

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**OBTENÇÃO, MANUTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE
CÉLULAS-TRONCO EMBRIONÁRIAS EQUINAS.**

CAMILA BIANCO DAS DORES

Botucatu – SP

2009

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**OBTENÇÃO, MANUTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE
CÉLULAS-TRONCO EMBRIONÁRIAS EQUINAS.**

CAMILA BIANCO DAS DORES

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina e Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária

Departamento:

Reprodução Animal e Radiologia Veterinária

Orientador:

Prof. Dra. Fernanda da Cruz Landin e Alvarenga

Botucatu - SP

2009

Dores, Camila Bianco

Obtenção, manutenção e caracterização de células –tronco embrionárias equinas /
Camila Bianco Dores. - - Botucatu: UNESP / FMVZ, 2009.
91 f. : il. ; 31 cm

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, 2009.

Orientador: Fernanda da Cruz Landim e Alvarenga

1. Células-tronco embrionárias. 2. Equinos. 3. Oct-4. 4. Título

Nome do Autor: Camila Bianco das Dores

Título: OBTENÇÃO, CULTIVO E CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE
CÉLULAS-TRONCO EMBRIONÁRIAS

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof^aDr^a Fernandada Cruz Landim e Alvarenga

Presidente e Orientadora

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária

FMVZ – UNESP – Botucatu

Prof.Dr. Rogério Martins Amorim

Membro

Departamento de Clínica Veterinária

FMVZ – UNESP – Botucatu

Prof.Dr. José Antonio Visintin

Membro

Departamento de Reprodução Animal

FMVZ – USP – São Paulo

Data da Defesa: 3 de julho de 2009.

*Dedico a meus pais, que me ensinaram a nunca desistir
apesar das dificuldades e sempre buscar alternativas para realizar
meus sonhos.*

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais e irmãos que, com muito carinho, apoio e paciência não mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa de minha vida,

Aos meus avós que estarão presente em mais uma conquista,

À professora e orientadora Fernanda pela compreensão e incentivo que tornaram possível a conclusão deste projeto.

Â todos meus amigos que me ouviram durante horas, falando sobre assuntos dos quais não tinham a menor idéia.

A todos aqueles que fizeram os três anos de Botucatu mais aconchegantes e tornaram não só a Faculdade como também a cidade minha casa.

Aos meus colegas do Departamento, pelas experiências, risadas, almoços, cafés, companhia durante manhãs, tardes e às vezes noites no Posto de Monta.

Ao Zeca por estar presente em todos os momentos, sempre atento me observando e foi capaz de compreender todas as vezes que não pude levá-lo passear,

E especialmente ao Professor Doug Antczak que me ensinou tanto em tão pouco tempo, e mostrou como ser uma pessoa melhor.

Muito Obrigada!!!!

*"É melhor tentar e falhar,
que preocupar-se e ver a vida passar;
é melhor tentar, ainda que em vão,
que sentar-se fazendo nada até o final.*

*Eu prefiro na chuva caminhar,
que em dias tristes em casa me esconder.*

*Prefiro ser feliz, embora louco,
que em conformidade viver"*

Martin Luther King

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Fragmento de pele de eqüino e cultivo posterior de fibroblastos em confluência.....	45
Figura 2	Retirada dos fetos murinos e cultivo posterior de fibroblastos em confluência.....	46
Figura 3	Monocamada de fibroblastos murinos inativados por mitomicina e radiação Gama	48
Figura 4	Separação mecânica da massa celular interna de blastocisto.....	49
Figura 5	MCI isoladas do grupo I que não aderiram na well em diferentes momentos de cultivo.....	50
Figura 6	MCI do grupo I com crescimento até o quarto dia e início de morte celular a partir do quinto	51
Figura 7	Cultivos contendo células com morfologia anômala de crescimento exacerbado em diferentes períodos	52
Figura 8	MCI do grupo I com proliferação celular sem alteração morfológica até o dia 14 de cultivo.	52
Figura 9	Corpos embrióides formados 24 horas após a adição da MCI na well	53
Figura 10	Etapas da extração da MCI por imunocirurgia.....	54

Figura 11	MCI do grupo II com crescimento no dia 6 e perda da aderência subsequente a retirada de células diferentes morfológicamente...	55
Figura 12	Cultivo primário de MCI do grupo II até o dia 18 antes do repique.....	56
Figura. 13	Aspiração da MCI por Micromanipulação.....	57
Figura 14	MCI aspiradas em diferentes momentos de cultivo.....	58
Figura 15	Cultivo do grupo I no dia 14 e formação de corpos embrióides.....	59
Figura 16	Cultivos da MCI do Grupo II.....	60
Figura 17	1ª Passagem do Cultivo Primário de MCI do Grupo II	61
Figura 18	Diferentes momentos de cultivo da 2ª Passagem.	62
Figura 19	Gel de Agarose 1% com amplificação dos resultados obtidos pela. RT-PCR do gene SDHA.	73
Figura 20	Gel de Agarose 1% com amplificação dos resultados obtidos pela RT-PCR para detecção do gene Oct-4.....	74
Figura 21	Alinhamento da sequência dos clones ampliados obtidos a partir do produto da RT-PCR para Oct-4.....	75
Figura 22	Marcação in situ de embrião com Anticorpo anti OCT-3/4 ...	76

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Distribuição dos embriões obtidos nos grupos de isolamento da MCI.....	47
TABELA 2: Cultivo de MCI submetidas ao Isolamento Mecânico.....	48
TABELA 3: Cultivo de MCI submetidas ao Isolamento por Imunocirurgia ...	56
TABELA 4: Resultados do desenvolvimento do cultivo da MCI nos diferentes grupos, avaliados segundo: adesão, cultivo primário e repiques celular.....	60

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

bFGF	Fator Básico de Crescimento de Fibroblasto
BMP	Proteínas Morfogenéticas Ósseas
cDNA	Ácido Desoxirribonucléico Complementar
CF	Concentração Final
CI	Concentração Inicial
CT	Células-Tronco
CTE	Células-Tronco Embrionárias
CTG	Células Tronco Germinativas
CTS	Células Tronco Somáticas
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
EDTA	Etilenodiaminotetra Acético
EPE	Extrato de Pituitária Equina
hCG	Gonadotrofina Coriônica Humana
IM	Intramuscular
IPS	Células Pluripotentes Induzidas
LIF	Fator Inibidor de Leucemia
MAPK-	Proteína Kinase Mitógeno-ativada
MCI	Massa Celular Interna
MO	Medula Óssea
NCBI	National Center for Biotechnology Information

PBSA	Solução Tampão Fosfato Sem Cálcio E Magnésio
PCR	Reação em Cadeia pela Polimerase
RNA	Ácido Ribonucléico
RT-PCR	Transcriptase Reversa-Reação em Cadeia pela Polimerase
SFB	Soro Fetal Bovino
SSEA-1	Antígeno Estágio Específico 1
TGF β	Fator Transformador de Crescimento β
VF	Volume Final
VI	Volume Inicial

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	18
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	Erro! Indicador não definido.
3 OBJETIVOS.....	35
CAPÍTULO I	
ISOLAMENTO E CULTIVO DA MASSA CELULAR INTERNA.....	36
1 MATERIAIS E MÉTODOS	36
2. RESULTADOS.....	44
3 DISCUSSÃO.....	64
4 CONCLUSÕES.....	69
CAPITULO II	
CARACTERIZAÇÃO DO CULTIVO DA MCI	70
1 MATERIAIS E MÉTODOS	70
2 RESULTADOS.....	74
3 DISCUSSÃO.....	78
4 CONCLUSÕES.....	81
CAPÍTULO III	
CONSIDERAÇÕES FINAIS:	82
REFERÊNCIAS	84

Resumo:

DORES, C.B. **Obtenção, cultivo e caracterização genética de células-tronco embrionárias equinas.** [Establishment of a protocol to culture, maintain and characterize equine embryonic stem cells]. 2009. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2009.

