos com auxílio de duas lâminas de bisturi, em estereomicroscópio. B- Fragmentos de pele obtidos após *slicing*. C- Fragmentos na garrafa de cultivo.

1.3. Criopreservação dos fibroblastos

Para criopreservação, os fibroblastos após a primeira passagem foram tripsinizados com Tripsina à 37°C por 6 minutos, seguido de bloqueio da enzima com 2 mL de meio de cultivo e contagem do número de células em Câmara de Neubauer. Após centrifugação a 1500 rpm por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspenso lentamente com meio de criopreservação contendo 90% de SFB, 10% de DMSO (Sigma), 100UI/ml penicilina/ 100µg/ml estreptomicina e 3µg/ml anfotericina B.

Posteriormente, a suspensão celular foi distribuída em criotubos e acondicionadas num Freezer -80°C por 24hs, sendo em seguida armazenada em botijão de nitrogênio líquido até a descongelação.

1.4. Inativação da monocamada

Para a produção da monocamada de sustentação, as células foram descongeladas em banho-maria a 37°C. Em seguida, foram submetidas à centrifugação a 1500 rpm por

10 minutos, o sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspensionado lentamente com meio de cultivo descrito anteriormente.

As células foram transferidas para placas de cultivo celular com 24 poços em uma concentração final, de 2×10^6 / mL. Após atingirem uma concentração de 80% de confluência, os fibroblastos presentes nas placas com 24 poços passaram por um processo de inativação, com 10 µg/ml Mitomicina C (Sigma[®]), sendo utilizada uma concentração de 2 µl/poço. Em seguida, as mesmas foram lavadas três vezes com HBSS e foi adicionado novo meio de cultivo descrito anteriormente.

1.5. Isolamento e cultivo da massa celular interna

Logo após a coleta, os embriões foram avaliados em estereomicroscópio e transferidos para uma gota contendo meio de cultivo para CTEs, composto por DMEM alta glicose/F12, (1/1), 20% de SFB, 100UI/ml penicilina, 100 µg/ml estreptomicina, 3 µg/ml anfotericina B, 1% aminoácidos essenciais (Sigma[®]), 1% aminoácidos não essenciais (Sigma[®]), 0,1mM β-Mercaptoetanol (Sigma[®]) e 10ng/ml de LIF (Sigma[®]).

Para o isolamento da MCI os embriões foram cortados sob estereomicroscópio com auxílio de duas agulhas de insulina. Posteriormente, a MCI foi transferida para uma placa de 24 poços, previamente preparada com uma monocamada de fibroblastos equinos, inativados com 10 µl/ml de Mitomicina C, contendo meio para cultivo de CTEs. As placas foram cultivadas em estufa a 38,5°C em atmosfera úmida, com 95% de ar e 5% de CO₂.

As passagens foram realizadas em colônias com aproximadamente 10 dias. Sendo assim, as colônias foram removidas mecanicamente com o auxílio de pipetas de vidro sob estereomicroscópio, onde cada colônia foi dividida em três ou quatro fragmentos e transferida para novos poços, na concentração de dois fragmentos por poço.

As células em seguida, foram transferidas para outra placa de cultivo, previamente preparada sob as mesmas condições descritas anteriormente.

1.6. Análise Estatística

Para análise estatística, o desenvolvimento celular com medidas repetidas no tempo foi analisado através da ANOVA e Regressão Logística utilizando o PROC MIXED e PROC LOGISTIC do SAS (SAS, Inst. Inc., Cary, NC, EUA). Fontes de variação no modelo incluindo tratamento (Fresco vs Refrigerado), tempo (2, 4, 10 e 20

dias), e interação de primeira ordem foram considerados como efeitos fixos. Para estabelecer os contrastes foi utilizado o comando SLICE. Os dados estão apresentados como porcentagem. Para todas as análises foi adotado o nível de significância de 5%.

2. RESULTADOS

2.1. Qualidade e inativação da monocamada

O protocolo de inativação do ciclo celular não impediu o bloqueio da divisão celular bem como o crescimento dos fibroblastos equinos nas placas de 24 wells.

As monocamadas inativadas com o uso de Mitomicina C apresentaram um período curto de aderência e viabilidade celular no cultivo (Figura 3). Os resultados variaram entre os poços e as placas utilizadas nas quais os fibroblastos foram inativados, mesmo tendo sido realizadas sob as mesmas condições. Devido à continuidade da proliferação celular, após um período variável de cultivo a monocamada de fibroblastos começava a se desprender da placa com consequente morte das células. Apesar disso, foi observada a adesão da MCI e o crescimento de colônias semelhantes a colônias de CTEs, com a proliferação das mesmas sob as monocamadas.

Como a monocamada de fibroblastos equinos não estava se mostrando eficaz em manter as células em cultivo, foram testados também fibroblastos bovinos, obtidos de pele de feto, isolados, cultivados e criopreservados sob as mesmas condições dos fibroblastos equinos.

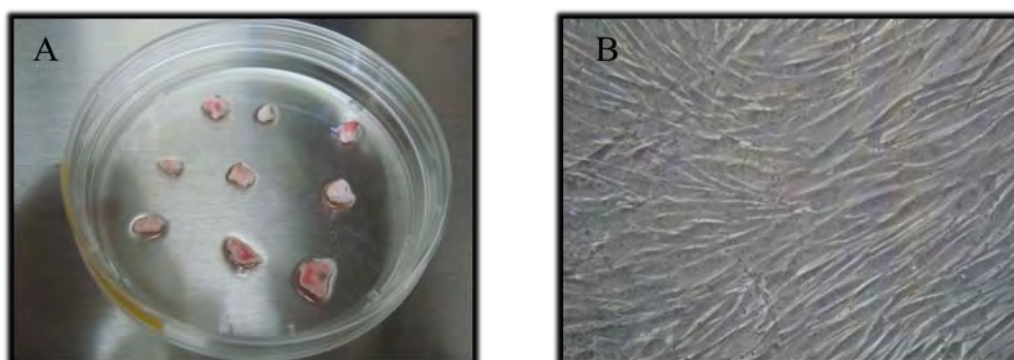


Figura 3: Fragmentos de tecido epitelial de equino. A- *Explants* utilizados para preparo da monocamada. B- Monocamada de fibroblastos equinos confluentes e bloqueados com Mitomicina C após cultivo (Aumento 20X).

2.2. Isolamento da MCI e cultivo primário

Foram utilizados um total de 26 embriões frescos (Grupo 1) e 14 embriões refrigerados (Grupo 2), totalizando 40 embriões (Figura 4).



Figura 4: Isolamento da MCI. A- MCI exposta após isolamento mecânico. Seta preta indicando remanescente do embrião isolado e seta branca indicando a MCI. B- Embrião equino (blastocisto expandido) de 10 dias, após isolamento da MCI. C- Aspecto da MCI sobre a monocamada de fibroblastos bovinos, isolada do blastocisto equino expandido de 10 dias, dois dias após plaqueamento.

Em ambos os Grupos foi observada a formação de uma estrutura cística, semelhante a um corpo embrióide logo após o isolamento da MCI, aparentemente composta por um aglomerado de células da MCI. Esta estrutura se mantinha em suspensão, e após dois dias começava a aderir à monocamada de fibroblastos, formando colônias semelhantes à CTEs.

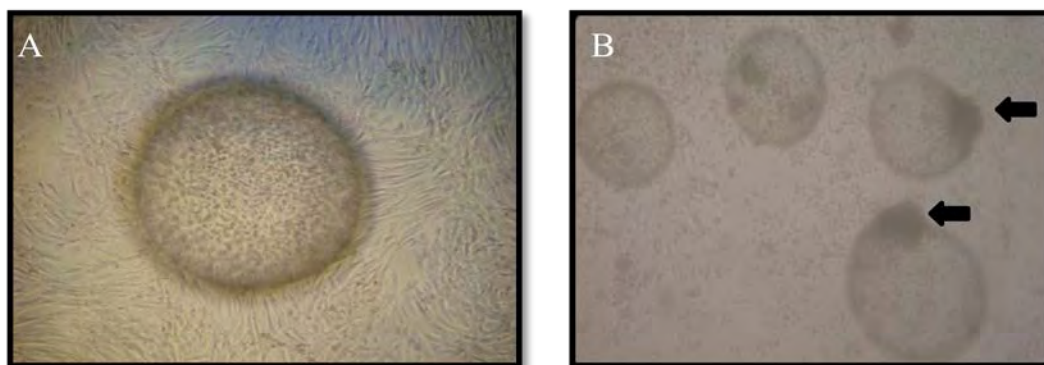


Figura 5: Estruturas formadas após isolamento da MCI. A e B- Dois dias após o cultivo da MCI. Setas indicando o aglomerado de células da MCI. Aumento de 20X.

• Grupo 1: Embriões frescos

No grupo de embriões frescos, somente quatro MCIs não aderiram à placa (Tabela 1), permanecendo em suspensão, sem que ocorresse proliferação celular. Cinco MCIs aderiram parcialmente à monocamada, ou seja, após isolamento da MCI apresentaram crescimento celular, mas não foram capazes de formar colônias (Tabela 1). Todas foram mantidas em cultivo até que apresentassem coloração enegrecida e sinais de morte celular. Das outras 17 MCIs que foram utilizadas, todas aderiram à

monocamada de fibroblastos e formaram colônias semelhantes a colônias de CTEs (Figuras 6 e 7), ou seja, células com aspecto arredondado, colônias com bordas bem definidas e uma alta relação núcleo/citoplasma.

Tabela 1: Comportamento das MCI plaqueadas sobre as monocamadas de fibroblastos inativados após 5 dias de cultivo *in vitro*.

Número de MCI	Adesão	Características do cultivo
4	Não aderiram	Suspenso e morte celular
5	Parcial	Heterogêneo em tamanho, morfologia e multiplicação celular
17	Total	Com características de CTEs e formação de colônias

As colônias de células semelhantes à CTEs foram mantidas em cultivo por 10 dias até a realização da primeira passagem. Em algumas colônias, foi observada a presença de células de crescimento exacerbado, aspecto hexagonal e núcleo grande, indicando uma possível contaminação com células do trofotoderma (Figura 6).

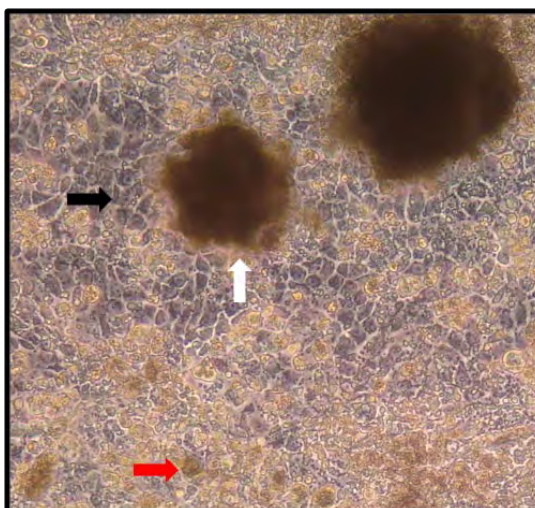


Figura 6: Cultivo contendo células com morfologia anômala de crescimento exacerbado. Seta preta indicando CTEs (colônia). Seta branca indicando MCI que não aderiu à monocamada dois dias após plaqueamento. Seta vermelha indicando células de aspecto heterogêneo, observadas três dias após cultivo, indicando possível contaminação do trofoblasto (Aumento de 40X).

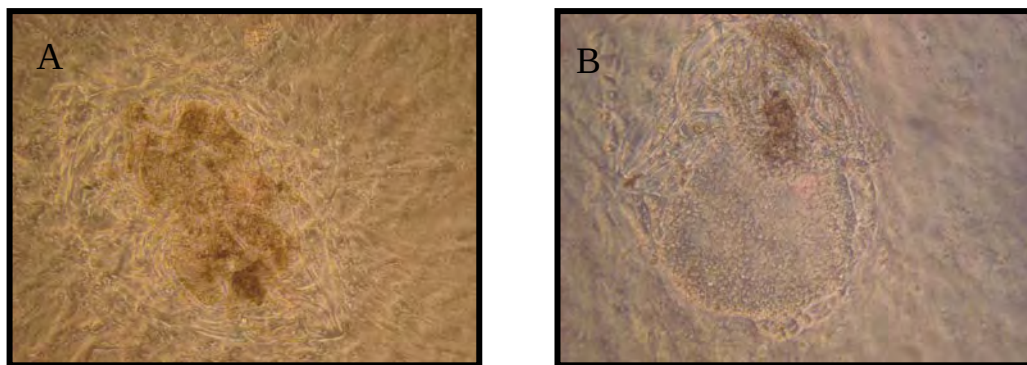


Figura 7: Colônias de CTEs equinas formadas sobre monocamada de fibroblastos bovinos. A e B- Colônia de CTEs equina formada dois dias após plaqueamento da MCI, em diferentes poços e com diferentes aspectos morfológicos (Aumento de 10X).

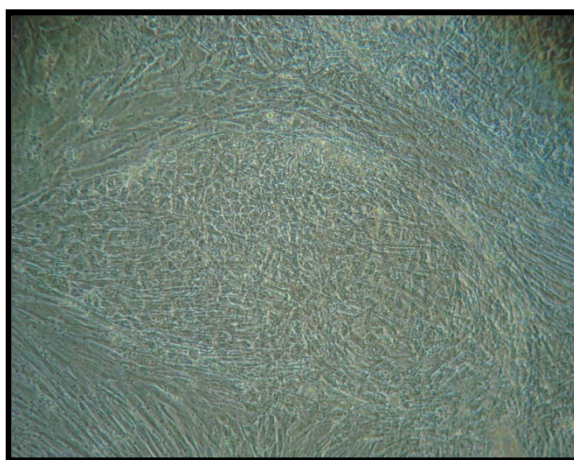


Figura 8: Colônia de CTEs formada quatro dias após cultivo da MCI. Cultivada sobre monocamada de fibroblastos equinos (Aumento de 20X).

- **Grupo 2: Embriões refrigerados**

Todas as MCIs de embriões refrigerados foram capazes de aderir à placa de cultivo (Tabela 2). Duas MCIs aderiram parcialmente à monocamada, ou seja, após isolamento da MCI apresentaram crescimento celular, mas não foram capazes de formar colônias. Todas foram mantidas em cultivo até que apresentassem coloração enegrecida e sinais de morte celular. Das outras 12 MCIs que foram utilizadas, todas aderiram à monocamada de fibroblastos e formaram colônias semelhantes a colônias de CTEs (Tabela 2), ou seja, células com aspecto arredondado, colônias com bordas bem definidas e uma alta relação núcleo/citoplasma (Figuras 8, 9 e 10).

Tabela 2: Comportamento das MCI plaqueadas sobre as monocamadas de fibroblastos inativados após 5 dias de cultivo *in vitro*.

Número de MCI	Adesão	Características do cultivo
0	Não aderiram	Suspenso e morte celular
2	Parcial	Heterogêneo em tamanho, morfologia e multiplicação celular
12	Total	Com características de CTEs e formação de colônias

O tempo de cultivo até a realização da primeira passagem foi de 10 dias. Também neste caso, em algumas colônias, foi observada a presença de células de crescimento exacerbado e morfologicamente diferentes das CTEs, indicando possível contaminação de outros tipos celulares, como células do trofoblasto.

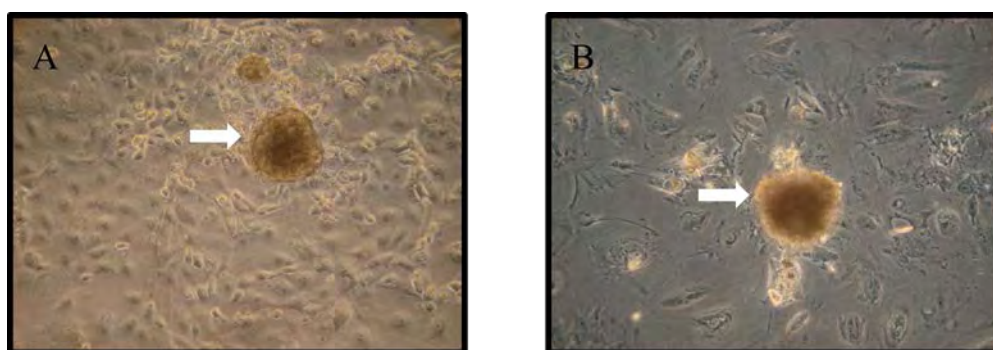


Figura 9: MCIs isoladas de embriões equinos refrigerados, apresentando crescimento celular três dias após plaqueamento. Setas indicando as MCIs. A- MCI sobre a monocamada de fibroblastos bovinos, com algumas células em crescimento ao redor (Aumento de 10X). B- MCI ainda em suspensão na monocamada de fibroblastos bovinos (Aumento de 10X).

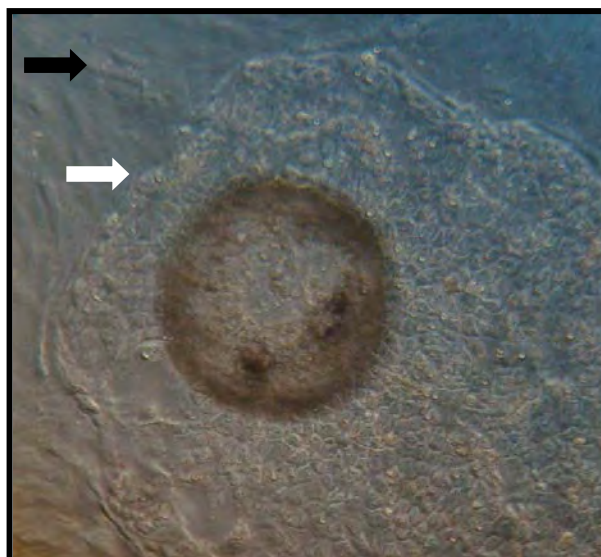


Figura 10: Colônia de CTEs formada quatro dias após cultivo, sobre monocamada de fibroblasto bovino. Seta preta indicando fibroblastos; seta branca indicando a borda da colônia (Aumento de 40X).



Figura 11: Colônias de CTEs formadas sobre monocamada de fibroblastos bovinos. A- 9 dias após o cultivo (Aumento de 20X). B- 5 dias após o cultivo. (Aumento de 10X).

2.3. Realização de passagens através do cultivo primário

As colônias de células semelhantes à CTEs se mantiveram em cultivo por aproximadamente 10 dias, quando então foi realizada a passagem mecânica, com auxílio de lâminas de bisturi e pipetas de vidro estéreis, sob visualização de estereomicroscópio. No Grupo de embriões frescos somente 5 colônias foram submetidas à passagem mecânica (Figuras 12 e 13). Após o repique celular, as colônias apresentaram crescimento, manutenção e multiplicação adequados durante o cultivo, porém devido ao desprendimento dos fibroblastos das placas não foi possível que fossem realizadas um maior número de repiques celulares.

Já no Grupo dos embriões refrigerados, foram realizadas duas passagens mecânicas na mesma colônia de CTEs (Figura 14). Em ambas, as CTEs se mantiveram com tamanho, morfologia e coloração adequadas. Além disso, foram realizadas uma passagem com outras 2 colônias de CTEs (Figura 14).

Tabela 3- Resultados do desenvolvimento do cultivo da MCI nos diferentes grupos, avaliados segundo: adesão, cultivo primário e repiques celular.

Grupo	Cultivo primário (2d)	Cultivo Primário (4d)	1ª Passagem (10d)	2ª Passagem (20d)
1 (fresco)	73,1% (19/26) ^a	65,4% (17/26) ^a	19,2% (5/26) ^b	0% (0/26) ^c
2 (refrigerado)	85,7% (12/14) ^A	85,7% (12/14) ^A	21,4% (3/14) ^B	7,1% (1/14) ^B
Total	31/40	29/40	8/40	1/26

^{abc} Letras sobrescritas incomuns na mesma linha diferem ($P < 0,05$); ^{AB} Letras sobrescritas incomuns na mesma linha diferem ($P < 0,05$); Não houve diferença entre os grupos ao longo do tempo ($P = 0,98$).

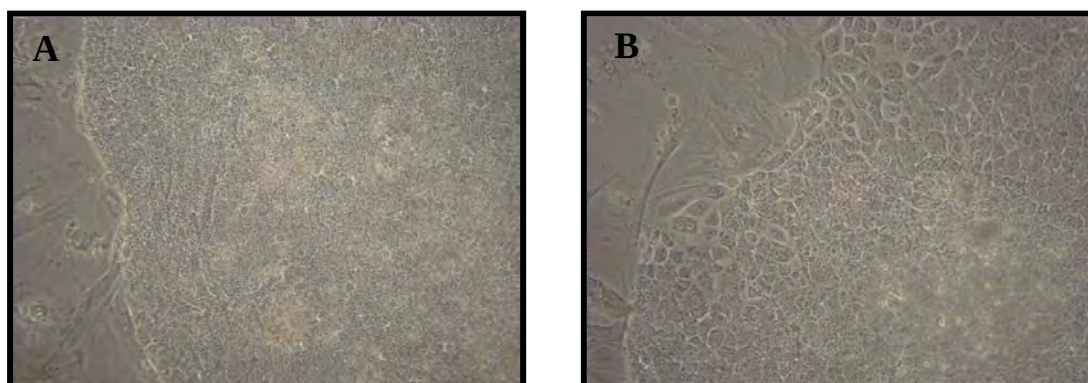


Figura 12: Colônias de CTEs antes da realização da passagem mecânica, formadas sobre monocamada de fibroblastos equinos 10 dias após o cultivo (Grupo 1). A- Aumento de 10X. B- Aumento de 20X.

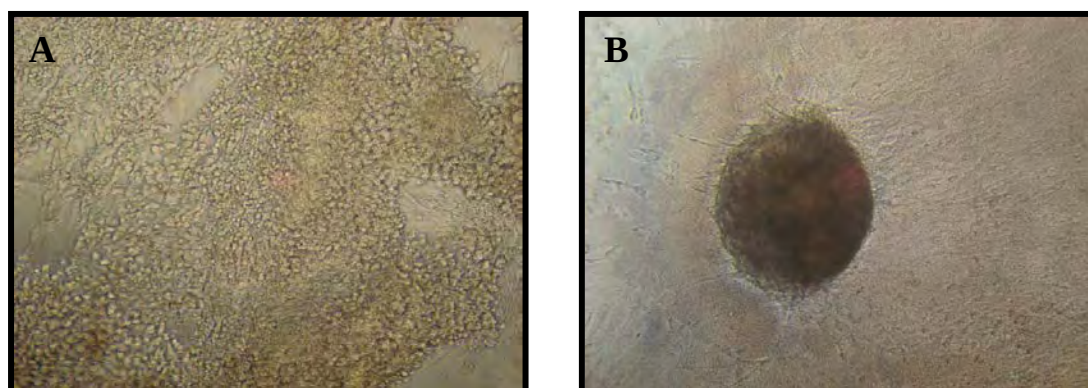


Figura 13: Colônias de CTEs após a realização da passagem mecânica, formadas sobre monocamada de fibroblastos equinos 3 dias após o repique celular (Grupo 1). A e B- Aumento de 20X.

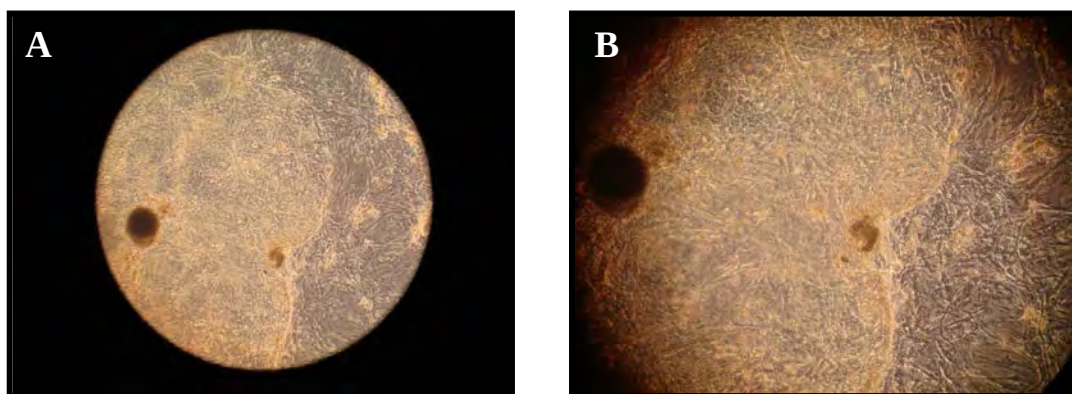


Figura 14: Colônias de CTEs antes da realização da passagem mecânica, formadas sobre monocamada de fibroblastos equinos 10 dias após o cultivo (Grupo 2). A- Aumento de 10X. B- Aumento de 20X.

3. DISCUSSÃO

A obtenção de uma nova linhagem de CTEs equinas apresenta diversos obstáculos, principalmente relativos à obtenção dos embriões equinos, tendo em vista que a espécie em questão é considerada monovulatória sazonal, apresentando ciclicidade somente em períodos de maior luminosidade. Apesar dessa desvantagem, foram utilizadas um total de 40 MCIs obtidas de blastocistos equinos, isoladas de forma mecânica.

O primeiro protocolo de CTEs humanas foi descrito por Thomson et al. (1998), onde a camada externa do trofoblasto foi removida do blastocisto por meio de imunocirurgia, e as células da MCI posteriormente cultivadas em MEF, no entanto no presente estudo, a camada do trofoblasto do blastocisto equino foi removida mecanicamente, e as células da MCI posteriormente cultivadas em monocamada de fibroblastos equinos.

No entanto, o isolamento mecânico da MCI apresenta vantagens, pelo fato de não utilizar produtos de origem animal, e também por permanecer pouco tempo exposto ao ambiente. Sendo assim, este protocolo é adequado principalmente, para o cultivo das CTEs humanas que precisam estar livres de produtos de origem animal para sua futura aplicação em programas de terapia celular, como mencionado por Stojikovic et al. (2004).

A utilização da monocamada de fibroblastos apresenta diversas vantagens, pois segundo Pedersen (2002), Wang et al. (2005) e Améen et al. (2008), a *feeder* além de contribuir com vários fatores essenciais para a manutenção e auto-renovação das CTEs,

os fibroblastos secretam fatores que promovem a manutenção do estado indiferenciado, como FGF e TGF β , dentre outros fatores.

A qualidade da monocamada de sustentação é outro fator que deve ser levado em consideração, pois as CTEs sabidamente precisam aderir a uma matriz extracelular para manutenção e sobrevivência. Assim como relatado por Nieto et al. (2007), uma parte dos fibroblastos, apesar de inativados, permanecem ativos, mantendo sua proliferação quando em cultivo, o que pode dificultar a sobrevivência das CTEs. Como observado neste experimento, o qual apresentou grande dificuldade de manutenção das CTEs, devido principalmente à contínua propagação dos fibroblastos.

Ainda em relação à inativação da monocamada, neste estudo foi utilizada a Mitomicina C como fator inibidor, numa concentração de 10 μ g/ml, durante 24 horas. O tempo utilizado para inativação pode ter sido prejudicial às células, pois segundo Nieto et al. (2007), o tempo de duas horas e meia seria considerado suficiente para inativar o crescimento dos fibroblastos. Entretanto, mesmo utilizando esse tempo, Nieto *et al.* (2007) observaram que uma pequena quantidade de células permanece ativa, sem deixar de manter as CTEs num estado pluripotente indiferenciado.

No presente trabalho a inativação da monocamada de fibroblastos foi realizada quando esta se encontrava com uma confluência de 80%. A realização da inativação com uma concentração celular mais baixa poderia resultar em um protocolo mais eficiente. Entretanto, experimentos prévios realizados em nosso laboratório mostraram que a inativação de monocamadas de fibroblastos bovinos com 60% de confluência resulta em indução da morte celular e descolamento da monocamada (Guastali et al., dados não publicados)

Nosso trabalho realizou passagens mecânicas através do método de microdissecção manual, para expansão das CTEs, o qual segundo Améen et al. 2008, apresenta como principais vantagens a ausência da utilização de enzimas de dissociação celular e ainda, a seleção da colônia a cada passagem, isolando CTEs indiferenciadas ao invés das células mais diferenciadas. Além disso, de acordo com os mesmos autores, a utilização de enzimas para a passagem das CTEs aumenta o risco de introduzir aberrações cromossômicas durante o cultivo *in vitro*.

A presença de algumas células com morfologia anômala e aspecto heterogêneo no cultivo, pode ser justificada pelo método de isolamento da MCI utilizado, uma vez que o isolamento mecânico não permite a separação total das células do trofoblasto.

Sendo assim, a contaminação de células do trofoblasto e também do endoderma visceral (hipoblasto) segundo Muñoz et al. (2008) ocorre com frequência nos cultivos de CTEs.

De acordo com Eskin et al. (2002) a característica que melhor diferencia as CTEs de outros tipos celulares é a presença de um núcleo evidente, o qual pode conter de um a dois nucléolos circundados por um citoplasma agranular. Sendo assim, as colônias de CTEs se caracterizaram por apresentar colônias de espessuras firmes, com bordas bem definidas, compostas por células pequenas de aspecto arredondado, tamanho uniforme, apresentando um núcleo evidente, contendo de um a dois nucléolos.

Tais características morfológicas são similares às descritas por Li et al. (2006), que afirmam que as CTEs humanas e equinas, formam colônias de espessura fina e bordas bem definidas, se distinguindo das colônias de CTEs murinas, que caracterizam-se por possuir colônias espessas com células sobrepostas e bordas não definidas.

Além disso, segundo Améen et al. (2008) as colônias de CTEs humanas pluripotentes além de serem pequenas, densamente comprimidas, apresentam uma morfologia típica com uma alta relação núcleo/citoplasma e um nucléolo grande, podem perder sua borda firme e as células no interior da colônia podem começar a expandir, alongar, separar ou empilhar e se tornarem espessas e opacas.

Apesar de existir pouca informação sobre CTEs equinas, alguns trabalhos já foram realizados (SAITO et al. 2002; LI et al. 2006; GUEST & ALLEN, 2007; GUEST et al. 2010), utilizando embriões equinos frescos e congelados em diferentes estágios de desenvolvimento, no entanto nenhum deles utilizou embriões equinos refrigerados, não permitindo a comparação destes embriões com os demais (frescos e congelados), como feito nesse trabalho.