A característica inerente às células-tronco embrionárias de se manterem estáveis durante longos períodos de cultivo possibilita que um grande número de células indiferenciadas sejam utilizadas em procedimentos terapêuticos ou realização de pesquisas. Aproximadamente 97 doenças genéticas equinas têm alta homologia com defeitos genéticos de humanos. O estudo de CTE de animais ungulados é útil no estudo de biofarmacos, engenharia genética e elucidação da embriogênese. Trabalhos sobre o isolamento, cultivo e caracterização do perfil genético de CTE equinas são escassos na literatura. No presente estudo, três diferentes métodos do isolamento da MCI foram testados em blastocistos equinos, avaliando o potencial de derivação de linhagens e a expressão do gene Oct-4: 1) separação mecânica (n=26), 2) imunocirurgia (n=6), 3) aspiração por micromanipulação (n=4). Todas as MCI foram cultivadas nas mesmas condições: monocamada de fibroblastos inativadas, meio DMEM/F12 suplementado com LIF, soro fetal bovino, aminoácidos não essenciais, sódio piruvato, l-glutamina e 2-mercaptoetanol. A eficácia do isolamento da MCI e o estabelecimento de linhagens foram avaliados quanto à adesão, aspectos morfológicos dos agregados celulares e velocidade de crescimento. As linhagens estabelecidas foram caracterizadas pela expressão do gene Oct-4 e Nanog. Nenhuma das MCI isoladas do grupo 3 aderiram à placa, e todas morreram entre 48 e 72 horas de cultivo. No grupo 1, uma MCI apresentou crescimento satisfatório apenas durante o cultivo primário. Colônias foram estabelecidas no grupo 2 e, após a segunda passagem, as células foram avaliadas e congeladas. Utilizou-se a RT-PCR

para a detecção da expressão dos genes Oct-4 e Nanog em amostras de CTE, anel coriônico e fibroblastos fetais equinos. Todas as amostras expressaram o gene Oct-4, mostrando que o gene é expresso em células da MCI, assim como em tecidos derivados do trofoblasto. Por falha no desenho do primer Nanog, não houve a amplificação desse gene. O presente estudo mostrou que 1) a imunocirurgia foi o melhor método de isolamento de MCI, com 16.7% de aproveitamento de blastocistos, 2) as CTE equinas apresentam morfologia similar às CTE humanas, 3) o Oct-4 é expresso em células da MCI e tecidos extraembrionários, não sendo exclusivo de células indiferenciadas.

Palavras Chave: células - tronco embrionárias, equinos, oct-4.

ABSTRACT

DORES, C.B. Establishment of a protocol to culture, maintain and characterize equine embryonic stem cells.[Obtenção, manutenção e caracterização do cultivo de células tronco embrionárias equinas] 2009. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2009.

The ability of Embryonic Stem cells to be maintained during extended culture periods would support the existence of large pools of undifferentiated stem cells for therapeutic and research applications. Approximately 97 equine genetic diseases have high homology to human genetic defects. ES cell lines from domestic ungulates would also be useful for disease resistance, for biopharming, and in genetic engineering. Studies of the isolation of equine embryonic stem cells and their genetic expression are quite limited. In the present study three different experimental approaches were used for ICM isolation from day 8 blastocysts and further ES cell line derivation and OCT-4 and Nanog expression: 1. Mechanical Process (26), 2. Immunosurgery (6) and 3. Aspiration of the ICM (4). All the ICM were maintained at the same conditions: under inactivated murine fibroblast feeder support in medium supplemented with Leukemia Inhibitor Factor, Fetal Calf Serum, Non essential amino acids, Sodium Pyruvate, L-Glutamine and 2-Mercaptoethanol changed every 24 hours. The colonies were evaluated by attachment, size and shape, type of cells and rate of growth. In addition, established ES cell colonies were characterized by OCT-4 expression. Only ICM outgrowths and colonies containing circular, small, and high ratio nucleo:cytoplasm cells were considered and passaged. None ICM from group 3 attached and all died after 48 to 72 hours after isolation. In group 1, one ICM had successful development but died after the first passage. Colonies were established from group 2. And after proliferation for 2 passages the cells were analyzed and frozen. RT-PCR was performed to evaluate the OCT-4 expression from ES cells, fetal fibroblast and day 32-34 chorionic girdle samples. All samples were positive for OCT-4

expression, showing that the OCT-4 is expressed in both ICM cells and the trophectoderm derived cells. Due to an error designing the Nanog primer there is no data from its expression. The present study demonstrated that immunosurgery was the best method to extract ICM from the equine blastocyst. The recovery rate from the group was 16.7%. Equine ES like cells have similar morphology to human ES like cells. Oct-4 gene is also expressed by proliferating ES like cells and extra embryonic tissues like chorionic girdle. Despite being considered a characteristic of ES cells, Oct-4 expression does not appear to be exclusive to undifferentiated ES cells in the horse.

Key Words: Embryonic Stem Cell, Equine, Oct-4

1. INTRODUÇÃO

As células-tronco embrionárias são pluripotentes, isto é, a partir do estágio indiferenciado, podem transformar-se em qualquer tipo celular originado a partir de uma das três camadas germinativas (ectoderme, mesoderme e endoderme). Também são capazes de renovar-se ilimitadamente, mantendo seu cariótipo estável sem entrar em senescência. Representam enorme potencial como fonte provedora, *in vitro*, dos mais variados tipos celulares para a realização da terapia celular, teste de novas drogas e estudo de sua toxicidade, bioengenharia genética e compreensão completa do processo de embriogênese.

A terapia celular visa à recuperação de tecidos e órgãos lesionados pela introdução de novas células, já diferenciadas, capazes de colonizar as áreas afetadas e restabelecer a função comprometida, representando uma nova alternativa ao tratamento de doenças degenerativas, congênitas e traumas das mais variadas etiologias.

É essencial para o aprimoramento e diferenciação celular, conseqüentemente para o sucesso das terapias e tratamentos, que se domine a manutenção e caracterização do cultivo das células tronco embrionárias.

Existem muitos estudos sobre o cultivo de células-tronco embrionárias de murinos e primatas, no entanto, pouca informação para a espécie equina. Desta forma, este experimento objetiva o desenvolvimento de uma metodologia

adequada para obtenção, manutenção e caracterização de células tronco embrionária de equinos.

2. REVISÃO DA LITERATURA

A deficiência celular e a incapacidade de substituir células que não desempenham sua função perfeitamente são as causas primárias de muitas doenças que diminuem o tempo e a qualidade de vida dos seres humanos, como: diabetes, doenças neurodegenerativas, falhas cardíacas, desordens hematológicas, osteoartrite, falência renal, casos de cegueira entre outras. A possibilidade de produzir números significativos de um mesmo tipo celular é essencial para que se iniciem terapias de substituição ou reparação tecidual. Produzir novos tecidos a partir de células tronco do próprio paciente propicia uma ferramenta potente capaz de driblar ações do sistema imunológico auferindo-se maior sucesso nos tratamentos (PARK et al, 2008).

O primeiro transplante de células tronco em humanos foi feito por Thomas et al. (1957), em gêmeos univitelinos, para tratamento de leucemia e serviu como base para incitar o uso de células presentes na medula óssea no tratamento de doenças agudas e crônicas como: linfoma, mielodisplasia, mielofibrose e carcinoma de células renais (SINGEC et al., 2007).

O conceito de células-tronco, como é conhecido hoje, no entanto só foi estabelecido em 1963 quando Ernest McCulloch e James Till, do Instituto do Câncer de Ontário, descreveram um tipo celular presente na medula óssea com capacidade de autorenovação.

As células-tronco podem ser encontradas em embriões, fetos e adultos. São células que, em condições adequadas, podem reproduzir-se por longos períodos e, no caso das adultas, ao longo da vida de um organismo. Sua

principal característica é poder, a partir do estado indiferenciado, transformar-se em tipos celulares diversos. Embora se classifiquem as células-tronco de maneira diversificada, uma descrição clara e objetiva foi proposta por Mingroni-Netto & Dessen (2006), em que as CT podem ser subdivididas a partir de dois critérios: seu grau de potencialidade ou de local de origem.

Quanto a potencialidade, mensurada em graus, e que corresponde à capacidade de gerar diferentes linhagens celulares, as células podem ser classificadas em:

- totipotentes: aquelas que, isoladas, são capazes de gerar por si só outro indivíduo completo, incluindo os tecidos placentários,
- pluripotentes: capazes de diferenciar-se em todos os tecidos do corpo humano, exceto nos anexos embrionários (placenta),
- multipotentes: também chamadas de células-tronco adultas, são portadoras de um potencial de diferenciação mais restrito, limitado a apenas alguns tipos celulares, são encontradas em estágios posteriores do desenvolvimento fetal e persistem após o nascimento,
- unipotentes: capazes de gerar só um tipo de célula, responsáveis pela regeneração de tecidos particulares, por exemplo; células da camada germinativa da epiderme, eritroblastos, células do fundo das criptas de Liberkham no duodeno, espermatogônicas no testículo etc.

Quanto ao local de origem, as células tronco podem ser classificadas como:

- embrionárias: como o próprio nome diz, são aquelas isoladas do embrião. Elas constituem a massa celular interna do blastocisto. O que estabelece seu potencial de diferenciação é a fase em que se encontra o embrião quando as células são isoladas. Sendo assim, quanto mais jovem o embrião, mais indiferenciadas serão suas células. Geralmente são consideradas células tronco embrionárias (CTE) aquelas encontradas na massa celular interna (MCI) de embriões pré-implantados, possuem a capacidade de multiplicar-se infinitamente *in vitro*, mantendo o cariótipo estável e normal, e estão aptas a se diferenciar em qualquer dos 200 tipos de células originados a partir dos três tipos de tecidos embrionários germinativos: endoderme, mesoderme e ectoderme,

- adultas: são células multipotentes encontradas na MO, sangue de cordão umbilical, sangue periférico, polpa dentária, alguns órgãos, como o pâncreas e o fígado, e em diversos outros tecidos do corpo humano (tecido adiposo, pele etc.). Em geral são raras e de difícil isolamento, com exceção das células da MO. As células tronco adultas não estão presentes em quantidades suficientes para transplantes e não podem ser cultivadas infinitamente sem sofrerem alterações (HEIDERSBACH et al, 2006).