A maioria dos estudos do cultivo das CTEs baseia-se em CTEs de camundongos e humanos, no entanto, existe pouca informação em relação às CTEs de espécies domésticas, assim como a de equinos. Em relação à manutenção do estado indiferenciado das CTEs, alguns fatores são necessários e indispensáveis, como o LIF, o qual foi utilizado neste trabalho para manter as CTEs equinas num estado indiferenciado, e que comumente mantêm CTEs de camundongo sem que ocorra a diferenciação, pois segundo Garfield (2010), as CTEs murinas são capazes de se manter indiferenciadas com adição de LIF, na ausência de células da MEF.

Porém de acordo com Hoffman & Carpenter (2005) tal citocina não é suficiente para manter CTEs humanas pluripotentes indiferenciadas, na ausência de MEF. No entanto, segundo Sato et al. (2004) acredita-se que há uma baixa ativação da via STAT3

nestas células, ou ainda, de acordo com Richards et al. (2004) pode existir ausência ou baixo nível de expressão dos componentes da via de ativação do LIF.

4. CONCLUSÃO

Células obtidas da massa celular interna de blastocistos equinos quando cultivadas sobre monocamada de fibroblastos equinos e bovinos, foram capazes de formar colônias semelhantes à CTEs, ou seja, colônias de espessura fina, com bordas bem definidas, contendo células de aspecto arredondado, apresentando núcleos evidentes.

No entanto, o protocolo de inativação da monocamada por meio do uso da Mitomicina C não impediu o bloqueio do ciclo celular dos fibroblastos, os quais continuaram crescendo, impedindo assim a contínua propagação das colônias semelhantes à CTEs.

Não foi encontrada diferença estatística entre os Grupos, ao longo do tempo, porém houve diferença em relação à adesão, cultivo primário e repiques celulares nos grupos de embriões frescos e refrigerados.

CAPÍTULO II

CARACTERIZAÇÃO DO CULTIVO DAS CTEs

1. MATERIAL E MÉTODOS

As CTEs equinas utilizadas foram obtidas no experimento anterior, a partir do isolamento da MCI por separação mecânica, cultivadas sobre monocamada de fibroblastos equinos e bovinos.

1.1. Caracterização das CTEs

As imunofluorescências foram realizadas em colônias de células semelhantes às CTEs.

Para a avaliação dos marcadores de pluripotência por imunofluorescência, as colônias de CTEs foram cultivadas em placas de cultivo de 24 wells e marcadas com os

anticorpos monoclonais do kit de marcação de CTEs da Chemicon[®] (Milipore, SCR 002): Oct-4, SSEA-1, SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60 e TRA-1-81,

Para isso, as células foram fixadas com paraformaldeído a 4% (BD) por 30 minutos, lavadas 2 vezes com PBS e permeabilizadas com Triton X-100 a 0,1% (Sigma) por 10 minutos, quando utilizado o anticorpo Oct-4. Posteriormente, as células foram lavadas 2 vezes com PBS e bloqueadas por 30 minutos com BSA a 5%, para evitar ligações inespecíficas.

A etapa seguinte consistiu na incubação com o anticorpo primário por 18h (*overnight*) a 38,5°C em atmosfera úmida, com 5% de CO₂ em ar. Após novas lavagens com PBS, procedeu-se a incubação com o anticorpo secundário conjugado com o fluoróforo a 38,5°C por 1 hora. Para o anticorpo primário SSEA-3 foi empregado o fluoróforo FITC (1:30; Milipore) e para os demais anticorpos secundários o Alexa Fluor 555 (1:100; Invitrogen). O núcleo foi contra-corado com DAPI (Invitrogen).

Para a imunofluorescência dos corpos embrióides, foram adotadas as mesmas condições, sendo os corpos embrióides mantidos em paraformaldeído a 4% até o momento da realização da imunofluorescência.

A imunofluorescência foi visualizada em microscópio de epifluorescência invertido (Leica, Alemanha).

Os controles negativos não apresentaram marcação.

2. RESULTADOS

2.1. Caracterização das CTEs obtidas de embriões frescos

As CTEs obtidas de embriões equinos frescos foram marcadas com os seguintes anticorpos: Oct-4, SSEA-1, SSEA-4, TRA-1-60 e TRA-1-81.

- **Imunomarcação do anticorpo Oct-4**

Foram utilizadas duas colônias de CTEs para a marcação do anticorpo Oct-4, com 4 e 7 dias de desenvolvimento (Figura 15).

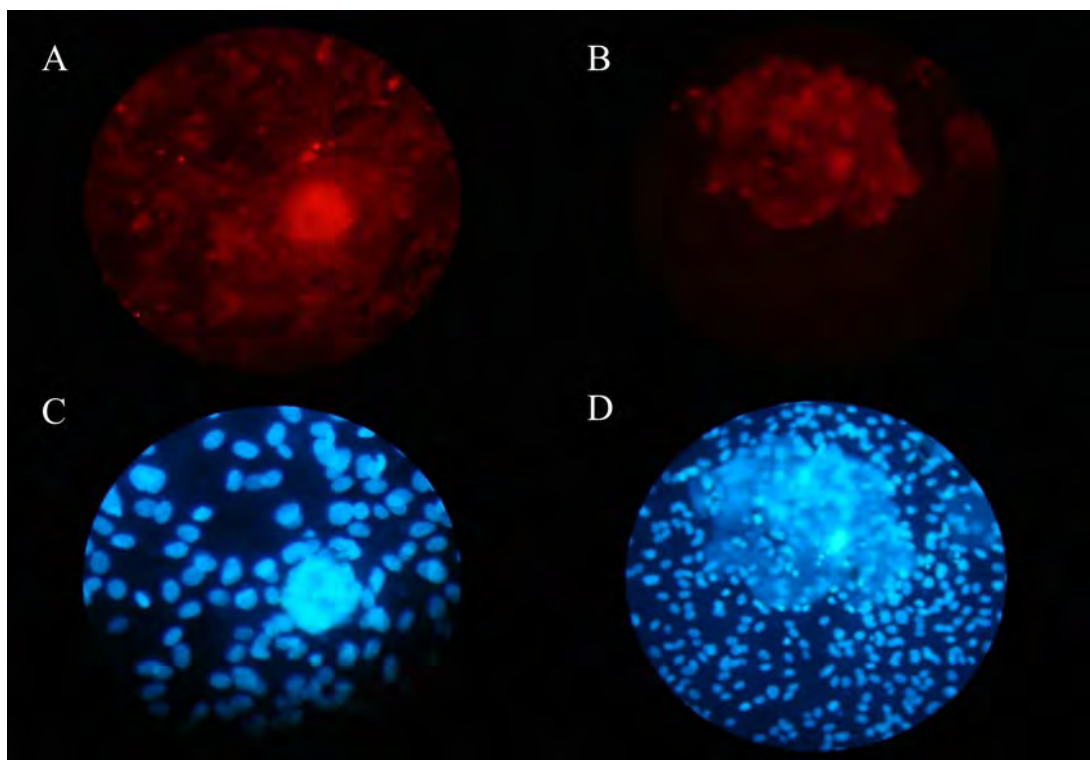


Figura 15: Imunomarcacão das colônias de CTEs equinas obtidas de embriões frescos, apresentando marcao positiva para Oct-4. A- Aumento de 10 X e B- Aumento de 20X. C e D: Contra- colorao dos núcleos das CTEs com DAPI. C- Aumento de 10 X e D- Aumento de 20X. Todas as fotos foram obtidas em microscópio invertido de epifluorescência.

- **Imunomarcacão dos anticorpos SSEA-1 e SSEA-4**

Foram utilizadas duas colônias de CTEs para a marcao dos anticorpos SSEA-1 e SSEA-4, com 8 e 7 dias de desenvolvimento, respectivamente (Figura 16).

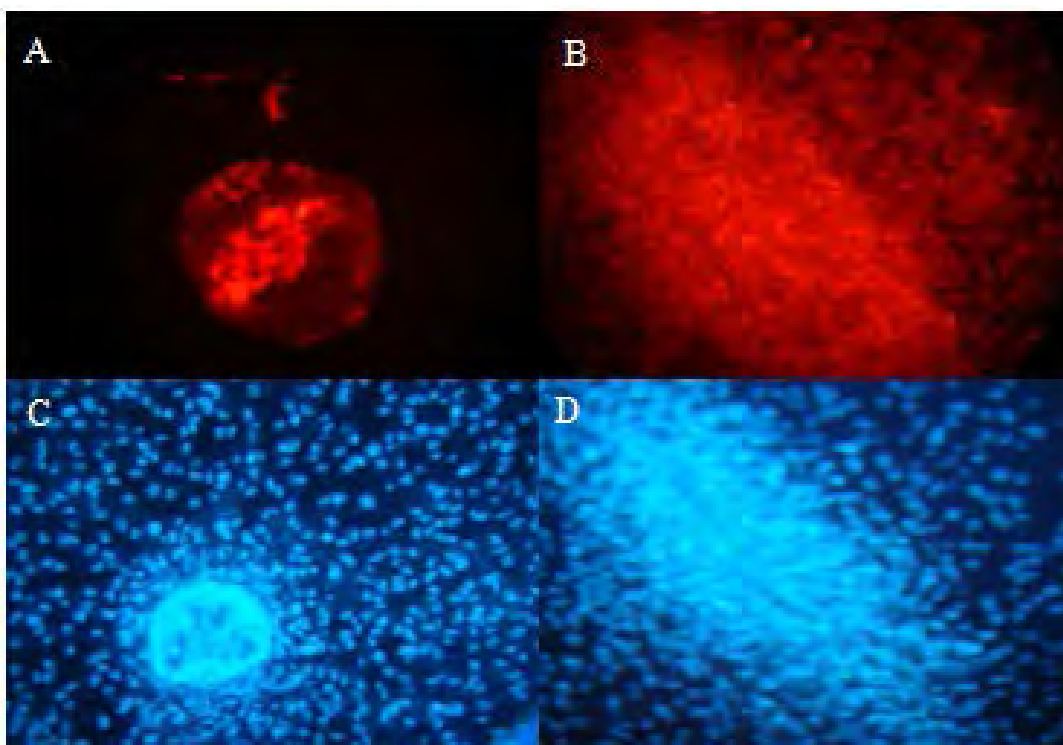


Figura 16: Imunomarcacão das colônias de CTEs equinas obtidas de embriões frescos, apresentando marcao positiva para SSEA-1 (A) e SSEA-4 (B). A- Aumento de 10 X e B- Aumento de 20X. C e D: Contra- colorao dos núcleos das CTEs com DAPI. C- Aumento de 10 X e D- Aumento de 20X. Todas as fotos foram obtidas em microscópio invertido de epifluorescência.

- **Imunomarcacão dos anticorpos TRA-1-60 e TRA-1-81**

Foram utilizadas duas colônias de CTEs para a marcao dos anticorpos TRA-1-60 e TRA-1-81, ambas com 4 dias de desenvolvimento (Figura 17).

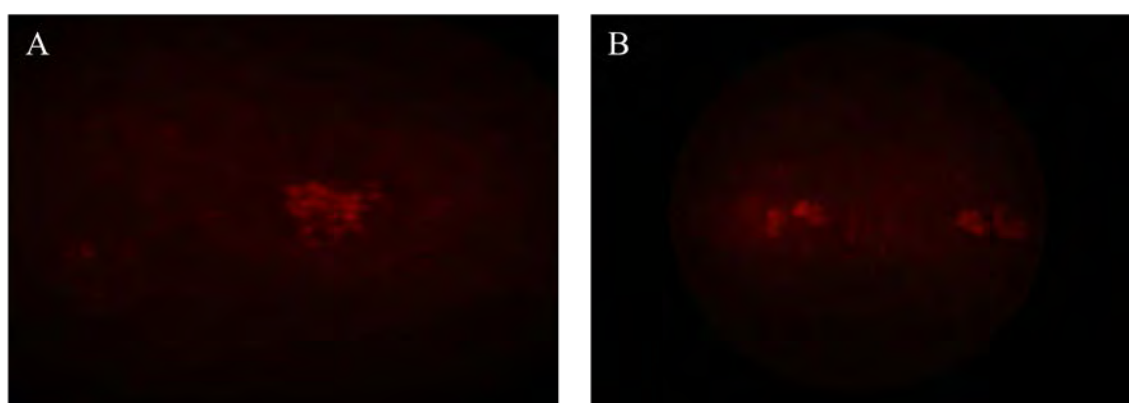


Figura 17: Imunomarcacão das colônias de CTEs equinas obtidas de embriões frescos, apresentando marcao positiva para TRA-1-60 (A) e TRA-1-81 (B). A e B-Aumento de 10X. Todas as fotos foram obtidas em microscópio invertido de epifluorescência.

A marcação destes dois anticorpos se mostrou menos intensa do que os demais. Além disso, as marcações dos anticorpos nos corpos embrióides se mostrou ainda menos intensa do que nas colônias de CTEs (fotos não inseridas).

2.2. Caracterização das CTEs obtidas de embriões refrigerados

As CTEs obtidas de embriões equinos refrigerados foram marcadas com os seguintes anticorpos: Oct-4, SSEA-1, SSEA-3 e SSEA-4.

- **Imunomarcação dos anticorpos Oct-4 e SSEA-4**

Foram utilizadas duas colônias de CTEs para a marcação dos anticorpos Oct-4 e SSEA-4, ambas com 8 dias de desenvolvimento (Figura 18).

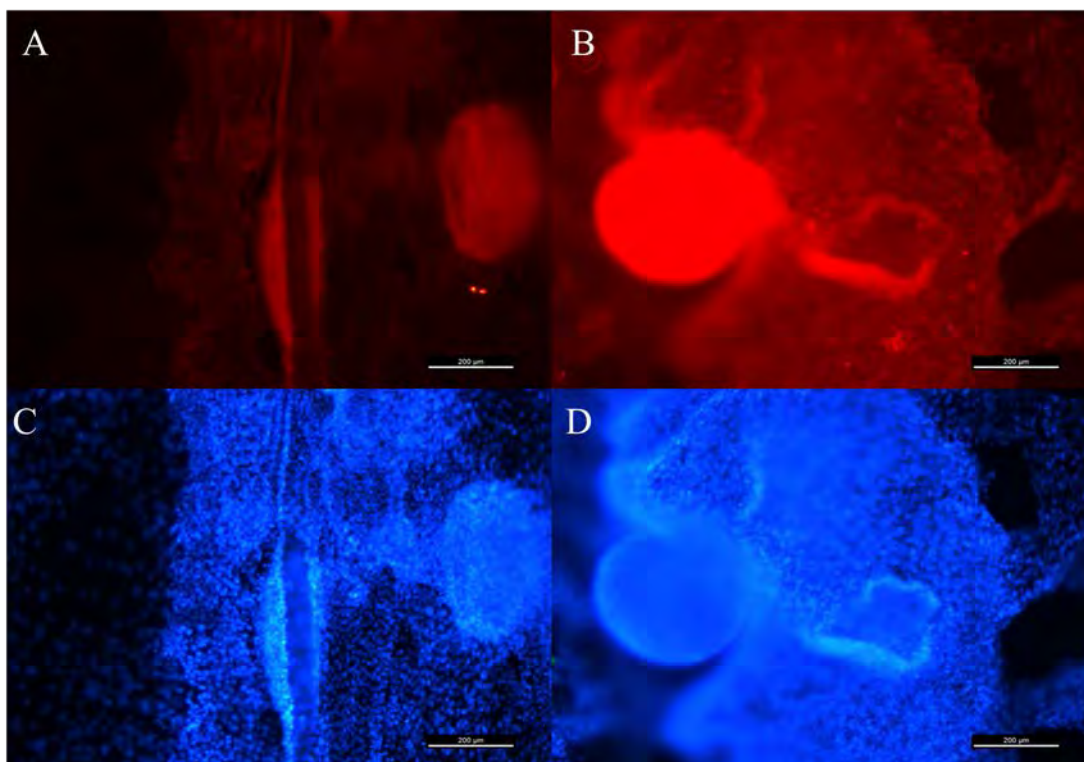


Figura 18: Imunomarcação das colônias de CTEs equinas obtidas de embriões refrigerados, apresentando marcação positiva para Oct-4 (A) e SSEA-4 (B). C e D- Contra-coloração dos núcleos das CTEs com DAPI. Todas as fotos foram obtidas em microscópio invertido de epifluorescência. Aumento de 10X.

- **Imunomarcação dos anticorpos SSEA-1 e SSEA-3**

Foram utilizadas duas colônias de CTEs para a marcação dos anticorpos SSEA-1 e SSEA-3, ambas com 8 dias de desenvolvimento (Figura 19).

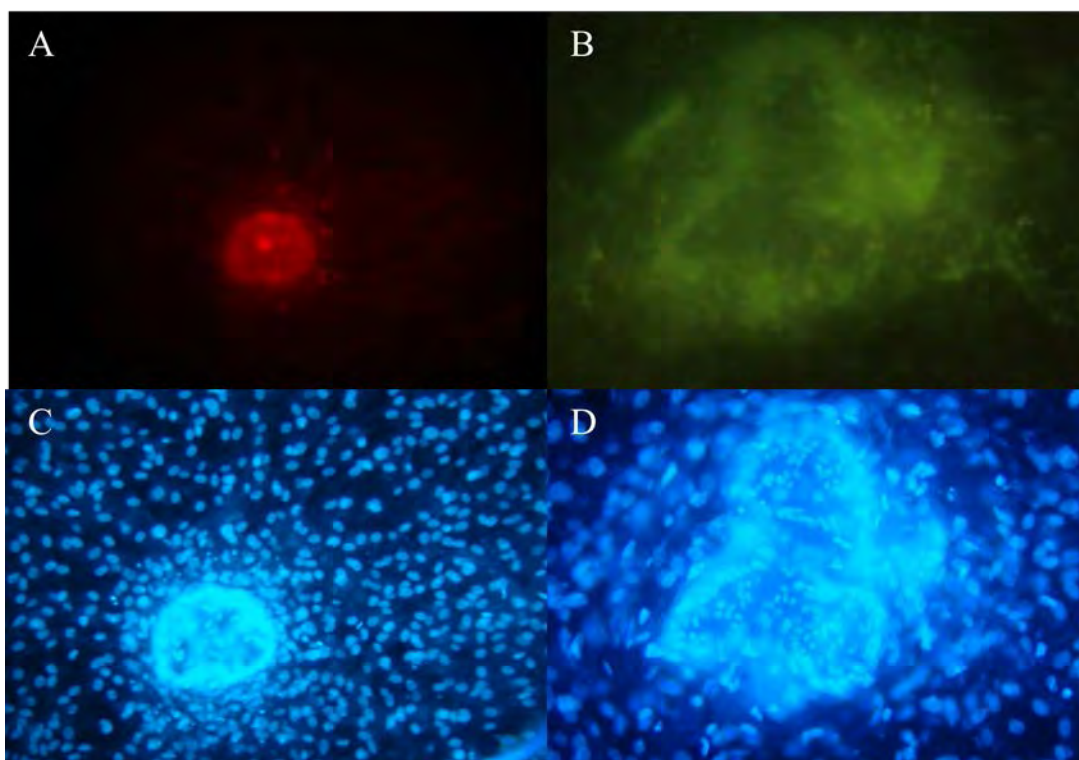


Figura 19: Imunomarcção das colônias de CTEs equinas obtidas de embriões refrigerados, apresentando marcação positiva para SSEA-1 (A) e SSEA-3 (B). A- Aumento de 10 X e B- Aumento de 20X. C e D- Contra-coloração dos núcleos das CTEs com DAPI. Todas as fotos foram obtidas em microscópio invertido de epifluorescência. C e D- Aumento de 20X.

3. DISCUSSÃO

O estudo da biologia celular envolve alguns desafios, relacionados ao desenvolvimento embrionário inicial e a obtenção de células-tronco obtidas de embriões. Os principais desafios são a manutenção das CTEs num estado indiferenciado, o cultivo por tempo prolongado, a expressão de anticorpos marcadores de pluripotência e a diferenciação em diferentes linhagens *in vitro*. As células da massa celular interna equinas descritas aqui satisfazem a alguns critérios necessários para se caracterizar uma célula-tronco embrionária. Além de manter as CTEs indiferenciadas, com a utilização de LIF, outros critérios foram atingidos como a marcação das células com anticorpos específicos para CTEs. No entanto, existem diferenças entre as espécies em relação à expressão desses marcadores.

Segundo Donovan & Gearhart (2001), as CTEs devem apresentar algumas características que as classifiquem como células indiferenciadas, como a atividade da fosfatase alcalina, a marcação do fator de transcrição Oct-4, atividade da telomerase e a

expressão de diversos marcadores celulares, reconhecidos por anticorpos. No entanto, no presente estudo realizamos somente a expressão de marcadores de pluripotência.

Ainda de acordo com os mesmo autores, o perfil genético das CTEs apresenta dados controversos, apesar de muitos genes terem sido identificados nas células, somente alguns são aceitos pela comunidade científica. Dentre estes marcadores, os mais fidedignos são o Oct-4, Nanog, fosfatase alcalina, SSEA-3 e SSEA-4, TRA-1-60 e TRA-1-81.

Dentre estes marcadores, as CTEs equinas descritas neste trabalho expressaram Oct-4, tanto nas células obtidas de embriões frescos quanto nas obtidas de embriões refrigerados, não havendo diferença na expressão deste gene nas CTEs equinas.

No presente estudo, os embriões equinos foram isolados no intuito de se obter células semelhantes à CTEs. Tais células foram submetidas à imunomarcação com anticorpos característicos de pluripotência. No entanto, apesar do Oct-4 ser considerado um marcador de pluripotência, segundo Cauffman et al. (2005), blastocistos humanos em diferentes estágios de desenvolvimento podem apresentar diferentes níveis de expressão de Oct-4, o qual tem sido encontrado também em células diferenciadas, como as células do trofoblasto. No entanto de acordo com Zago & Covas (2006), o Oct-4 está presente somente em células da MCI do blastocisto e do epiblasto em camundongos, porém, de acordo com estes autores somente as CTEs podem expressar o Oct-4.

A expressão de Oct-4 em CTEs equinas também já foi descrita por outros autores, como Saito et al. (2002), Li et al. (2006) e Guest & Allen (2007). Estes últimos demonstraram expressão do Oct-4 tanto nas CTEs quanto na MCI de blastocistos equinos, havendo pouca marcação no trofoblasto.

Outro gene importante para a caracterização de CTEs humanas e murinas é o Nanog, o qual não foi avaliado no presente estudo, mas segundo Zago & Covas (2006) está relacionado com o estado indiferenciado e pluripotência, e de acordo com Chambers et al. (2003) além de não estar relacionado com o Oct-4, ele previne as células de se diferenciarem em endoderme extraembrionária.

De acordo com Améen et al. (2008), os marcadores de superfície celular característicos de CTEs humanas indiferenciadas são os glicolipídeos SSEA-3 e SSEA-4, as glicoproteínas TRA-1-60 e TRA-1-81 e o GCTM-2. Já o SSEA-1 não é encontrado nas CTEs humanas, sendo encontrado somente nas CTEs murinas. As CTEs equinas descritas aqui expressaram o SSEA-1 e SSEA-4 tanto nas células obtidas de embriões frescos quanto de embriões refrigerados, o que não foi observado por Guest & Allen

(2007), os quais não observaram marcação positiva do oligossacarídeo SSEA-1 nas CTEs equinas.

No estudo feito por Guest & Allen (2007), em que as CTEs foram marcadas através de imunocitoquímica e imunofluorescência, os marcadores SSEA-1, SSEA-4, TRA-1-60 e TRA-1-81 foram observados no citoplasma das células, enquanto o Oct-4 foi observado no núcleo das CTEs. Como demonstrado aqui, as CTEs equinas foram capazes de expressar todos estes marcadores, incluindo o SSEA-1, no entanto, as marcações das glicoproteínas TRA-1-60 e TRA-1-81 foram observadas com menos intensidade nas CTEs.

4. CONCLUSÃO

O protocolo de imunofluorescência adotado se mostrou eficaz, uma vez que as CTEs equinas quando marcadas com os anticorpos de pluripotência Oct-4, SSEA-1 e SSEA-4, expressaram os respectivos marcadores nas CTEs obtidas de embriões equinos frescos. Já os marcadores TRA-1-60 e TRA-1-81 foram expressos com menos intensidade nas CTEs obtidas de embriões equinos frescos.

Já as CTEs obtidas de embriões equinos refrigerados quando marcadas com os anticorpos de pluripotência Oct-4, SSEA-1, SSEA-3 e SSEA-4, expressaram os respectivos marcadores.

REFERÊNCIAS

ALLEGRUCCI, C.; YOUNG L.E. Differences between human embryonic stem cell lines. **Human Reproduction Update**, vol.13, p.103–120, 2007.

AMÉEN, C.; STREHL, R.; BJÖRQUIST, P.; LINDAHL, A.; HYLLNER, J.; SARTIPY, P. Human embryonic stem cells: current technologies and emerging industrial applications. **Critical reviews in Oncology/Hematology**, vol.65, p.54-80, 2008.

AMIT, M.; ITSKOVITZ-ELDOR, J. Derivation and spontaneous differentiation of human embryonic stem cells. **Journal of Anatomy**, vol.200, p.225-232, 2002.

AMIT, M.; MARGULETS, V.; SEGEV, H.; SHARIKI, K.; LAEVSKY, I.; COLEMAN, R.; ITSKOVITZ-ELDOR, J. Human feeder layers for human embryonic stem cells. **Biology of Reproduction**, vol.68, p.2150–2156, 2003.

ASSADY, S.; MAOR, G.; AMIT, M.; ITSKOVITZ-ELDOR, J.; SKORECKI, K.L.; TZUKERMAN, M. Insulin production by human embryonic stem cells. **Diabetes**, vol. 50, p.1691–1697, 2001.

BAUTCH, V.L.; STANFORD, W.L.; RAPOPORT, R.; RUSSELL, S.; BYRUM, R.S.; FUTCH, T.A. Blood island formation in attached cultures of murine embryonic stem cells. **Dev. Dyn.**, vol.205, p.1-12, 1996.

BOEUF, H.; HAUSS, C.; DE GRAEVE, F.; BARAN, N.; KEDINGER, C. Leukemia Inhibitory Factor–dependent Transcriptional Activation in Embryonic Stem Cells. **JCB**, vol.138, p.1207-1217, 1997.

CAUFFMAN, G.; VAN DE VELDE, H.; LIEBAERS, I.; VAN STEIRTEGHEM, A. Oct-4 mRNA and protein expression during human preimplantation development. **Molecular Human Reproduction**, vol.11, p.173-181, 2005.

CHAMBERS, I.; COLBY, D.; ROBERTSON, M.; NICHOLS, J.; LEE, S.; TWEEDIE, S.; SMITH, A. Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. **Cell**, vol.30, p.643-655, 2003.

CONLEY, B. J.; YOUNG, J. C.; TROUNSON, A. O.; MOLLARD, R. Derivation, propagation and differentiation of human embryonic stem cells. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, vol. 36, p.555–567, 2004.

COWAN, CA; KLIMANSKAYA, I; MCMAHON, J; ATIENZA, J; WITMYER, J; ZUCKER, JP; WANG, SP; MORTON, CC; MCMAHON, AP; POWERS, D; MELTON, D.A. Derivation of embryonic stem-cell lines from human blastocysts. **The New England Journal of Medicine**, vol.350, p.1353-1356, 2004.

CRISTOFALO V J; ALLEN R G; PIGNOLO R J; MARTIN B G; BECK J C. Relationship between donor age and the replicative lifespan of human cells in culture: a reevaluation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA** , vol. 95, p.10614-9, 1998.

DARR, H.; MAYSHAR, Y.; BENVENISTY, N. Overexpression of Nanog in human ES cells enables feeder-free growth while inducing primitive ectoderm features. **Development**, vol.133, p.1193-1201, 2006.

DONOVAN J.P., GEARHART J. The end of the beginning for pluripotent stem cells. **Nature**, vol.414, p.399-405, 2001.

DRAPER, J.S.; PIGOTT, C.; THOMSON, J A.; ANDREWS, P.W. Surface antigens of human embryonic stem cells: changes upon differentiation in culture. **Journal of Anatomy**, vol.200, p.249–258, 2002

DRAPER, J.S.; FOX, V. Human embryonic stem cells: multilineage differentiation and mechanisms of self-renewal. **Archives of Medical Research**, vol.34, p.558–564, 2003.

ELLERSTRÖM C; STREHL R; MOYA K; ANDERSSON K; BERGH C; LUNDIN K; HYLLNER J; SEMB H. Derivation of a xeno-free human embryonic stem cell line. **Stem Cells**, vol.24, p.2170-6, 2006.

ESHKIND, L.; TIAN, Q.; SCHMIDT, A.; FRANKE, W.; WINDOFFER, R.; LEUBERE, W. Loss of desmoglein 2 suggests essential functions for early embryonic development and proliferation of embryonal stem cells. **European Journal of Cell Biology**, vol.81, p.592-598, 2002.

FRAICHARD, A.; CHASSANDE, O.; BILBAUT, G.; DEHAY, C.; SAVATIER, P.; SAMARUT, J. *In vitro* differentiation of embryonic stem cells into glial cells and functional neurons. **J. Cell Sci.**, vol.108, p.3181-3188, 1995.

GARFIELD, A.S. Derivation of primary mouse embryonic fibroblast (PMEF) cultures. **Methods Mol. Biol.**, vol.633, p.19-27, 2010.

GUEST, D.J.; ALLEN, W.R. Expression of cell-surface and embryonic stem cell pluripotency genes in equine blastocysts. **Stem Cells and Development**, vol.16, p.789-795, 2007.

GUEST, D.J.; SMITH, M.R.W.; ALLEN, W.R. Equine embryonic stem-like cells and mesenchymal stromal cells have different survival rates and migration patterns following their injection into damaged superficial digital flexor tendon. **Equine Veterinary Journal**, vol.42, p.636-642, 2010.

HATOYA, S.; TORI, 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**, vol.73, p.298-305, 2006.

HEARD, E.; MONGELARD, F.; ARNAUD, D.; CHUREAU, C.; VOURC'H, C.; AVNER, P. Human XIST yeast artificial chromosome transgenes show partial X inactivation center function in mouse embryonic stem cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, vol.96, p.6841-6846, 1999.

HEINS, N; ENGLUND, MCO; SJOBLUM, C; DAHL, U; TONNING, A; BERGH, C; LINDAHL, A; HANSON, C; SEMB, H Derivation, characterization, and differentiation of human embryonic stem cells. **Stem Cells**, vol.22, p.367-376, 2004.