À medida que o embrião se desenvolve e a organogênese é iniciada dois novos tipos de células-tronco podem ser encontrados: as germinativas (CTG) e as somáticas (CTS). Têm capacidade de diferenciação restrita, dão origem a tecidos específicos, e têm autorenovação infinita (FUCHS et al., 2004).

O primeiro cultivo de células tronco embrionárias obtidas a partir de blastocistos murinos foi descrito por Martin Evans e Matthew Kaufman, Universidade de Cambridge, em 1981 fornecendo a base necessária para que as CTE humanas fossem isoladas no futuro.

Em 1994, Bongso et al reportaram o cultivo e manutenção de CTE humanas, obtidas a partir de embriões fertilizados in vitro. O número de passagens e o tempo de manutenção da linhagem foram pequenos, apesar de a linhagem ter sido comprovada como pluripotente.

Em 1995, Thomson et al isolaram a primeira linhagem de CTE de primatas no macaco rhesus, seguida, em 1998, do isolamento e criação da primeira linhagem de CTE humanas imortalizada. O cultivo primário da linhagem de CTE humanas não apresentou diferenças com o realizado em 1981 por Evans and Kaufman, sendo a trofoderme retirada com o auxílio da imunocirurgia e plaqueada sobre uma monocamada de cocultivo composta de fibroblastos fetais murinos.

Pesquisas subsequentes foram e ainda são realizadas para a compreensão das características de cultivo, crescimento e diferenciação das CTE em diversas espécies.

Em 2006, Shinya Yamanaka, da Universidade de Kyoto, e James Thomson, da Universidade de Wisconsin, a partir da transfecção de genes característicos de células embrionárias em células diferenciadas, como fibroblastos, conseguiram que as células transfectadas apresentassem

características morfológicas, bioquímicas e epigenéticas similares às CTE. Essas células foram denominadas células-tronco induzidas (IPS).

Yamanaka transfectou os genes Oct3/4, Sox2, Klf4, e c-Myc em fibroblastos da pele, nesse método, c-Myc e Klf4 podem ser associados à modificação da estrutura da cromatina permitindo que o Oct3/4 e Sox2 se liguem a seus receptores. Thomson transfectou fibroblastos com os genes Oct4, Sox2, Lin28, e Nanog. O Lin28 e Nanog mostraram melhorar a eficiência de clonagem e recuperação celular. Ambos os trabalhos provaram que as células criadas foram capazes de diferenciar-se nas três linhagens germinativas e serem mantidas *in vitro*.

As IPS aparecem como área promissora no estudo das CTE eliminando problemas de escassez de embriões e questões éticas. A elucidação do perfil das CTE para a avaliação e comparação dos resultados obtidos com o estudo das IPS e o comportamento natural das células indiferenciadas, no entanto, é essencial para a evolução das pesquisas.

As células-tronco permanecem maior parte do tempo na fase S do ciclo celular, sintetizando DNA, diferentemente das somáticas diferenciadas que não necessitam de estímulo externo para iniciar sua replicação (FRIEL et al, 2005).

As CTE crescem aderidas à superfície da placa e necessitam de fatores, muitos ainda desconhecidos, para manterem-se indiferenciadas. Todas as linhagens embrionárias disponíveis comercialmente foram cultivadas primariamente na presença de monocamadas de fibroblastos murinos.

Fibroblastos secretam promotores da manutenção do estado indiferenciado como o fator de crescimento de fibroblasto (FGF), fator transformador de crescimento β (TGF β), activinas, proteínas WNT e antagonistas da sinalização de proteínas morfogenéticas ósseas (BMP) que promovem a manutenção do estado indiferenciado.

No cultivo de CTE humanas a monocamada de fibroblastos murinos pode ser substituída por células do parênquima da glândula mamária, fibroblastos fetais, células endometriais uterinas, células musculares fetais e epiderme adulta de humanos (UNGER et al, 2008).

Existem matrizes disponíveis comercialmente que permitem o cultivo livre de monocamadas de cocultivo, como Matrigel BD® que, no entanto elas só podem ser utilizadas após uma adaptação das linhagens previamente expostas. Como são produzidas a partir de células murinas, essas matrizes não eliminam o risco de xenocontaminação.

Desde 1998, quando a primeira linhagem de CTE humanas foi isolada tem-se utilizado a adição de bFGF para a manutenção da indiferenciação. O mecanismo de ação desse fator de crescimento não é bem elucidado, mas acredita-se que atua na fosforilação da tirosina de várias proteínas e ativação da sinalização extracelular das kinases ERK1/2 (VALLIER et al, 2005).

No cultivo das CTE murinas, a monocamada pode ser substituída pela adição do fator inibidor de leucemia (LIF) no meio contendo soro fetal. A LIF é uma glicoproteína solúvel, que atua na heterodimerização dos receptores LIFR e GP130, do que resulta a ativação de um receptor associado a uma Janus

kinase (JAKS); induz o recrutamento de receptores como o SH2 que fosforila proteínas como a pSTAT3, a qual promove a translocação nuclear e a ativação dos fatores de transcrição STAT3 e STAT1, responsáveis por manter a autorenovação nas células embrionárias mediando a ativação mitótica da proteína kinase (MAPK) (DAVEY et AL., 2007).

A adição de LIF ao cultivo de células embrionárias humanas é insuficiente para manter a indiferenciação celular (THOMSON et al, 1998). A via de ativação da LIF atua em espécies que apresentam a diapausa no desenvolvimento embrionário, isto é; ocorre uma suspensão no desenvolvimento embrionário por um período, o que não acontece nos primatas. De fato, Ginis et al (2004) demonstraram, utilizando a reação em cadeia pela polimerase (PCR) e a imunomarcacão *in situ*, que linhagens de células embrionárias humanas apresentam ausência de receptores LIFR e da proteína GP130, ou pequena quantidade destes.

Na tentativa de contornar desafios biológicos e éticos que envolvem o estudo das CTE, a literatura apresenta métodos capazes de aperfeiçoar o isolamento da MCI e condições de cultivo dessas células.

Para isolar a MCI, os métodos conhecidos são todos vertentes de três protocolos mais utilizados e com resultados já repetidos em diferentes laboratórios: Imunocirurgia, isolamento por separação mecânica e isolamento por microcirurgia

A Imunocirurgia foi a primeira técnica utilizada no isolamento da MCI, permitindo isolar seletivamente a MCI do blastocisto. Descrita em 1975 por

Solter e Knowles, ela consiste em incubar o embrião em uma solução com anticorpos anti-humanos (ou de acordo com a espécie do embrião). A penetração dos anticorpos no interior do embrião é bloqueada pela forte aderência e comunicação entre as células da camada externa da trofoderme. Após a retirada e lavagem dos anticorpos, o embrião é incubado em uma nova solução com complemento até que as células da trofoderme sejam destruídas e a MCI possa ser retirada e colocada em cultivo. A eficácia dessa técnica é de 16% a 20% (STROM et al, 2007).

Apesar de a imunocirurgia ser muito utilizada na derivação de novas linhagens e ser um procedimento simples e pouco dispendioso, ela utiliza produtos derivados de origem animal tornando inadequadas as CTE obtidas para a realização do transplantes.

O isolamento por separação mecânica foi descrito em 2005 por Simon et al e consiste no corte do embrião pela utilização 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.

Cortez et al (2008) desenvolveram uma nova técnica visando à obtenção de células pluripotentes sem a utilização de qualquer produto com proteínas animais. Associaram a separação mecânica e a ação de *laser* para romper o embrião e retirar a MCI; após cultivarem o embrião intacto isolaram a MCI com

auxílio da *laser Drilling* e obtiveram aproveitamento de 16% no estabelecimento de novas linhagens murinas.

A principal objeção e obstáculo ético no estudo de CTE é a privação do desenvolvimento embrionário, uma vez que a MCI é extraída. Em 2008, um grupo coreano liderado por Chung utilizou técnica similar à biópsia de blastômeros no desenvolvimento de linhagem embrionária humana com a manutenção do embrião.

Atualmente estão registradas no National Institute of Health (NIH) 78 diferentes linhas de CTE humanas, das quais apenas 21 estão disponíveis comercialmente.

No cultivo de CTE, o principal desafio é desenvolver uma linhagem que seja livre da presença de qualquer produto de origem animal, desde seu cultivo primário até o estabelecimento e manutenção da linhagem, tornando-a própria para uso em terapias celulares.

A presença de material imunogénético, o risco da transmissão de vírus ou príons no material cultivado e a dificuldade do controle de qualidade e padrão do material de origem animal são os principais entraves a sua utilização. Até hoje só foi possível alterar as condições de cultivo após as células já terem sido previamente expostas à produtos e células de origem animal.

Células-tronco embrionárias de diferentes espécies, além de apresentarem a capacidade de renovar-se infinitamente e de diferenciar-se em

qualquer das três linhagens embrionárias celulares, têm também propriedades como a alta atividade da fosfatase alcalina e da telomerase, e uma alta proporção núcleo/citoplasma (DONAVAN e GEARHART, 2001).

Linhagens de células pluripotentes já foram isoladas em espécimes como galinha (PAIN et al, 1996), hamster (DOETSCHMAN et al, 1988), coelho (SCHOONJANS et al, 1996), rato (BRENIN et al, 1997), porcos (NOTARIANNI et al, 1991), cavalo (SAITO et al, 2002) entre outros. No entanto são consideradas CTE-Like, por não apresentarem todas as características já demonstradas em murinos, especialmente a formação de quimeras (BREVINI et al, 2007).

Apesar de compartilharem similaridades quanto a morfologia e alguns marcadores de superfície celular e de expressão gênica, as CTE possuem características únicas em cada espécie. As CTE 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, 2005).

A taxa de crescimento dessas células também difere entre as espécies: apesar de não haver dados na espécie equina, o tempo para que a espécie murina dobre é de 12-15 horas (CRISTOFALLO et al, 1998) e na espécie humana chega a 60-70 horas (COWAN et al, 2004).

Uma vez obtido o isolamento da MCI e cultivo de células CTE, 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.

Uma das formas de confirmar a pluripotência celular das linhagens estabelecidas é a indução de teratomas em camundongos imunodeprimidos. Consiste em inocular uma solução com alta concentração de CTE em camundongos imunocomprometidos e observar a formação de teratoma durante as 12 semanas seguintes.

O potencial pluripotente pode também ser avaliado *in vitro*. Ao cultivar as CTE em suspensão, elas devem formar agregados tridimensionais de células diferenciadas denominados corpos embrióides, cujo cultivo por longos períodos resulta na formação de uma variedade de tecidos formados a partir das linhagens embrionárias como células hematopoiéticas, musculares, linhagens neuronais (SCHULDINER et al, 2000).

Outro método alternativo e mais simples de verificar a diferenciação espontânea é o cultivo por um período superior a sete dias sem que as células sejam replicadas (HEINS et al. 2004).

A comunidade científica diverge quanto ao perfil genético das CTE, visto que, em uma mesma espécie, linhagens apresentam grau de heterogeneidade quanto a sua capacidade de diferenciação e expressão gênica, bem como diferentes respostas quando submetidas aos mesmos tratamentos. (RAMALHO-SANTOS et al, 2002, HOFFMAN E CARPENTER, 2005 e ALLEGRUTTI E YOUNG, 2007).

Acredita-se que a diferença nos protocolos em que são primariamente cultivadas seja a causa dessa variabilidade e alterações na expressão gênica encontradas na análise por microarrays.

COWAN et al (2004) estabeleceram que a pluripotência é mantida primariamente pelos genes: POU5F1 (denominado de Oct-4), Sox2 e Nanog, são ativados por fatores de transcrição próprios que também se ligam à genes responsáveis em codificar componentes que irão inibir vias essenciais para que o desenvolvimento e especificação celular ocorra.

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

O Nanog é um gene que contém Homeobox para manutenção da pluripotência, não está diretamente relacionado com o Oct-4 e previne as células de se diferenciarem em endoderme extraembrionárias (CHAMBERS et al, 2003). Sua hiperexpressão permite o crescimento em sistemas livres do cocultivo e melhora a eficiência na produção de células clones (DARR et al. 2006). Tanto em humanos como em camundongos sua supressão induz a diferenciação para tecidos extraembrionários (HYSLOP ET AL, 2005).

Há necessidade de informações pormenorizadas sobre CTE equinas, o que torna difícil a comprovação da pluripotência de uma linhagem baseada apenas na expressão gênica conhecida.

As CTE da espécie equina apresentam marcadores em sua superfície da célula como antígeno estágio específico 1 (SSEA-1), além de serem caracterizadas por expressar o fator de transcrição STAT-3 e o Oct-4 (SAITO et al, 2002). Esse padrão de expressão difere do encontrado em camundongos e humanos, que, por sua vez também diferem entre si. O gene Oct-4 é considerado essencial na formação da MCI, pluripotência e renovação celular nas três espécies citadas.

Não existem na literatura dados sobre a expressão do gene Nanog em CTE 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 morfologia das CTE, similar entre as espécies, apresenta tamanho uniforme (10-15µm de diâmetro) e tem forma circular ou oval. A característica que melhor diferencia as CTE de outros tipos celulares é a presença de um núcleo evidente que pode conter de um a dois nucléolos circundados por um citoplasma agranular (ESHKIND et al., 2002).

O estudo e manipulação das CTE possibilitaram maior domínio e compreensão da diferenciação, interrelação existente entre os tipos celulares, a proliferação das células embrionárias, função dos genes e ciclo celular. Também favoreceram formações de modelos para que sejam realizados testes de novos fármacos e analisados seus efeitos teratogênicos e toxicidade, assim como criação de modelos de doenças genéticas em cobaias de laboratório (MONTROYA et al, 2005).

A maior expectativa no uso das CTE está no aprimoramento da terapia celular, sendo as CTE uma fonte renovável de células para realização de transplante de tecidos, substituição celular e terapia gênica, o que torna possível a substituição de tecidos lesionados por um processo natural de renovação celular, evitando reações indesejadas do sistema imunológico. (MOON et al, 2005).

Somente dois trabalhos versaram sobre o isolamento de CTE a partir de embriões equinos (LI et al, 2006 e SAITO et al, 2002).

O uso das CTE aparece como uma possibilidade promissora no tratamento regenerativo de atletas da espécie equina. Danos na cartilagem e ligamentos de cavalos não representam somente a limitação na carreira do animal, como também podem servir de modelo nas enfermidades humanas.

O estudo das CTE equinas auxilia a elucidação de enfermidades que acometem a espécie humana, como a osteoartrite, que nos eqüinos ocorre de forma natural e não induzida, diferentemente dos modelos experimentais murinos (TROUNSON et al, 2007). Aproximadamente 95 doenças genéticas que acometem equinos têm alta homologia com a espécie humana (Mendelian Inheritance in Animals Online, 2007).

Outro uso possível da manipulação genética das CTE equinas é a recriação de gametas de animais de alto valor. Além da aplicação clínica e pesquisa, as CTE podem elucidar um número ilimitado de processos fisiológicos relacionados aos grandes animais, utilizando o cavalo como modelo.

O cultivo de CTE também permite a criação de células deficientes *in vitro*, mimetizando o ambiente encontrado no organismo de um animal doente, situação esta que não só beneficia o estudo e desenvolvimento de novos fármacos, como permite compreender melhor a evolução de certas patologias.

O domínio da técnica de cultivo de células tronco embrionárias equinas é a primeira etapa para tornar possível a realização dos exemplos citados, uma vez que é essencial a manutenção das células indiferenciadas para a realização da pesquisa em qualquer área.

3. OBJETIVOS

3.1 Desenvolver metodologia para obtenção e cultivo de células-tronco embrionárias equinas a partir do botão embrionário, estabelecendo um protocolo padrão. Para tanto foram testados três métodos diferentes de isolamento da massa celular interna: dissecação mecânica, imunocirurgia e aspiração por micromanipulação; e dois métodos de inativação da monocamada de suporte analisando-se a eficácia dos métodos.

3.2 Caracterizar o cultivo embrionário através da confirmação da linhagem de células tronco embrionárias por meio de

3.2.1 Realização de passagens infinitas,

3.2.2 Expressão do gene OCT-4 e Nanog

CAPÍTULO I:

ISOLAMENTO E CULTIVO DA MASSA CELULAR INTERNA

1 MATERIAIS E MÉTODOS

O presente experimento foi desenvolvido em dois diferentes centros de pesquisa: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP, Campus Botucatu e no Baker Institute for Animal Health, College of Veterinary Medicine, Cornell University, Campus Ithaca. A disponibilidade de embriões para manipulação foi otimizada uma vez que se pode utilizar duas estações de monta no ano de 2008. O intercâmbio de informações entre os dois centros possibilitou que as dificuldades encontradas durante a realização do experimento fossem amenizadas.

1.1 Produção Das Células De Sustentação (Monocamada) Eqüinas

Fragmentos de aproximadamente 1mm³ de tecido epitelial de equinos adultos, foram retirados por biópsia de pele realizada na região do flanco . Os animais receberam anestesia local infiltrativa com 10ml de lidocaína.

Os fragmentos foram lavados em solução fisiológica por duas vezes, e colocadas em frasco de transporte com meio de Eagle modificado por Dulbecco's¹ em temperatura ambiente.

¹ DMEM, Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA

A amostra coletada foi processada em placas de Petri (60mm de diâmetro) com meio de cultivo. O tecido foi fragmentado em pedaços diminutos (média de $0,1 \text{ mm}^2$ cada pedaço) com o auxílio de duas lâminas 11 de bisturi tipo Bard-Paker. Os fragmentos foram lavados duas vezes com solução tampão fosfato sem cálcio e magnésio (PBSA), com pH 7,2 e posteriormente com solução de tripsina a 0,25% em PBSA e 1% de EDTA para obter a individualização celular.