HOFFMAN, L.M.; CARPENTER, M.K. Characterization and culture of human embryonic stem cells. **Nature Biotechnology**, vol.23, p.699–708, 2005.

KAUFMAN, D.S.; HANSON, E.T.; LEWIS, R.L.; AUERBACH, R.; THOMSON, J.A. Hematopoietic colony-forming cells derived from human embryonic stem cells. **PNAS**, vol. 98, p.10716–10721, 2001.

ITSKOVITZ-ELDOR, J.; SCHULDINER, M.; KARSENTI, D.; EDEN, A.; YANUKA, O.; AMIT, M.; SOREQ, H.; BENVENISTY, N. Differentiation of human embryonic stem cells into embryoid bodies compromising the three embryonic germ layers. **Mol. Med.**, vol.6, p.88-95, 2000.

KAWAHARA, Y.; MANABE, T.; MATSUMOTO, M.; KAJIUME, T.; MATSUMOTO, M. LIF-Free embryonic stem cell culture in simulated microgravity. **PLoS One**, vol.4, p.6343, 2009.

KEEFER, C.L.; PANT, D.; BLOMBERG, N.C.; TALBOT, N.C. Challenges and prospects for the establishment of embryonic stem cell lines of domesticated ungulates. **Animal Reproduction Science**, vol.98, p.147-168, 2007.

KELLER, G.M. *In vitro* differentiation of embryonic stem cells. **Curr. Opin. Cell Biol.**, vol.7, p.862-869, 1995.

KEHAT, I.; GEPSTEIN, A.; SPIRA, A.; ITSKOVITZ-ELDOR, J.; GEPSTEIN, L. High resolution electrophysiological assessment of human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes: a novel in vitro model for the study of conduction. **Circulation Research**, vol.91, p.659–661, 2002.

KOCH, T.G.; BERG, L.C.; BETTS, D.H. Concepts for the clinical use of stem cells in equine medicine. **Canadian Veterinary Journal**, vol.49, p.1009- 1017, 2008.

LI, X., ZHOU S.G., IMREH M.P., AHRLUND-RICHTER L., ALLEN W.R. Horse embryonic stem cell lines from the proliferation of inner cell mass. **Stem Cells and Development**, vol.15, p.523-531, 2006.

LING, V.; NEBEN, S. *In vitro* differentiation of embryonic stem cells: immunophenotypic analysis of cultured embryoid bodies. **J. Cell Physiol.**, vol.171, p.104-115, 1997.

MATSUDA, T.; NAKAMURA, T.; NAKAO, K.; ARAI, T.; KATSUKI, M.; HEIKE, T.; YOKOTA, T. STAT 3 activation is sufficient to maintain na undifferentiated state of mouse embryonic stem cells. **European Molecular Biology Organization Journal**, vol.18, p.4261-4269, 1999.

MINGRONI-NETTO, R.C.; DESSEN, E.M.B. Células tronco o que são e o que serão? Genética na escola. Revista online. **Sociedade Brasileira de Genética**, vol.1, 2008.

MITSUI, K.; TOKUZAWA, Y.; ITOH, H.; SEGAWA, K.; MURAKAMI, M.; TAKAHASHI, K.; MARUYAMA, M.; MAEDA, M.; YAMANAKA, S. The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. **Cell**, vol.113, p.631-642, 2003.

MUÑOZ, M.; RODRÍGUEZ, C.; DE FRUTOS, C.; CAAMAÑO, J.N.; DÍEZ, C.; FACAL, N.; GÓMEZ, E. Conventional pluripotency markers are unspecific for bovine embryonic derived cell-lines. **Theriogenology**, vol.69, p.1159-1164, 2008.

NIETO A., CABRERA C.M., CATALINA P., COBO F., BARNIE A., CORTÉS J.L., BARROSO DEL JESUS A., MONTES R. AND CONCHA A. Effect of mitomycin-C on human foreskin fibroblasts used as feeders in human embryonic stem cells: Immunocytochemistry MIB1 score and DNA ploidy and apoptosis evaluated by flow cytometry. **Cell Biology International**, vol.31, p.269-278, 2007.

NIWA, H.; BURDON, T.; CHAMBERS, I.; SMITH, A. Self-renewal of pluripotent embryonic stem cells is mediated via activation of STAT3. **Genes Dev.**, vol.12, p.2048-2060. 1998.

PARIS, D.B.B.P.; STOUT, T.A.E. Equine embryos and embryonic stem cells: defining reliable markers of pluripotency. **Theriogenology**, vol.74, p.516-524, 2010.

PARK, S. P.; YOUNG, J. L.; LEE, K.S.; SHIN, H. A.; CHO, H. Y.; CHUNG, K.S.; KIM, E. Y.; LIM, J.H. Establishment of human embryonic stem cell lines from frozen-thawed blastocysts using STO cell feeder layers. **Human Reproduction**, vol.19, p. 676-684, 2004.

PEDERSEN, R.A. Feeding hungry stem cells. **Nature**, vol.20, p.882-883, 2002.

PEREIRA, L.V. Células-tronco embrionárias e clonagem terapêutica. In: ZAGO, M.A.; COVAS, D.T. Células-tronco: a nova fronteira da medicina, São Paulo: Atheneu, 2006. p.21-34.

PRELLE, K.; ZINK, N.; WOLF, E. Pluripotent Stem Cells: Model of Embryonic Development, Tool for Gene Targeting, and Basis of Cell Therapy. **Anatomia, Histologia, Embryologia**, vol.31, p.169–186, 2002.

REUBINOFF, B.E.; PERA, M.F.; FONG, C.Y.; TROUNSON, A.; BONGSO, A. Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation *in vitro*. **Nature Biotechnology**, vol.18, p.399–404, 2000.

RIBTSCH, I.; BURK, J.; DELLING, U.; GEIBLER, C.; GITTEL, C.; JÜKE, H.; BREHM, W. In: RIBTSCH et al. Basic Science and clinical application of stem cells in veterinary medicine. **Advances in Biochemical and Engineering Biotechnology**, vol.123, p.219-263, 2010.

RICHARDS, M.; TAN, S.P.; TAN, J.H.; CHAN, W.K.; BONGSO, A. The transcriptome profile of human embryonic stem cells as defined by SAGE. **Stem Cells**, vol.22, p.51-64, 2004.

SAITO, S.; UGAI, H.; SAWAI, K.; YAMAMOTO, Y.; MINAMIHASHI, A.; KUROSAWA, K.; KOBAYASHI, Y.; MURATA, T.; OBATA, Y.; YOKOYAMA, K. Isolation of embryonic stem-like cells from equine blastocysts and their differentiation *in vitro*. **Federation of European Biochemical Society**, vol.531, p.389-396, 2002.

SATO, N.; MEIJER, L.; SKALTSOUNIS, L.; GREENGARD, P.; BRIVANLOU, A.H. Maintenance of pluripotency in human and mouse embryonic stem cells through activation of Wnt signaling by a pharmacological GSK-3-specific inhibitor. **Nat. Med.**, vol.10, p.55-63, 2004.

SCHOLZ, G.; POHL, I.; GENSCHOW, E.; KLEMM, M.; SPIELMANN, H. Embryotoxicity screening using embryonic stem cells *in vitro*: correlation to *in vitro* teratogenicity. **Cells Tissues Organs**, vol.165, p.203-211, 1999.

SCHULDINER M., YANUKA O., ITSKOVITZ-ELDOR,J.; MELTON D. A., BENVENISTY, N. Effects of eight growth factors on the differentiation of cells derived from human embryonic stem cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, vol. 97, p.11307–11312, 2000.

SCHULZ, T.S.; PALMRINI, G.M.; NOGGLE, S.A.; WEILER, D.A.; MITALIPOVA, M.M.; CONDIE, B.G. Directed neuronal differentiation of human embryonic stem cells. **BMC Neuroscience**, vol.4, p.27–41, 2003.

SIMÓN, C.; ESCOBEDO, C.; VALBUENA,D.; GENBACEV, O.; KRTOLICA, A.; ASEÑSI, A.; SÁNCHEZ, E.; ESPLUGUES, J.; FISHER, S.; PELLICER, A. First derivation in Spain of human embryonic stem cell lines: use of long-term cryopreserved embryos and animal-free conditions. **Fertility and Sterility**, vol.83, p.246-249, 2005.

SMITH, A.G.; HEATH, J.K.; DONALDSON, D.D.; WONG, G.G.; MOREAU, J.; STAHL, M.; ROGERS, D. Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides. **Nature**, vol.336, p.688-690, 1988.

STOJKOVIC. M.; LAKO, M.; STRACHAN, T.; MURDOCH, A. Derivation, growth and applications of human embryonic stem cells. **Reproduction**, vol.128, p.259-267, 2004.

THOMSON, J.A.; ITSKOVITZ-ELDOR, J.; SHAPIRO, S. S.; WAKNITZ, M.A.; SWIERGIEL, J.J.; MARSHALL, V.S.; JONES, J.M. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts, **Science**, vol.282, p.1145–1147, 1998.

TISCORNIA, G.; BELMONTE, J.C.I. Micro RNAs in embryonic stem cell function and fate. **Genes Dev.**, vol.24, p.2732-2741, 2010.

XU, C.; INOKUMA, M.S.; DENHAM, J.; GOLDS, K.; KUNDU, P. GOLD, J.D.; CARPENTER, M.K. Feeder-free growth of undifferentiated human embryonic stem cells. **Nature Biotechnology**, vol.19, p. 971–974, 2001.

ZAGO, M.A.; COVAS, D.T. **Células-tronco: a nova fronteira da medicina**. Atheneu: São Paulo, 2006. 245p.

ZHANG, S.C.; WERNIG, M.; DUNCAN, I.D.; BRUSTLE, O.; THOMSON, J.A. In vitro differentiation of transplantable neuronal precursors from human embryonic stem cell. **Nature Biotechnology**, vol. 19, p.1129–1133, 2001.

ZWAKA, T.P.; THOMSON, J.A. Homologous recombination in human embryonic stem cells. **Nature Biotechnology**, vol.21, p.319–321, 2003.

YU, J.; THOMSON, J. A. Embryonic Stem Cells: derivation and properties. *Cells and tissue development*, p.210-225, 2008.

Anexo 1: Normas para publicação na Revista “Research in Veterinary Science”

- *Research in Veterinary Science* publishes original contributions and review articles on research concerning the health and disease of animals, including studies in comparative medicine.
-

Types of contribution

1. Original research papers (Regular Papers)
2. Short Communications
3. Review articles

Original research papers should report the results of original research. The material should not have been previously published elsewhere, except in a preliminary form.

Short Communications should not exceed 1600 words and include no more than two tables or figures. They should have an abstract but no other divisions. Typescripts should be clearly marked Short Communication.

Review articles Review articles on veterinary topics are invited for publication. They should give an update on recent advances in a particular field and be targeted at research veterinarians who are not necessarily working in the same field. The length should not exceed 4000 words.

Submission of manuscripts

Submission to *Research in Veterinary Science* now proceeds online via Elsevier Editorial System - <http://ees.elsevier.com/rvsc>. Authors will be guided step-by-step through uploading files directly from their computers. Authors should select a set of classifications for their papers from a given list, as well as a category designation (Original Research Paper, Short Communication, and so on). Electronic PDF proofs will be automatically generated from uploaded files, and used for subsequent reviewing. Authors should send queries concerning the submission process or journal procedures to AuthorSupport@elsevier.com. Authors can check the status of their manuscript within the review procedure using Elsevier Editorial System.

Authors submitting hard copy papers will be asked to resubmit using Elsevier Editorial System.

Submission of an article is understood to imply that the article is original and is not being considered for publication elsewhere. Submission also implies that all authors have approved the paper for release and are in agreement with its content. Upon acceptance of the article by the journal, the author(s) will be asked to transfer the copyright of the article to the Publisher. This transfer will ensure the widest possible dissemination of information.

All authors should have made substantial contributions to all of the following: (1) the conception and design of the study, or acquisition of data, or analysis and interpretation of data, (2) drafting the article or revising it critically for important intellectual content, (3) final approval of the version to be submitted.

Acknowledgements

All contributors who do not meet the criteria for authorship as defined above should be listed in an acknowledgements section. Examples of those who might be acknowledged include a person who provided purely technical help, writing assistance, or a department chair who provided only general support. Authors should disclose whether they had any writing assistance and identify the entity that paid for this assistance.

Conflict of interest

At the end of the text, under a subheading "Conflict of interest statement" all authors must disclose any financial and personal relationships with other people or

organisations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential conflicts of interest include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, and grants or other funding.

Role of the funding source

All sources of funding should be declared as an acknowledgement at the end of the text. Authors should declare the role of study sponsors, if any, in the study design, in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the manuscript; and in the decision to submit the manuscript for publication. If the study sponsors had no such involvement, the authors should so state.

Language Editing: [Elsevier's Authors Home](#) provides details of some companies who can provide English language and copyediting services to authors who need assistance *before* they submit their article or *before* it is accepted for publication. Authors should contact these services directly. For more information about language editing services, please email authorsupport@elsevier.com.

Ethics

Before papers describing animal studies are accepted for publication in *Research in Veterinary Science*, the authors must satisfy the editors that the work conformed to appropriate ethical standards. Whether or not a particular piece of work is accepted for publication will be decided by the editors whose decision will be final.

The authors should provide written assurances that: (i) The project underwent ethical review and was given approval by an institutional animal care and use committee or by appropriately qualified scientific and lay colleagues. (ii) The care and use of experimental animals complied with local animal welfare laws, guidelines and policies.

The editors expect authors to have adhered to the following general principles: (i) Alternative procedures that replace the use of animals should be used if possible. Where this is not possible, the animals used should be carefully selected to be the least sentient species possible and of an appropriate strain. (ii) The minimum number of animals should be used consistent with achieving the scientific objectives of the study. (iii) Pain and distress should be minimised by the use of humane endpoints, sedation, anaesthesia, analgesia and post-operative care. (iv) Access to veterinary care must be available at all times. (v) Investigators and personnel that care for and use animals must be trained and possess relevant expertise and training that should be updated regularly. (vi) If animals have to be killed, this should be done humanely according to local euthanasia regulations, such as the Home Office guidelines in the UK or guidelines of the American Veterinary Association Panel on Euthanasia.

Title

Papers should be headed with the full title, the initials and surnames of the authors, and the name and address of the institution where the work was carried out. The full telephone number, Fax number and e-mail address of the corresponding author should also be provided.

Form of Papers

a) Abstract (not more than 150 words), self-contained and embodying the main conclusions. It should note the relevance to veterinary science as well as the aims and objectives of the work. Sentences such as 'the results are discussed', which merely describe the paper, are not allowed.

b) Keywords. Please supply a list of up to six keywords that describe the paper. c) Introduction.

- d) Materials and methods employed.
- e) Results, as concise as possible. Text, tables and figures illustrating the same data will rarely be permitted.
- f) Discussion and conclusions.
- g) Acknowledgements.
- h) References.

i) Manuscripts should have **numbered lines**, with wide margins and **double spacing**, throughout, i.e. also for abstracts, footnotes and references. **Every page of the manuscripts, including the title page, references, tables, etc., should be numbered.**

However, in the text no reference should be made to page numbers; if necessary one may refer to sections. Avoid excessive usage of italics to emphasize part of the text.

Abbreviation and symbols: Authors are asked to explain each scientific abbreviation at its first occurrence in their papers; for example, complement fixation test (CFT). The policy of the journal with respect to units and symbols is that SI (System International) symbols should be used.

References

1. All publications cited in the text should be presented in a list of references following the text of the manuscript. The manuscript should be carefully checked to ensure that the spelling of author's names and dates are exactly the same in the text as in the reference list.

2. In the text refer to the author's name (without initial) and year of publication, followed - if necessary - by a short reference to appropriate pages. Examples: "Since Peterson (1988) has shown that..." "This is in agreement with results obtained later (Kramer, 1989, pp. 12-16)".

3. If reference is made in the text to a publication written by more than two authors the name of the first author should be used followed by "et al." This indication, however, should never be used in the list of references. In this list names of first author and co-authors should be mentioned.

4. References cited together in the text should be arranged chronologically. The list of references should be arranged alphabetically on author's names, and chronologically per author. If an author's name in the list is also mentioned with co-authors the following order should be used: publications of the single author, arranged according to publication dates - publications of the same author with one co-author - publications of the author with more than one co-author. Publications by the same author(s) in the same year should be listed as 1974a, 1974b, etc.

5. Use the following system for arranging your references:

a. For periodicals

Minamoto, T., Honjo, M.N., Yamanaka, H., Tanaka, N., Itayama, T., Kawabata, Z., 2011. Detection of cyprinid herpesvirus-3 DNA in lake plankton. *Research in Veterinary Science* 90, 530-532.

Castillo, V.A., Gomez, N.V., Lalia, J.C., Cabrera Blatter, M.F., Garc?a, J.D., 2008a. Cushing's disease in dogs: Cabergoline treatment. *Research in Veterinary Science* 85, 26-34.

b. For books

Blaha, T. (Ed.), 1989. *Applied Veterinary Epidemiology*. Elsevier, Amsterdam, 344 pp.

c. For multi-author books

Wilson, M.B., Nakane, P.K., 1978. Recent developments in the periodate method of conjugating horseradish peroxidase (HRPO) to antibodies. In: Knapp, W., Holubar, K., Wick, G. (Eds.), *Immunofluorescence and Related Staining Techniques*. North Holland, Amsterdam, pp. 215-2246.

6. Please do not abbreviate the journal title names e.g. Research in Veterinary Science and not Res Vet Sci.
7. In the case of publications in any language other than English, the original title is to be retained. However, the titles of publications in non-Latin alphabets should be transliterated, and a notation such as "(in Russian)" or "(in Greek, with English abstract)" should be added.
8. Work accepted for publication but not yet published should be referred to as "in press".
9. References concerning unpublished data and "personal communications" should not be cited in the reference list but may be mentioned in the text.
10. Web references may be given. As a minimum, the full URL is necessary. Any further information, such as Author names, dates, reference to a source publication and so on, should also be given.
11. Articles available online but without volume and page numbers may be referred to by means of their Digital Object identifier (DOI) code.

Illustrations

1. All illustrations (line drawings and photographs) should be submitted as separate files, preferably in TIFF or EPS format.
2. Illustrations should be numbered according to their sequence in the text. References should be made in the text to each illustration.
3. Illustrations should be designed with the format of the page of the journal in mind. Illustrations should be of such a size as to allow a reduction of 50%.
4. Lettering should be big enough to allow a reduction of 50% without becoming illegible. Any lettering should be in English. Use the same kind of lettering throughout and follow the style of the journal.
5. If a scale should be given, use bar scales on all illustrations instead of numerical scales that must be changed with reduction.
6. Each illustration should have a caption. The captions to all illustrations should be typed on a separate sheet of the manuscript.
7. Explanations should be given in the figure legend(s). Drawn text in the illustrations should be kept to a minimum.
8. Photographs are only acceptable if they have good contrast and intensity.
9. If you submit usable colour figures, Elsevier would ensure that these figures appeared free-of-charge in colour in the electronic version of your accepted paper, regardless of whether or not these illustrations are reproduced in colour in the printed version. Colour illustrations can only be included in print if the additional cost of reproduction is contributed by the author: you would receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.
Please note that because of technical complications which may arise by converting colour figures to 'grey scale' (for the printed version, should you not opt for colour in print), you should submit in addition usable black and white figures corresponding to all colour illustrations.
10. Advice on the preparation of illustrations can be found at the following URL:

<http://www.elsevier.com/artworkinstructions>

Preparation of supplementary data

Elsevier now accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, movies, animation sequences, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier web

products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please ensure that data is provided in one of our recommended file formats. Authors should submit the material together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file.

Tables

1. Authors should take notice of the limitations set by the size and lay-out of the journal. Large tables should be avoided. Reversing columns and rows will often reduce the dimensions of a table.
2. If many data are to be presented, an attempt should be made to divide them over two or more tables.
3. Tables should be numbered according to their sequence in the text. The text should include references to all tables.
4. Each table should occupy a separate page of the manuscript. Tables should never be included in the text.
5. Each table should have a brief and self-explanatory title.
6. Column headings should be brief, but sufficiently explanatory. Standard abbreviations of units of measurement should be added between parentheses.
7. Vertical lines should not be used to separate columns. Leave some extra space between the columns instead.
8. Any explanation essential to the understanding of the table should be given as a footnote at the bottom of the table.

Copyright

If excerpts from other copyrighted works are included, the Author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by Authors in these cases: contact Elsevier's Rights Department, Oxford, UK: phone (+1) 215 239 3804 or +44(0)1865 843830, fax +44(0)1865 853333, e-mail healthpermissions@elsevier.com. Requests may also be completed online via the Elsevier homepage <http://www.elsevier.com/permissions>. Material in unpublished letters and manuscripts is also protected and must not be published unless permission has been obtained.

Authors Rights

As an author you (or your employer or institution) may do the following:

- make copies (print or electronic) of the article for your own personal use, including for your own classroom teaching use
- make copies and distribute such copies (including through e-mail) of the article to research colleagues, for the personal use by such colleagues (but not commercially or systematically, e.g., via an e-mail list or list server)
- post a pre-print version of the article on Internet websites including electronic pre-print servers, and to retain indefinitely such version on such servers or sites
- post a revised personal version of the final text of the article (to reflect changes made in the peer review and editing process) on your personal or institutional website or server, with a link to the journal homepage (on elsevier.com)
- present the article at a meeting or conference and to distribute copies of the article to the delegates attending such a meeting
- for your employer, if the article is a 'work for hire', made within the scope of your employment, your employer may use all or part of the information in the article for other intra-company use (e.g., training)
- retain patent and trademark rights and rights to any processes or procedure described in the article
- include the article in full or in part in a thesis or dissertation (provided that this is not

to be published commercially)

- use the article or any part thereof in a printed compilation of your works, such as collected writings or lecture notes (subsequent to publication of your article in the journal)
- prepare other derivative works, to extend the article into book-length form, or to otherwise re-use portions or excerpts in other works, with full acknowledgement of its original publication in the journal

Funding body agreements and policies

Elsevier has established agreements and developed policies to allow authors who publish in Elsevier journals to comply with potential manuscript archiving requirements as specified as conditions of their grant awards. To learn more about existing agreements and policies please visit <http://www.elsevier.com/fundingbodies>).

Proofs

One set of page proofs in PDF format will be sent by e-mail to the corresponding author (if we do not have an e-mail address then paper proofs will be sent by post). Elsevier now sends PDF proofs which can be annotated; for this you will need to download Adobe Reader version 7 available free from

<http://www.adobe.com/products/acrobat/readstep2.html>. Instructions on how to annotate PDF files will accompany the proofs. The exact system requirements are given at the Adobe site: <http://www.adobe.com/products/acrobat/acrrsystemreqs.html#70win>. If you do not wish to use the PDF annotations function, you may list the corrections (including replies to the Query Form) and return to Elsevier in an e-mail. Please list your corrections quoting line number. If, for any reason, this is not possible, then mark the corrections and any other comments (including replies to the Query Form) on a printout of your proof and return by fax, or scan the pages and e-mail, or by post. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Therefore, it is important to ensure that all of your corrections are sent back to us in one communication: please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

Author Enquiries

For enquiries relating to the submission of articles (including electronic submission where available) please visit the journal's homepage at <http://www.elsevier.com/locate/rvsc>. This also provides the facility to track accepted articles and set up e-mail alerts to inform you of when an article's status has changed. Contact details for questions arising after acceptance of an article, especially those relating to proofs, are provided after registration of an article for publication.

Offprints

The corresponding author will, at no cost, be provided with a PDF file of the article via e-mail. The PDF file is a watermarked version of the published article and includes a cover sheet with the journal cover image and a disclaimer outlining the terms and conditions of use.

***Research in Veterinary Science* has no page charges**

AudioSlides

The journal encourages authors to create an AudioSlides presentation with their published article. AudioSlides are brief, webinar-style presentations that are shown next to the online article on ScienceDirect. This gives authors the opportunity to summarize their research in their own words and to help readers understand what the paper is

about. More information and examples are available at <http://www.elsevier.com/audioslides>. Authors of this journal will automatically receive an invitation e-mail to create an AudioSlides presentation after acceptance of their paper.

ANEXO 2:

Artigo enviado para a Revista “ Research in Veterinary Science” intitulado “Immuno-phenotypic characterization of embryonic stem-like cells obtained from fresh an cooled equine blastocysts” (RVSC-13-925).

- 1
- 2
- 3
- 4
- 5
- 6
- 7
- 8
- 9
- 10
- 11
- 12
- 13
- 14
- 15
- 16
- 17
- 18
- 19
- 20
- 21

4
5

7
8

11

12

13

14

15

16

18

22

23

24

25

26

Abstract

27 The aim of this study was to isolate and culture inner cell mass (ICM) cells from fresh and cooled
28 equine blastocysts by the expression of pluripotency markers. For this, 40 embryos were divided
29 into two groups: Group 1 with 26 fresh embryos and Group 2 with 14 cooled embryos. In Group 1,
30 65,4% of ICM adhered to the monolayer two days after culture, and 19,2% were submitted to first
31 passage before characterization. Whereas in the Group 2, 85,7% of ICM adhered to monolayer
32 two days after culture, and 21,4% were submitted to first passage. Besides equine embryonic stem
33 cells-like colonies expressed the pluripotency markers Oct-4, SSEA-1, SSEA-3 and SSEA-4, the
34 antibodies TRA-1-60 and TRA-1-81 were expressed with low intensity. No differences were
35 observed on the expression of pluripotency markers between fresh and cooled equine embryos
36 proving that the cooling process did not change the capacity of the ICM of the equine embryo.

37

1. Introduction:

39 Embryonic stem cells (ESCs) are pluripotent cells derived from the inner cell mass (ICM) of
40 the blastocyst, which have the capacity to contribute to all three germ layers, including the
41 germline. The ability of ESCs to generate any type of cell and to be maintained during extended
42 periods of cultivation supports the existence of large pools of stem cells for therapeutic and
43 research applications.

44 ESCs are important in horses as an abundant and high-quality source of cells for use in
45 stem cell-based therapies and in developing potential therapies for human diseases. More than 95
46 genetic disorders have been identified that exhibit extensive homology between horses and
47 humans (Mendelian Inheritance in Animals Online, 2007). ES cell lines from horses would also be
48 useful for improving disease resistance, for biopharming and for the genetic engineering of these
49 animals for improved production traits and products, along with the fact that the increasing pet
50 population drives the development of new veterinary-care technologies. However, studies of the
51 isolation of equine embryonic stem cells and their expression profiles have been rare.

52 The first report of the isolation of horse embryonic stem-like (ES-like) cells was published
53 in 2002 for Saito et al. So far the isolation and partial characterization of six putative equine ESC
54 lines has been reported (Li et al. 2002; Guest & Allen, 2007). Li et al (2002) reported the
55 derivation of ES-like cells from fresh and frozen equine embryos and reported that they expressed
56 OCT-4, alkaline phosphatase activity, SSEA-1, SSEA-4, TRA-1-60 and TRA-1-81. However, none of
57 the groups was able to demonstrate the ability of ESCs to generate teratomas or to contribute to
58 the germ-line. Since early equine embryogenesis differs significantly from that of the mouse,
59 human, and even other ungulates like the cow and the pig (Betteridge, 2007; Keefer, et al. 2007),
60 it is reasonable to anticipate different temporal and spatial expression for pluripotency genes in
61 the horse.

62 The objective of this work was to isolate ICM cells from fresh and cooled horse blastocysts,
63 characterizing the cultured cells through the expression of the pluripotency factors Oct-4, SSEA-1,
64 SSEA-3, SSEA -4, TRA-1-60, TRA 1-81.

65

66 **2. Materials and Methods**

67

68 **2.1 Preparation of the Feeder Layers:**

69 Skin fragments of approximately 2 cm² were obtained from the shoulders of adult horses and
70 divided into pieces of roughly 1 mm³ with the use of a surgical blade. Culture was performed in
71 DMEM (Gibco[®], Life Technologies, 1995-065) and 10% of FCS (Gibco, Life Technologies), 100 IU/ml
72 penicillin and 100 µg/ml streptomycin (Sigma, P3539) and 3 µg/ml amphotericin B (Sigma, A9528).
73 The cells were cultured in 5% CO₂ and monitored every 24 hours. Once confluence was reached,
74 trypsinization and the first passaging were performed.

75 A concentration of 5 x 10⁴ cells/well was transferred to a six-well plate, and 5 mL of culture
76 medium was added. After two to three days in culture, the fibroblasts were mitotically inactivated
77 with 10 µg/ml of Mitomycin C (Sigma, M4287). Inactivated fibroblasts were cultured in high-
78 glucose DMEM (Gibco, Life Technologies, 11995-065)/F12 (Gibco, Life Technologies, 11765-054)
79 and 20% of FBS, 100 IU/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin (Sigma, P3539) and 3 µg/ml
80 amphotericin B (Sigma, A9528).

81

82 **2.2 Recovery of Equine Embryos and Isolation and Culture of ICM:**

83

84 Horse blastocysts (n=40) with an identifiable ICM were recovered by nonsurgical uterine
85 lavage on day 8 after insemination and divided in two groups. In Group 1, 26 fresh embryos were
86 kept in holding media (TQC[®] - Holding Plus, Nutricell, Campinas, SP) for one hour before use. In
87 Group 2, 14 embryos were transfer to the same holding media and cooled to 15°C in a cryogenic
88 box (Botuflex[®] - Botupharma, Botucatu, SP) and kept for 24 hours before use.

89 The ICM of each blastocyst was isolated mechanically with the use of two insulin needles in a
90 stereomicroscope (10X). The cell group containing the ICM was subsequently seeded over the
91 monolayer of inactivated equine fibroblasts and cultured at 38.5 °C in a 5% CO₂ atmosphere. The
92 ES medium consisted of high-glucose DMEM (Gibco, Life Technologies, 11995-065)/F12 (Gibco,
93 Life Technologies, 11765-054) and 20% of FBS, 1% essential amino acids (Sigma – B6766), 1% non-
94 essential amino acids (Gibco, Life Technologies, 11140), 0.1 mM β-Mercaptoethanol (Sigma –
95 M6250), 100 IU/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin (Sigma, P3539) and 3 µg/ml
96 amphotericin B (Sigma, A9528) and 1,000 units/ml of human LIF.