. Os fragmentos semeados foram distribuídos em quatro frascos de cultivo de 25cm^2 previamente banhados com SFB e incubados durante meia hora em estufa a 37°C em atmosfera úmida contendo 95% de ar e 5% CO_2 , para favorecer sua aderência à superfície. Após esse tempo, foi adicionado meio com 10% de soro fetal bovino e 1% de solução antibiótica e antimicótica, cerca de 3 ml cada frasco, o suficiente para recobrir os fragmentos.

O acompanhamento do crescimento celular foi realizado a cada 24 horas por microscópio de observação direta, para detecção precoce de qualquer anomalia. Após sete dias foi realizada a primeira troca de meio de cultivo dos frascos. Uma vez que se iniciou o crescimento celular ao redor dos explants, o meio de cultivo foi renovado a cada três dias. Quando 70% do frasco de cultura estava coberto por células (subconfluência), foi realizada a passagem.

1.2 Produção Das Células De Sustentação (Monocamada) Murinas

As fêmeas foram sacrificadas no 14º dia de gestação, pela técnica de deslocamento cervical, o abdome foi lavado com álcool 70%, a pele cortada com instrumentos estéreis, o peritônio foi cortado e o útero retirado, e foi

colocado em uma placa. Os instrumentos foram trocados e o útero lavado três vezes em solução PBS com penicilina e estreptomicina. Após ser transferido para uma placa seca, o útero foi cortado e os embriões separados em outra placa; as vísceras dos fetos foram retiradas e as carcaças lavadas novamente com a solução PBS acrescida de antibióticos. Após a lavagem, as carcaças foram cortadas em pedaços pequenos durante cinco a dez minutos, tendo sido adicionados 5 ml de solução a 0,25% de tripsina e o material cortado por mais dois minutos e colocado na estufa de CO₂ por 20-30min. Após a retirada da estufa foi acrescido 20 ml de meio DMEM acrescido de 20% de SFB e Penicilina/Estreptomicina realizando-se então a neutralização da tripsina. O material foi dividido em garrafas de cultivo (calculou-se três embriões por garrafa) e incubado durante a noite. Após 24 horas, o meio foi trocado e as garrafas permaneceram em cultivo até atingir a confluência.

1.3 Manutenção do Cultivo

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 Versene² a 36° C. As garrafas foram mantidas em estufa a 38,5° C por no máximo 10 minutos, e até que todas as células se soltassem do fundo.

Realizou-se então a neutralização com meio DMEM acrescido de 20% de SFB e Penicilina/Estreptomicina. Uma amostra de 50 µl meio foi retirada e adicionada a 50 µl do corante Tripán Blue, com esta solução foi preenchida a

² Instituto Adolfo Lutz

Câmara de Neubauer e contadas as células translúcidas dos 4quatro quadrantes mais externos. As células azuis que permitem a passagem do corante estão mortas e as células translúcidas que estão vivas.

O valor encontrado foi colocado na fórmula abaixo:

$$\frac{\text{Nº células contadas} \times 2 \text{ (fator de diluição)} \times 10^4}{4 \text{ (quadrantes lidos)}}$$

O resultado obtido é 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).

1.3.1 Preparo Das Camadas De Sustentação Sobre Gelatina

Placas 4 well³ foram banhadas com 400µl de uma solução contendo gelatina de pele de suíno a 0.1 % em PBS-L autoclavada, previamente preparadas e mantidas em repouso a 37°C por duas horas na estufa. Após a remoção do excesso, as placas foram secas no fluxo laminar e as células depositadas na concentração de 5×10^4 cels/well.

1.4 Inativação Da Monocamada

- Uso da Mitomicina:

³ Nunc®

Após 24 horas na estufa os fibroblastos presentes na placa four well passaram por um processo de inativação. O meio foi trocado por solução DMEM com 10µg/ml de Mitomicina e as células foram incubadas por três horas. Em seguida, foram lavadas três vezes com PBS-L.

- Uso da Radiação Gama:

O bloqueio dos fibroblastos por irradiação foi realizado pelo Aparelho de irradiação do Baker Institute for Animal Health.

Após os fibroblastos terem atingido a confluência o tapete de células de cada garrafa foi suspenso e realizada a contagem de células viáveis em câmara de Neubauer. Após centrifugação, as células foram ressuspensas na concentração de 10^5 células/ml, armazenadas em tubos Falcon® e colocadas no aparelho por 36 minutos até receberem 3000 rads necessários para que o ciclo celular fosse bloqueado. Após o bloqueio, as células foram depositadas nas placas 4 well na concentração de 2×10^4 cels/well.

1.5 Obtenção Dos Embriões

1.5.1 Acompanhamento folicular e inseminação artificial

Foram utilizadas 18 éguas, em bom estado geral de saúde, com idades variando de 5 a 10 anos, massa corpórea entre 300 a 400Kg e com bom histórico reprodutivo. Esses animais foram mantidos em piquete com livre acesso a bebedouro coletivo, na fazenda experimental Edgárdia da UNESP, Campus Botucatu, bem como na Baker Institute for Animal Health, Campus Ithaca.

Os animais tiveram a dinâmica folicular avaliada todo dia por palpação retal e ultrassonografia até o folículo dominante atingir 35mm de diâmetro; sendo neste momento administradas 2000UI de hCG por via intravenosa, para acelerar o processo da maturação folicular e oocitária. Depois de detectado o momento próximo da ovulação e depois de ocorrida a ovulação, as fêmeas foram inseminadas duas vezes com dose refrigerada de 800×10^6 espermatozóides viáveis, em intervalos de 24 horas. Para otimizar a recuperação de embriões alguns animais foram submetidos a tratamentos superovulatórios com 9mg de extrato de pituitária equina EPE por via IM a intervalos regulares de 12 horas.

1.5.2 Coleta dos embriões

Os embriões foram coletados no oitavo dia após a segunda inseminação artificial nas doadoras (D8), pela da técnica não cirúrgica,

Após a identificação dos embriões, eles foram lavados dez vezes, por passagens sucessivas em gotas de meio de manutenção Emcare®⁴, previamente passadas por filtro de 0,22 μ m.

Foram obtidos 38 embriões no estágio de blastocisto e blastocisto expandido.

1.6 Isolamento Da Massa Celular Interna

⁴ Holding Solution, Ag. Research Ruakura, Nova Zelândia

1.6.1 Mecânico

A massa celular interna (MCI) foi isolada por microcirurgia, com auxílio de uma lâmina de bisturi sob estereomicroscópio (aumento de 10x).

Após o isolamento, a MCI foi transferida para a placa 4 well previamente preparada.

1.6.2 Imunocirurgia

Os embriões no estágio de blastocisto foram incubados em solução de tripsina 0,5% até que a cápsula fosse digerida; logo após foram incubados durante 90 minutos a uma temperatura de 38°C em solução PBS, contendo 10% de soro policlonal de coelho criado contra a membrana coriovitelínica de um feto equino de 21 dias. Os embriões foram então transferidos para uma solução PBS 5% com IgG de cabra anticoelho ⁵e incubados por 60 minutos; em seguida imersos por mais 60 minutos em solução PBS com 20% Complemento de Porco da Índia⁶. As MCI isoladas foram depositadas em placas 4 Wells contendo monocamada de fibroblastos murinos.

O soro de coelho contendo anticorpos antifetais foi gentilmente cedido por W.R. Allen do Departamento de Medicina Veterinária, Equine Fertility Unit, Mertoun Paddocks, University of Cambridge.

1.6.3. Aspiração por micromanipulação

⁵ Sigma®

⁶ Invitrogen®).

A micromanipulação foi realizada em microscópio invertido e utilizados embriões na estágio de Blastocisto Inicial. Os embriões foram previamente incubados em solução de Pronase a 0,1% para remoção da zona pelúcida/cápsula, e logo após foram lavados em PBS e submetidos à extração da MCI por Micro manipulação. Após fixar o blastocisto com a micropipeta de *holding* (45µm de diâmetro interno, Eppendorf®), houve perfuração com agulha (8µm de diâmetro interno, Eppendorf®) até que fosse possível aspirar a MCI. A micropipeta foi então movida para a placa 4 Wells contendo a monocamada de fibroblastos inativados murinos, depositando-se as células da MCI e aquela colocada na estufa. Foi colocada uma MCI por well

1.7 Sistema de Cultivo

As células permaneceram armazenadas à temperatura de 38°C em atmosfera controlada com 5% de CO₂ no ar.

O cultivo foi realizado em monocamada de suporte com fibroblastos murinos ou equino (20×10^4 cels/1.9cm²), utilizando meio de cultivo DMEM/F12 (Gibco®), suplementado com 15% SFB, penicilina G sódica 10000 UI e sulfato de estreptomicina 10.000µg/ml para cada 1ml de meio, 1% de aminoácidos não essenciais, 0,1mM de 2-mercaptoetanol, 0,1mm de sódio piruvat o e 1000U de LIF.