97 Culture dishes were examined daily; the medium was replaced for all colonies that exhibited
98 typical ES-like cell morphology. The primary cultures were maintained for 10 to 14 days, and the
99 passages were performed by mechanical disaggregation at an interval of five to seven days.

100

101 **3. Characterization of equine ESC**

102

103 **3.1 Immunocytochemistry of OCT-4 in equine embryo**

104

105 Two embryos were subjected to immunocytochemistry. All dilutions were made with
106 phosphate-buffered saline (PBS, Invitrogen, Carlsbad, CA). Embryos were first fixed for 30 min at
107 room temperature in 4% paraformaldehyde (Sigma, P6148) and subsequently permeabilized in
108 0.1% Triton X-100 (Sigma) and 0.1% Tween-20 (Research Organics, Cleveland, OH) for 20 min at
109 room temperature. Nonspecific reactions were blocked by a 20-min incubation at room
110 temperature in 10% normal goat serum (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove,

111 PA). Next, antibodies (1:100) were administered sequentially at room temperature for 40 min
112 each, with extensive washing between antibody treatments. The primary antibody was a mouse
113 polyclonal antibody against rabbit OCT-4 (Chemicon, Millipore), and the secondary antibody was a
114 goat anti-mouse antibody conjugated with Alexa fluor 555 (Figure 1 A). A 10-min, room-
115 temperature incubation with Hoechst 33342 (Sigma) at a concentration of 10 µg/ml was used to
116 counterstain the nuclear material (Figure 1 B). Control reactions for nonspecific binding of the
117 secondary antibody were carried out by omitting treatment with the primary antibody.

118

119 **3.2 Immunostaining for undifferentiation factors**

120

121 Colonies of cells in culture were examined by immunofluorescence for the presence of
122 proteins OCT4 both for colonies obtained from fresh embryos (Figure 2 A and C) as for colonies
123 obtained from cooled embryos (Figure 3 C) (mouse monoclonal, MAB4305-20, Millipore), SSEA-1
124 both for colonies obtained from fresh embryos (Figure 2 C) as from cooled embryos (Figure 3 A)
125 (mouse monoclonal, MAB4301-20, Millipore), SSEA-3 for colonies obtained from cooled embryos
126 (Figure 3 B) (mouse monoclonal, MAB4303-20, Millipore), SSEA-4 both for colonies obtained from
127 fresh embryos (Figure 2 D) as for cooled embryos (Figure 3 D) (mouse monoclonal, MAB4304-20,
128 Millipore), TRA-1-60 (mouse monoclonal, MAB4360-20, Millipore), TRA-1-81 (monoclonal mouse,
129 MAB4381-20, Millipore), the last ones for colonies obtained for fresh embryos (Figure 4 A and B,
130 respectively).

131 Then, cells were permeabilized with PBS + Triton X-100 0.1% for 10 minutes and to block
132 non-specific binding of the primary antibody washed in PBS + 5% BSA for 30 minutes at room

133 temperature environment. All primary antibodies were diluted 1:100 in PBS and applied to
134 samples overnight, then they were washed in PBS. The secondary antibodies (anti-mouse IgM
135 Alexa Fluor 555, A21426, Invitrogen) and (anti-rabbit FITC IgG, NG 1827414, Milipore) were
136 applied and after 60 minutes the samples were examined in a fluorescence microscope (Figure 2).

137 Negative controls for ESC were included through omission of the primary antibody
138 incubation with all markers.

139 There were three replicates for all antibodies, for both embryos as for the colonies
140 established.

141

142 **4. Statistical Analysis**

143 The number of replicates was limited to a minimum of three replicates for each
144 comparison for statistically significant differences could be detected.

145 To Statistical analysis of data from three replicates for each comparison we used analysis
146 of variance followed by multiple comparisons, in pairs, the test Student-Newman-Kleus. The
147 significance level was 5%.

148

149 **5. Results**

150 A total of 40 normal embryos at the blastocyst stage were obtained from 10 mares, and 29
151 (72.5%) ICMs developed into ES-like colonies and were transfer to secondary culture (Table 1).
152 After the passage, 8 colonies (27.6%) continued to develop. In the fresh embryo group 65.4% of
153 the ICM attached to the plate formed an ES-like colony and in the cooled embryo group the

colonies were observed in 85.7% of the cultured ICMs. No differences were observed among groups proving the good viability of the cooled embryos.

6. Discussion and Conclusions

In fact, one of the major characteristics of the equine embryo is their ability of being cooled and stored permit shipping of the embryos to a centralized station for transfer into recipient mares (Squires et al. 2003). Fleury et al. (2002) maintained embryos in Ham's F-10 with Hepes buffer and 0.4% BSA at 15–18 °C for 1–18 h with the utilization of a simple cooling device. The embryos were subdivided into two categories measuring either <1000 or >1000 µm with no difference in pregnancy rates among different cooling periods and embryo diameters. These authors concluded that embryos can be stored in Ham's F-10 for up to 18 h at 15–18 °C without any adverse effect on pregnancy rates. A similar methodology was used in this experiment with the exception that the embryos were stored for 24 hours.

Feeder cells of various origins that were submitted to various inactivation protocols were used to culture embryonic stem cells-like cells. Earlier attempts to maintain equine ESCs in culture have employed bovine umbilical-cord fibroblasts (Saito et al. 2002), mouse embryonic fibroblasts, equine embryonic fibroblasts (Li et al. 2006), equine mesenchymal stem cells and equine adult fibroblasts (Lima-Neto et al. 2008), suggesting that the origin of the feeder cells is not a primary factor to consider when deriving equine ES-like cell colonies. In the present experiment, the use of Mitomycin C resulted in reduced adhesion of the fibroblasts to the plastic dish with some loose cells being observed. Those results are in agreement with Roy et al. (2001) and Nieto et al. (2007),

174 who also demonstrated that the monolayer of mitomycin C-treated fibroblasts exhibited reduced
175 viability and areas of necrotic cells.

176 The concentration of Mitomycin C used in the present experiment (10 µg/mL), although
177 resulted in a decrease in fibroblast viability, was not able to completely block the cell cycle. It was
178 possible to observe a continuous proliferation of the feeder layer even after the blockage. Similar
179 results were observed by Nieto et al. (2007), who observed that part of the fibroblast treated with
180 Mitomycin C remain active and proliferating in culture, interfering with the survival of the ES-like
181 cells.

182 Morphological analysis indicated that the primary ICM outgrowths resembled human ESCs
183 (Nieto et al. 2010). The colonies exhibited distinct boundaries and were composed of a sheet of
184 small flattened cells with a circular shape, a high nucleus: cytoplasm ratio and a prominent
185 nucleolus. Compact colonies of densely packed cells were seen two days after isolation (Figure 5
186 A) and, after four (Figure 5 B) and five days in culture (Figure 5 C), colonies become flattened with
187 a defined border. After passages, the colonies were domed and dense with distinct boundaries
188 and rapid growth (Figure 1C). Similar morphology has been described for bovine ES-like cell
189 colonies (Talbot et al. 2005; Keefer et al. 2007). Desmarais et al. (2011) found that equine ICM
190 outgrowths produced from *in vivo* and parthenogenetic embryos also exhibited the same
191 morphology, suggesting a close resemblance between equine and bovine ICM cells' organization.

192 The formation of cystic structures was observed between mechanical disaggregation
193 passages (Figure 5 D). In the present experiment, the phenotype of these cystic structures
194 resembled that of equine EBs described by Saito et al. (2002). During each passage, the LIF
195 was still present in the media, so it was not clear if those were real EB. However, the

196 formation of embryonic bodies may be due to the presence of groups of transplanted ES-
197 like cell explants, which remain in suspension during culture.

198 The expression of the pluripotency markers OCT-4, SSEA-1 and SSEA-4 in the ES-like
199 cells suggests the presence of undifferentiated cells in the culture. Previous reports stated that
200 equine ES-like cells expressed OCT-4 and STAT-3 as pluripotency markers (Saito et al. 2002; Li et
201 al. 2006). However, in the present experiment, when an intact equine embryo was stained for OCT-
202 4 expression, the marker also appeared in the trophoblastic cells. Previous studies in other ungulate
203 species revealed similar findings. Kirchoff et al. (2000) evaluated murine, porcine and bovine
204 embryos and demonstrated that, in cows and pigs, OCT-4 expression was distributed throughout the
205 trophoblastic cells and was not restricted to the ICM, as was observed in mice. Also, Kurosaka et al.
206 (2004) observed the expression of OCT-4 in the trophoblastic cells of bovine embryos. Those
207 results strongly indicate that the expression profiles of some of the pluripotency markers may be
208 different for ungulates when compared with those of humans and mice. The expression of Oct-4 in
209 ES-like equine cells was also described (Saito et al. 2002; Li et al. 2006; Guest & Allen, 2007)
210 showed the expression of Oct-4 either in ES-like cells as in ICM of equine blastocysts. However the
211 marker appeared weak in the trophoblast.

212 According to Améen et al. (2008), the undifferentiated human surface markers
213 characteristics of ESC are the glycolipids SSEA-3 and SSEA-4 and the glycoproteins TRA-1-60
214 and TRA-1-81. The marker SSEA-1 is not founded in human ESC, but is present in the mouse. Our
215 results showed that the colonies of ES-like cells, either from fresh and from cooled embryos,
216 expressed SSEA-1 and SSEA-4. This result is slightly different from Guest & Allen (2007) who did
217 not observe the expression of SSEA-1 in the equine ES-like cells. These same authors showed the
218 presence of TRA-1-60 and TRA-1-81 in the cytoplasm of the cultured cells. In our experiment,
219 although still present, the marker for these pluripotency factors appeared very weak.

220 The results of the present experiment suggest that the methodology described here is
221 efficient for isolating and culturing equine ICM outgrowths, although a special attention need to
222 be paid to the production of the feeders. Regarding the pluripotency factors expression levels in
223 ES-like cells, further study is needed to elucidate the genetic profile of the embryonic stem cells of
224 this species. Apparently, the knowledge obtained in more than two decades since the first
225 isolation of the mouse embryonic stem cell cannot be broadly extrapolated to equine species.

226

227 **COMPETING INTERESTS**

228 The authors declare no potential conflicts of interest. No non-financial competing interests
229 (political, personal, religious, ideological, academic, intellectual, commercial or any other) to
230 declare in relation to this manuscript.

231

232 **AUTHOR'S CONTRIBUTIONS**

233 BAM, MDG, IM and FCL-A conceived and designed the experiments. NPPF, LLC participated
234 in equine embryos recovery. BAM and MDG processed samples and performed the cell cultures.
235 IM performed the immuno-fluorescent reactions. MJS helped with the statistical analyses. BAM,
236 FCL-A, MDG and IM drafted the manuscript, and helped edit the manuscript. All authors read and
237 approved the final manuscript.

238

239 **ACKNOWLEDGEMENTS**

240 Grant supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo FAPESP
241 (2011-17801-0) (São Paulo Research Support Foundation).

242

243 **References**

244

245 AMÉEN, C.; STREHL, R.; BJÖRQUIST, P.; LINDAHL, A.; HYLLNER, J.; SARTIPY,
246 P., 2008. Human embryonic stem cells: current technologies and emerging industrial
247 applications. Critical reviews in Oncology/Hematology 65, 54-80.

248

249 BETTERIDGE, K.J. Equine embryology of unanswered questions, 2007. Theriogenology 68, 9-21.

250

251 DESMARAIS, J.A.; DEMERS, S.P.; SUZUKI, J. Jr; LAFLAMME, S.; VINCENT, P.; LAVERTY, S.; SMITH,
252 L.C., 2011. Trophoblast stem cell marker gene expression in inner cell mass-derived cells from
253 parthenogenetic equine embryos. Reproduction 141, p. 321-32.

254

255 FLEURY, J.J.; P.D.C.FLEURY, F.C.LANDIM-ALVARENGA., 2002. Effect of embryo diameter and
256 storage period on pregnancy rates obtained with equine embryos stored in Ham's F-10 with Hepes
257 buffer at a temperature of 15–18 °C-preliminary results Theriogenology 58, 749–750.

258

259 GUEST, D.J.; ALLEN, W.R., 2007. Expression of cell-surface and embryonic stem cell pluripotency
260 genes in equine blastocysts. Stem Cells and Development 16, 789-795.

261

262 HOFFMAN, L.M.; CARPENTER, M.K., 2005. Characterization and culture of human
263 embryonic stem cells. Nature Biotechnology 23, 699–708.

264

265

266 KEEFER, C.L.; PANT, D.; BLOMBERG, L.; TALBOT, N.C., 2007. Challenges and prospects for the
267 establishment of embryonic stem cell lines of domesticated ungulates. Animal Reproduction
268 Science 98, 147-168.

269

270

271 KIRCHOFF, N.; CARNWATH, J. W.; LEMME, E.; ANASTASSIADIS, K.; SCHOLER, H.; NIEMANN, H.,
272 2000. Expression pattern of Oct-4 in preimplantation embryos of different species. Biology
273 Reproduction 63, 1698-1705.

274

275

276 KUROSAKA, S.; ECKARDT, S.; MCLAUGHLIN, K.J., 2004. Pluripotent lineage definition in bovine
277 embryos by Oct4 transcript localization. Biology of Reproduction 71, 1578-82.

278

279

280 LI, X.; ZHOU, S.G; IMREH, M.P, ALLEN, W.R., 2006. Horse embryonic stem cell lines from the
281 proliferation of inner cell mass cells. Stem Cells Development 15, 523–53.

282

283 LIMA-NETO, J.F.; ARAUJO, G.H.M.; ALVARENGA, M.A.; MOYA-ARAÚJO, C.F.; BLANCO, I.D.P.;
284 RASCADO, T.S.; MACEDO, C.C.; WODEWOTZKY, T.I.; ALVARENGA, M.A.; LANDIM-ALVARENGA, F.C.,

285 2010. Culture of equine Inner Cell Mass using equine mesenchymal cells as a feeder layer.
286 Reproduction Fertility and Development 22, 351 (Abstract).

287

288

289 NIETO, A.; CABRERA, C.M.; CATALINA, P.; COBO, F.; BARNIE, A.; CORTÉS, J.L.; BARROSO DEL JESUS,
290 A.; MONTES, R.; CONCHA, A., 2007. Effect of mitomycin-C on human foreskin fibroblasts used as
291 feeders in human embryonic stem cells: Immunocytochemistry MIB1 score and DNA ploidy and
292 apoptosis evaluated by flow cytometry. Cell Biology International 31, 269-278.

293

294

295 ROY, A.; KRZYKWA, E.; LEMIEUX, R.; NÉRON, S., 2001. Increased efficiency of gamma-irradiated
296 versus mitomycin C-treated feeder cells for the expansion of normal human cells in long-term
297 cultures. Journal Hematotherapy and Stem Cell Research 10, 873-80.

298

299

300 SAITO, S.; UGAI, H.; SAWAI, K.; YAMAMOTO, Y., 2002. Isolation of embryonic stem-like cells from
301 equine blastocysts and their differentiation in vitro. Federation of European Biochemical Society
302 Letters 531, 389-396.

303

304

305 SQUIRES, E.L.; CARNEVALE, E.M.; McCUE., 2003. P.M.; BRUEMMER, J.E. Embryo technologies in
306 the horse. Theriogenology 59, 151-170.