Nos dois métodos de cultivo (Fibroblastos murinos ou equinos) o meio foi trocado a cada 24 horas, e concomitantemente foi realizada a análise do cultivo avaliando a aderência da MCI, taxa de crescimento e aspectos

morfológicos das células utilizando o microscópio invertido por lentes objetivas de aumento 100, 200 e 400X.

1.8 Repique das Células-Tronco Embrionárias

Os blastômeros que aderiram à placa 4 Well e apresentaram multiplicação celular e desenvolvimento de colônias foram repicados mecanicamente com o auxílio de pipetas de vidro estéreis sob o estereomicroscópio (aumento de 10X) em fluxo laminar. Cada colônia foi dividida em três fragmentos e adicionadas em novas wells na concentração de dois fragmentos por well.

2. RESULTADOS

2.1 Qualidade E Inativação Da Monocamada De Suporte

Ambos os protocolos de inativação do ciclo celular foram eficazes em bloquear a divisão celular e impedir o crescimento de fibroblastos nas placas 4 Well.

O tratamento com raios gama teve resultados mais consistentes em relação ao uso de mitomicina, que apresentou grande variação entre as repetições realizadas.

As monocamadas inativadas com o uso da mitomicina apresentaram um período curto de aderência e viabilidade celular no cultivo. Os resultados variaram entre as wells nas quais os fibroblastos foram inativados, mesmo

tendo sido realizados sob as mesmas condições. As monocamadas começaram a soltar-se da placa após cinco a sete dias de cultivo.

O grupo de fibroblastos murinos submetidos à radiação gama possibilitou que o cultivo das MCI fosse realizado sem que houvesse necessidade de introduzir novas células para manutenção da monocamada; os fibroblastos permaneceram aderidos na placa até o término do cultivo ou realização de novo repique celular.

Ocorreu adesão da MCI e crescimento de agregados celulares sobre monocamadas de ambas as espécies, sendo que a MCI aderida no Grupo I estava na well cultivada com fibroblastos equinas e no Grupo II, o cultivo das células tronco embrionárias eqüinas foi realizado sobre fibroblastos de origem murina.

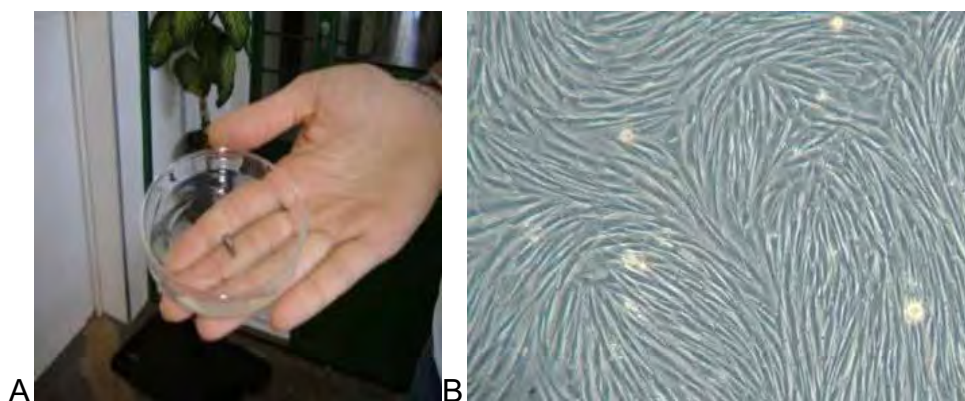


Figura 1: (A) Placa contendo fragmento de pele de equino.(B) Monocamada de fibroblastos em confluência (microscópio invertido com contraste de fase Ph 1, aumento de 400x).

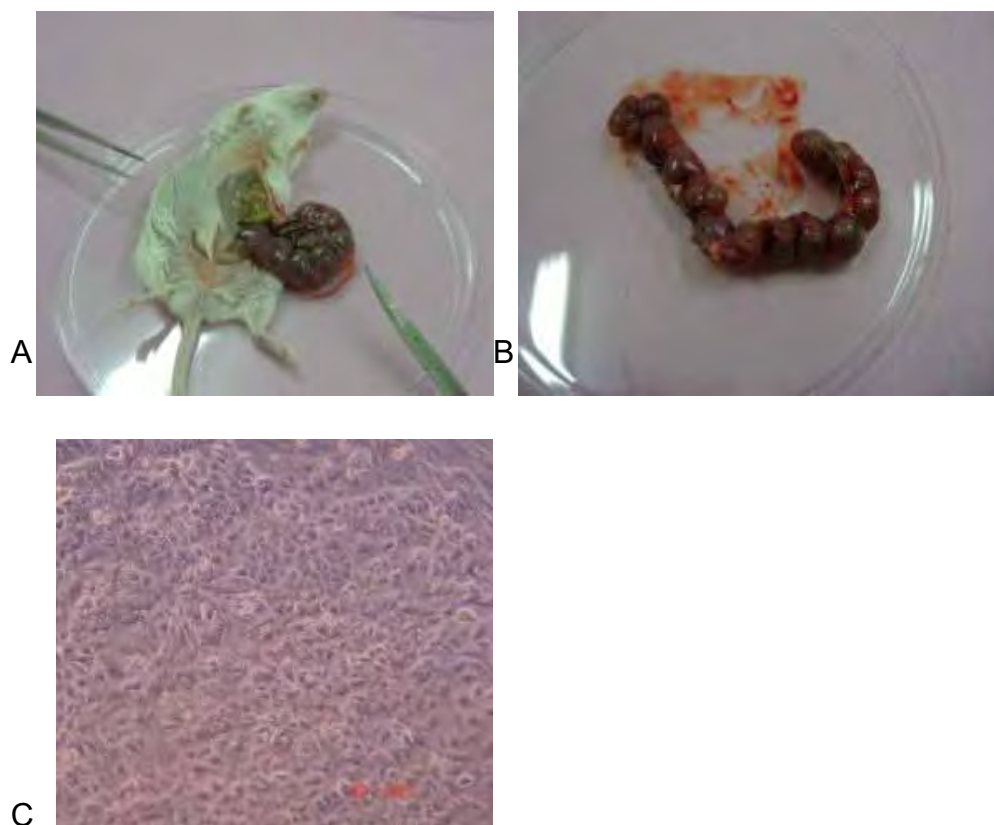


Figura 2: (A, B) Retirada dos fetos murinos para cultivo dos fibroblastos, (C) Fibrobalstos confluentes em cultivo visualizados no microscópio invertido com contraste de fase Ph 1, aumento de 200x.

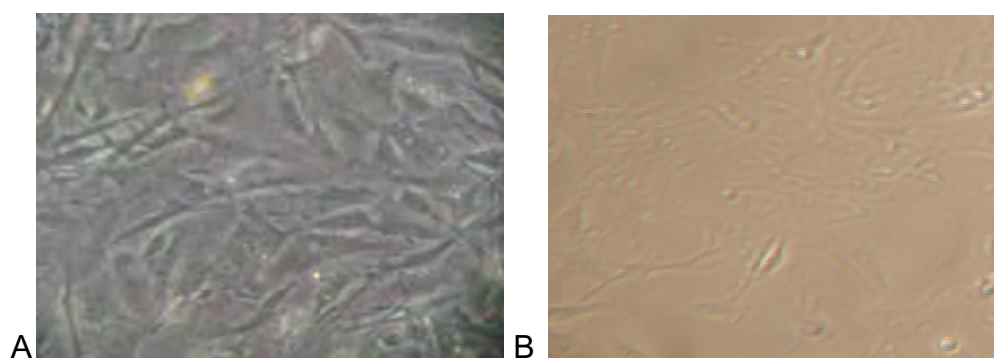


Figura 3: -Monocamada de fibroblastos murinos inativados- (A) Grupo Mitomicina na concentração de 5×10^4 cels/well (400X); (B) Grupo Radiação

Gama na concentração de 2×10^4 cels/well (200X, microscópio invertido com contraste de fase Ph 1).

2.2 Isolamento da MCI

A tabela 1 mostra os o número de embriões utilizados em cada um dos três métodos de isolamento da massa celular interna testados.

Tabela 1: Distribuição dos embriões obtidos nos grupos de isolamento da MCI

Grupo	Método De Isolamento	Blastocistos
1	Mecânico	26
2	Imunocirurgia	6
3	Aspiração	6
Total		38

- **Grupo I: Isolamento Mecânico:**

Neste grupo foram utilizados 26 embriões e os resultados obtidos estão representados na tabela 2.

Dez MCI não aderiram à placa, permanecendo em suspensão sem que ocorresse proliferação celular. Todas foram mantidas cinco dias em cultivo até que apresentassem coloração enegrecida e sinais de morte celular (Fig. 5).

Quatorze outras MCI apresentaram diferentes aspectos morfológicos durante o cultivo, variando quanto ao tamanho das células, formato, coloração e não apresentando padrões constantes. Apesar de inicialmente observar a aderência das massas á placa de cultivo, em muitas placas, após quatro a oito dias de cultivo, as células adquiriam coloração enegrecida e começaram a se soltar da placa (Fig.6).

Tabela 2: Cultivo de MCI submetidas ao Isolamento Mecânico

Número de MCI	Adesão	Características do Cultivo
10	Não aderiram	Suspenso e morte celular
14	Totale/ou Parcial	Heterogêneo em tamanho, morfologia e multiplicação celular
2	Total	Com características de ES e Formação de Corpos Embrióides

Em algumas placas, observou-se a presença de células com crescimento exacerbado e morfologia diferente de CTE sugerindo contaminação com outro tipo celular, possivelmente células de trofoblasto (Fig.7).

Duas MCI aderiram e apresentaram crescimento e morfologia de acordo com o encontrado na literatura. O tempo máximo obtido em cultivo neste grupo, foi de 14 dias, com formação de corpos embrióides após repique, sem que, fosse possível manter as células vivas em cultivo após o repique celular (Fig.8).

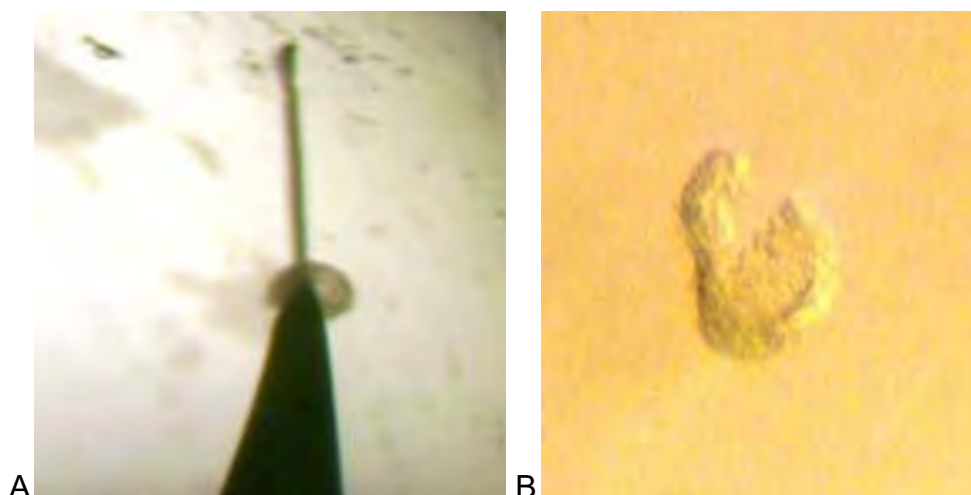


Figura 4: (A,) Separação da massa celular interna em aumento (4X microscópio estereoscópico), (B) Massa interna celular durante a separação.

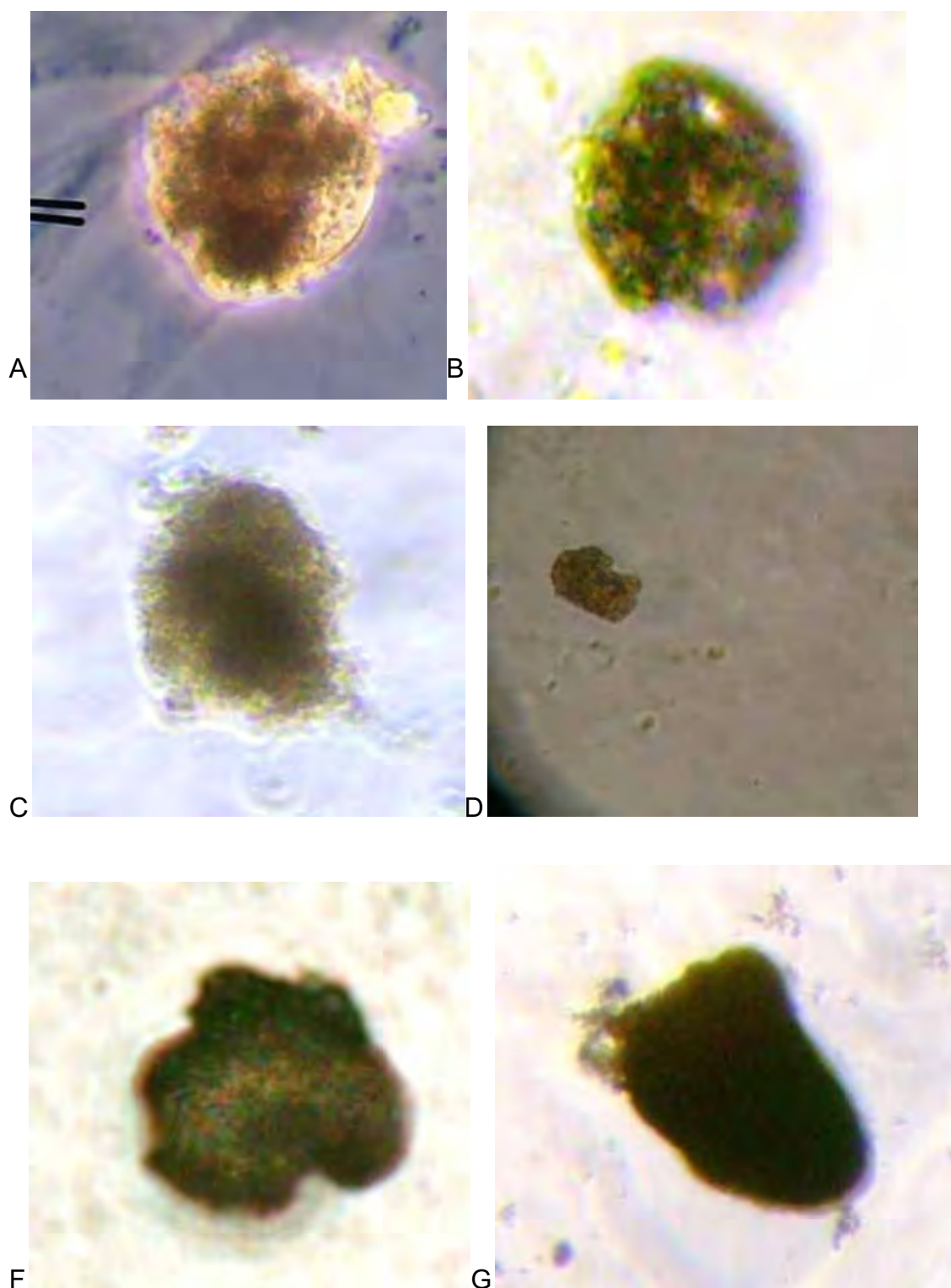


Figura 5 - MCI isoladas que não aderiram na well em diferentes momentos de cultivo- (A e B) dia 2, (C, D) dia 3, (E, F e G): dia 5 antes de serem descartadas. Aumento 400X em microscópio invertido com contraste de fase.

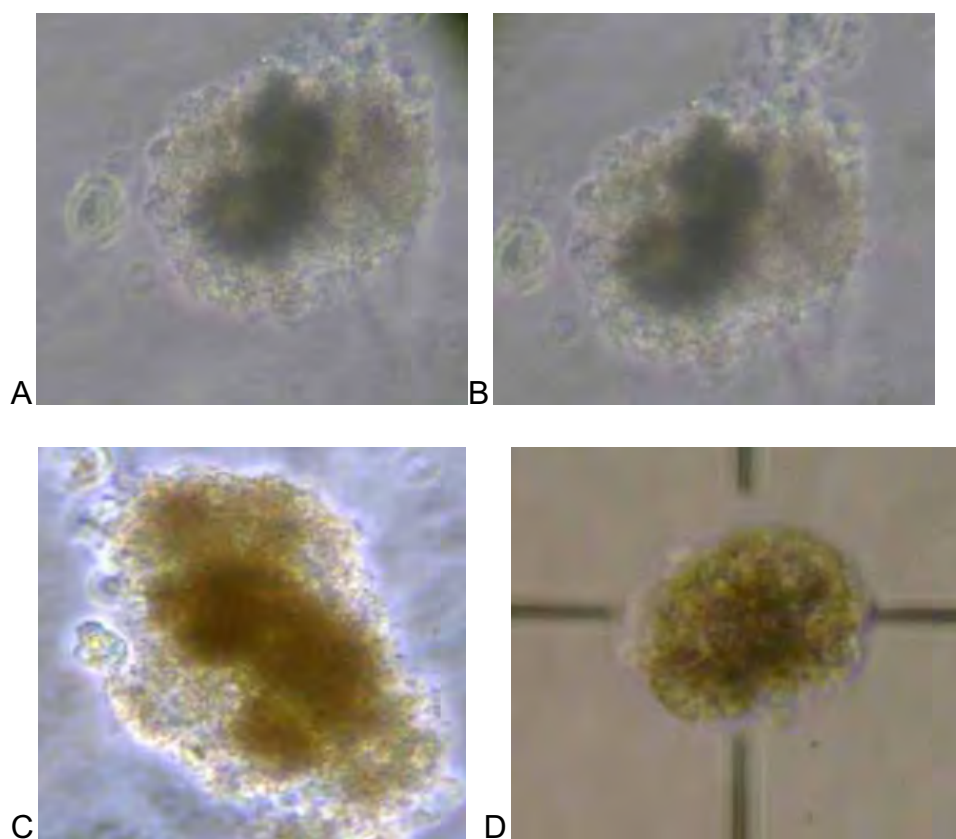


Figura 6 - MCI que apresentou crescimento até o quarto dia e início de morte celular a partir do quinto dia – (A) dia 4, (B) dia 5, (C) dia 7. (D) dia 9. Aumento 400X em microscópio invertido com contraste de fase