307 TALBOT, N.C.; CAPERNA, T.J.; POWEL, A.M.; BLOMBERG, L.A.; GARRETH, W.M., 2005. Isolation and
308 characterization of a bovine visceral endoderm cell line derived from a parthenogenetic blastocyst.
309 In vitro Cellular & Developmental Biology Animal 41, 130-141.

310

311

312 **Figure Legends**

313

314 **Figure 1:** A- Equine embryo treated with anti Oct-4 conjugated with Alexa fluor 555 (Magnification
315 40X). B- Cells nuclei stained with Hoechst 33342 (Magnification 40X).

316

317 **Figure 2:** Immunostainig for equine ESC colonies obtained from fresh embryos, showing positive
318 staining for Oct (A and B) SSEA-1 (C) and SSEA-4 (D). E, F, G, H: Counter-staining form ESC nuclei
319 with DAPI. A,B, E and F: Magnification 10X. C, D, G and H: Magnifcation 20 X.

320

321 **Figure 3:** Immunostaining of equine ESC obtained from cooled embryos, showing positive staining
322 for SSEA-1 (A), SSEA-3 (B), Oct-4 (C) and SSEA-4 (D). E,F,G and H: Counter-staining of ESC nuclei
323 with DAPI. A ,C, D, E, G and H: Magnification 10X. B and F: Magnification 20X.

324

325 **Figure 4:** Immunostaining of equine ESC colonies obtained from fresh embryos showing staining
326 for TRA-1-60 (A) and TRA-1-81 (B). Magnification 10X.

327

328 **Figure 5:** Equine ESC colonies. A- Two days after ICM isolation (Magnification 10X). B- Four days
329 after ICM isolation (Magnification 10X). C- Five days after isolation (Magnification 20X). D- Cystic
330 structures formed after ICM isolation and passages, resembling embryoid bodies (Magnification
331 10X).

332

333

334 **AUTHOR'S AGREEMENT**

335

336 **COMPETING INTERESTS**

337 The authors declare no potential conflicts of interest. No non-financial competing interests
338 (political, personal, religious, ideological, academic, intellectual, commercial or any other) to
339 declare in relation to this manuscript.

340

341 **AUTHOR'S CONTRIBUTIONS**

342 BAM, MDG, IM and FCL-A conceived and designed the experiments. NPPF, LLC participated
343 in equine embryos recovery. BAM and MDG processed samples and performed the cell cultures.
344 IM performed the immuno-fluorescent reactions. MJS helped with the statistical analyses. BAM,
345 FCL-A, MDG and IM drafted the manuscript, and helped edit the manuscript. All authors read and
346 approved the final manuscript.

347

348 **ACKNOWLEDGEMENTS**

349 Grant supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo FAPESP
350 (2011-17801-0) (São Paulo Research Support Foundation).

351

352 **Table 1-** Development of the ICM outgrowths using fresh and cooled equine embryos.

Group	Primary culture (4d)	1 st Passage (10d)
1 (fresh)	65,4% (17/26) ^a	19,2% (5/26) ^b
2 (cooled)	85,7% (12/14) ^A	21,4% (3/14) ^B
Total	29/40	8/40

353 ^{abc} different letters in the same line differ (P<0,05); ^{AB} different letters in the same line differ (P<0,05); There
354 were no differences among groups (P=0,98).

355

356

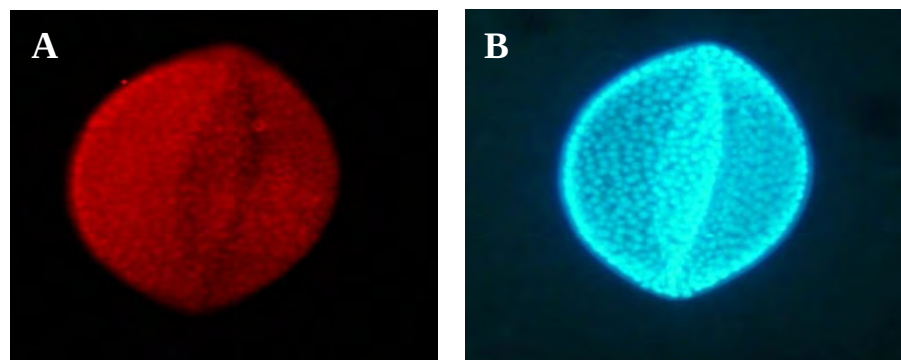
357

358

359

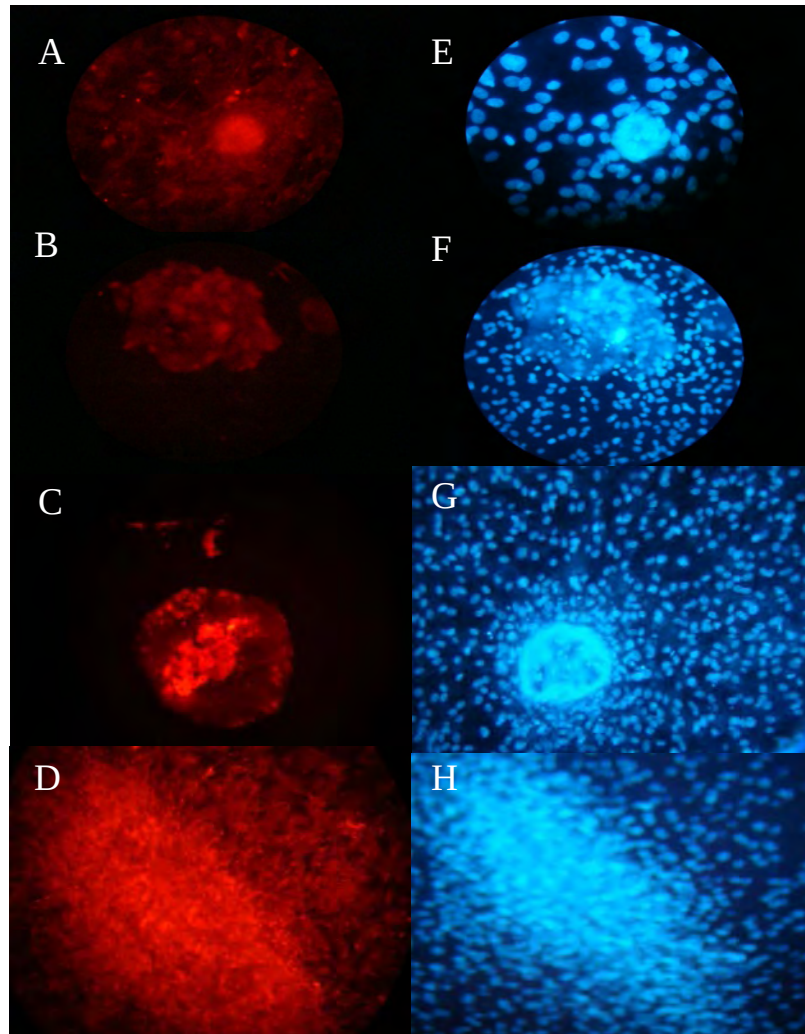
360

361



362 **Figure 1:** A- Equine embryo treated with anti Oct-4 conjugated with Alexa fluor 555 (Magnification
363 40X). B- Cells nuclei stained with Hoechst 33342 (Magnification 40X).

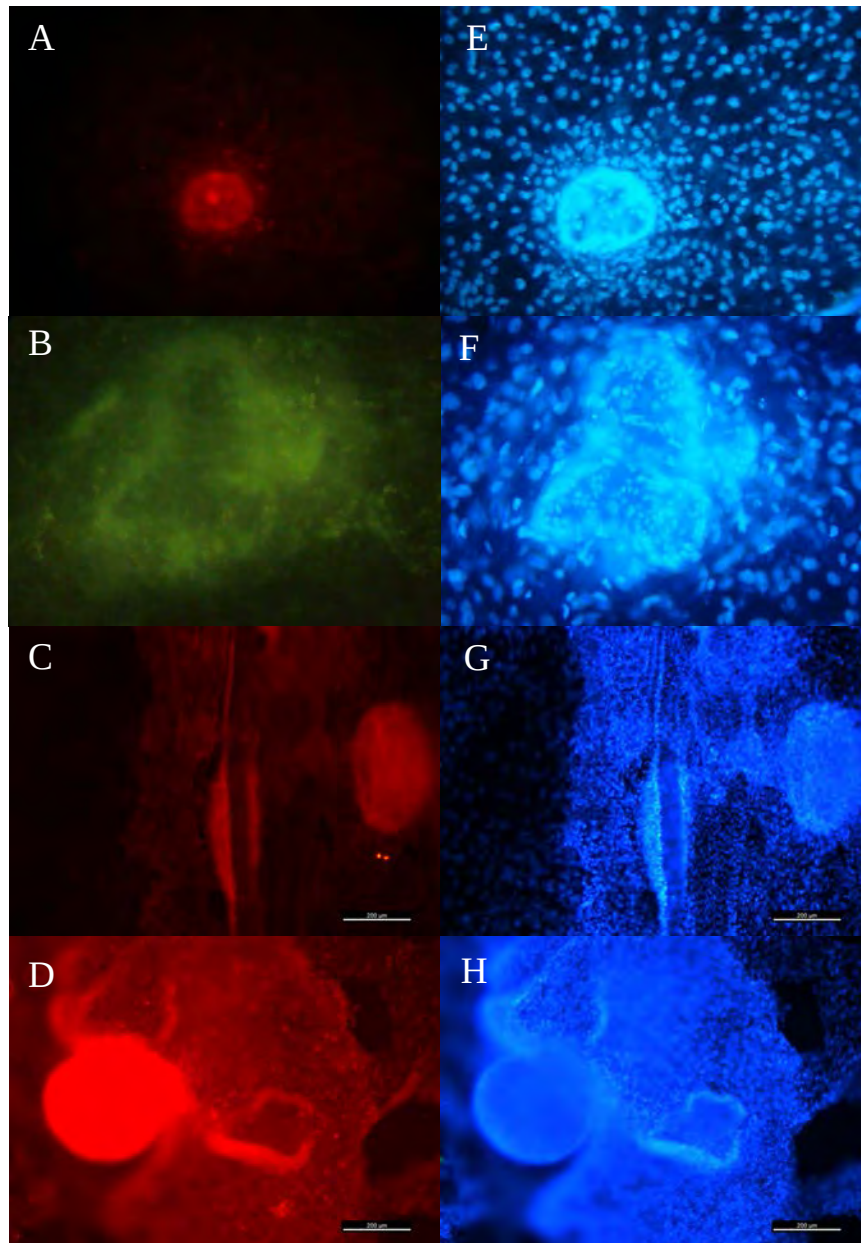
364



365

366 **Figure 2:** Immunostaining for equine ESC colonies obtained from fresh embryos, showing positive
367 staining for Oct (A and B) SSEA-1 (C) and SSEA-4 (D). E, F, G, H: Counter-staining for ESC nuclei
368 with DAPI. A,B, E and F: Magnification 10X. C, D, G and H: Magnification 20 X.

369



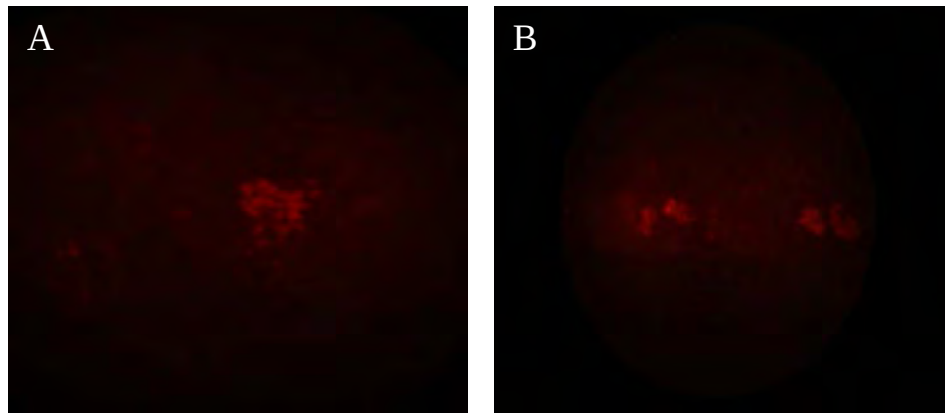
370

371 **Figure 3:** Immunostaining of equine ESC obtained from cooled embryos, showing positive staining
 372 for SSEA-1 (A), SSEA-3 (B), Oct-4 (C) and SSEA-4 (D). E,F,G and H: Counter-staining of ESC nuclei
 373 with DAPI. A ,C, D, E, G and H: Magnification 10X. B and F: Magnification 20X.

374

375

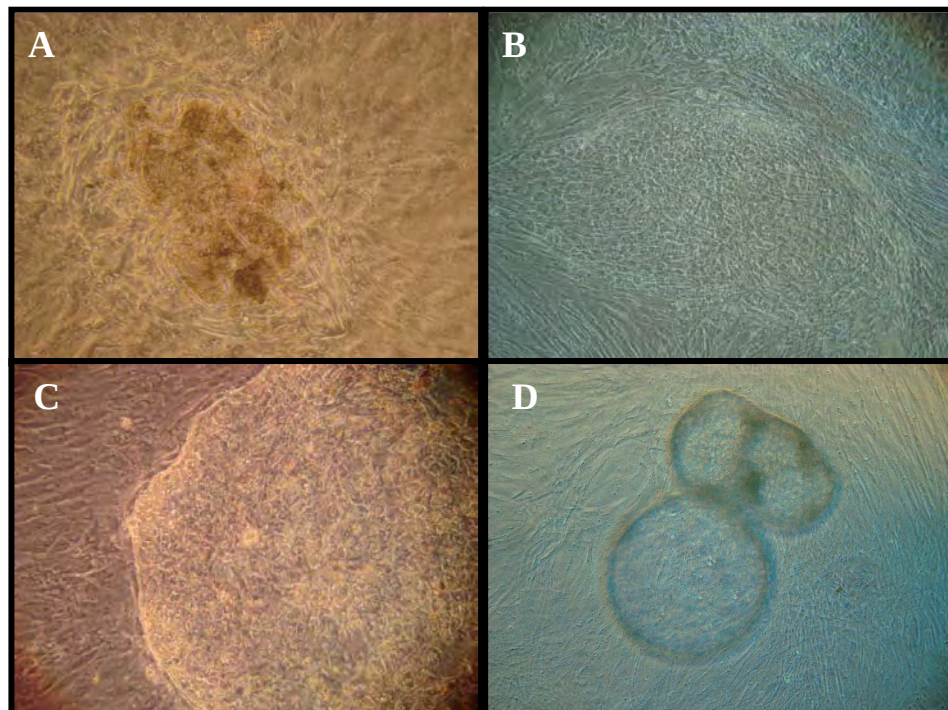
376



377

378 **Figure 4:** Immunostaining of equine ESC colonies obtained from fresh embryos showing staining
379 for TRA-1-60 (A) and TRA-1-81 (B). Magnification 10X.

380



381

382 **Figure 5:** Equine ESC colonies. A- Two days after ICM isolation (Magnification 10X). B- Four days
383 after ICM isolation (Magnification 10X). C- Five days after isolation (Magnification 20X). D- Cystic

384 structures formed after ICM isolation and passages, resembling embryoid bodies (Magnification
385 10X).

386

387