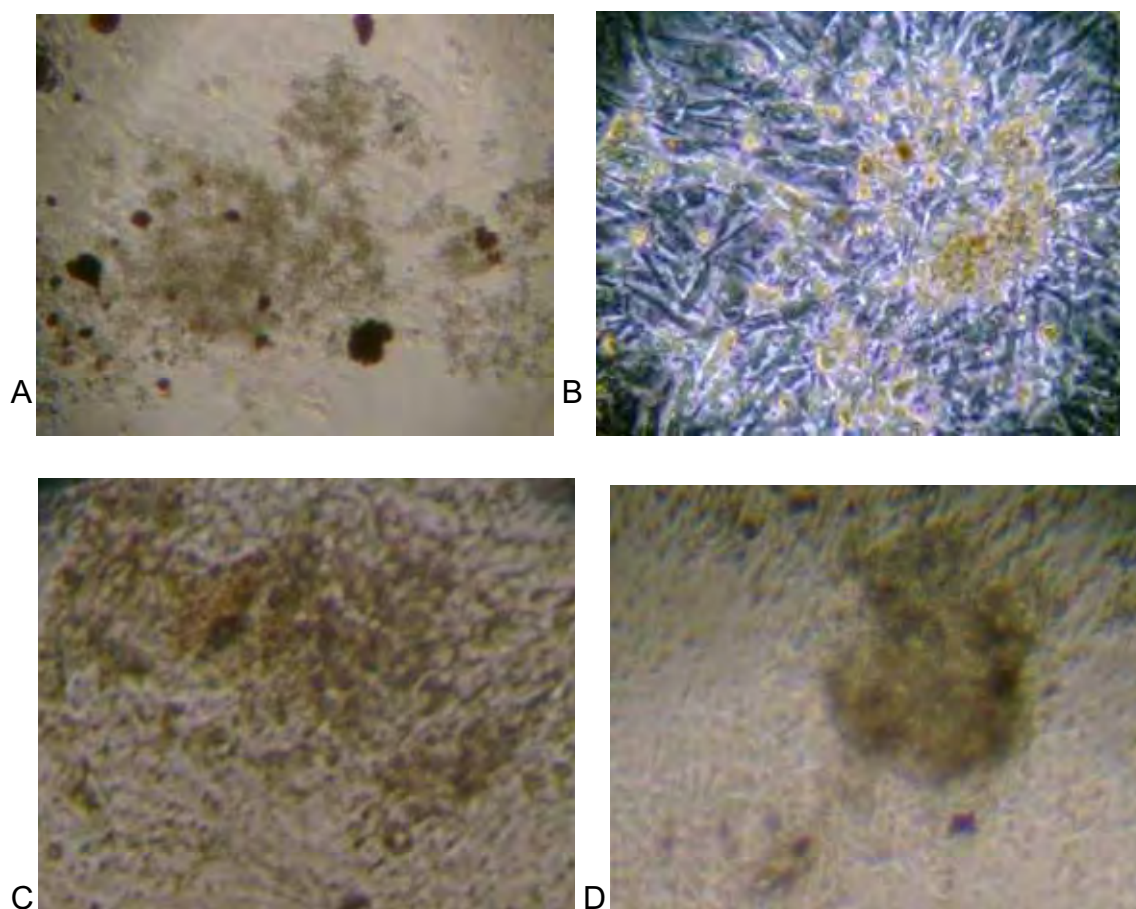


Figura 7 - Cultivos contendo células com morfologia anômala de crescimento exacerbado em diferentes periodos – (A) dia 4, (B) dia 6 (aumento de 400X), (C,D) dia 5 (aumento de 400X em microscópio invertido com contraste de fase).

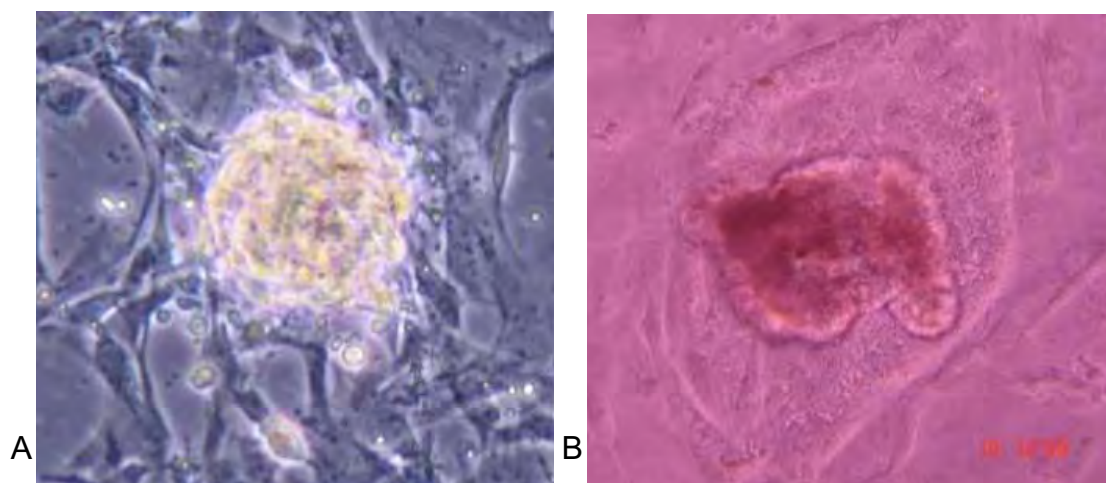


Figura 8 - MCI com proliferação celular sem alteração morfológica até o dia 14 de cultivo. (A) dia 2, (B) dia 9 (aumento 400X em microscópio invertido com contraste de fase)

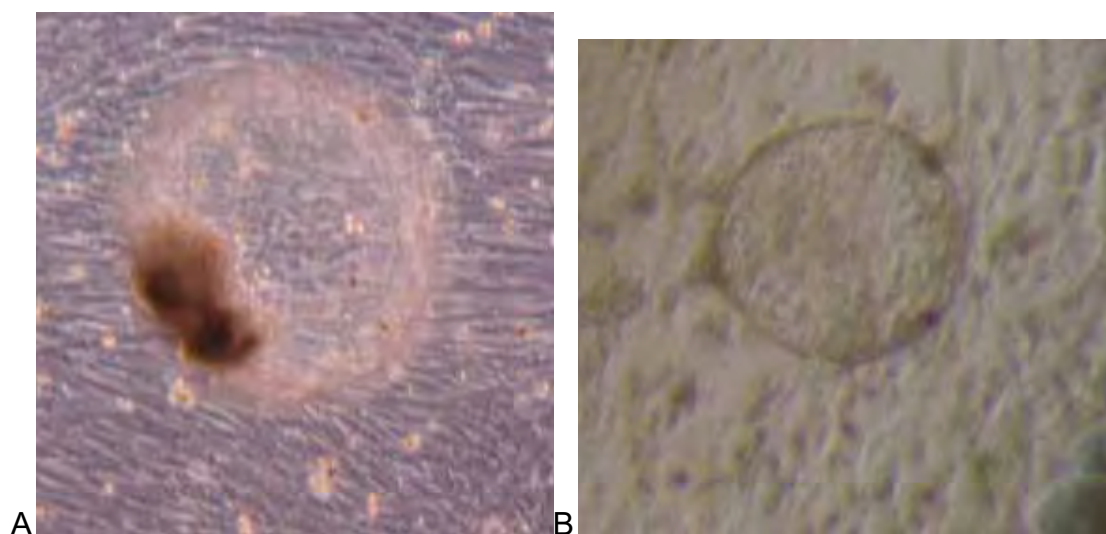


Figura 9 (A,B) Corpos embrióides formados 24 horas após a adição da MCI na well (aumento 400X em microscópio invertido com contraste de fase Ph1).

- **Grupo II: Isolamento por Imunocirurgia:**

Seis embriões tiveram as MCI isoladas por imunocirurgia e os resultados obtidos estão apresentados na tabela 3.

Das seis MCI isoladas utilizadas neste grupo, quatro não aderiram depois de adicionadas à placa de cultivo sendo descartadas após sinais de morte celular no quinto dia. Dois embriões apresentaram aderência e multiplicação celular, mas somente um teve crescimento suficiente estável para que fosse realizado o repique celular (Fig12).

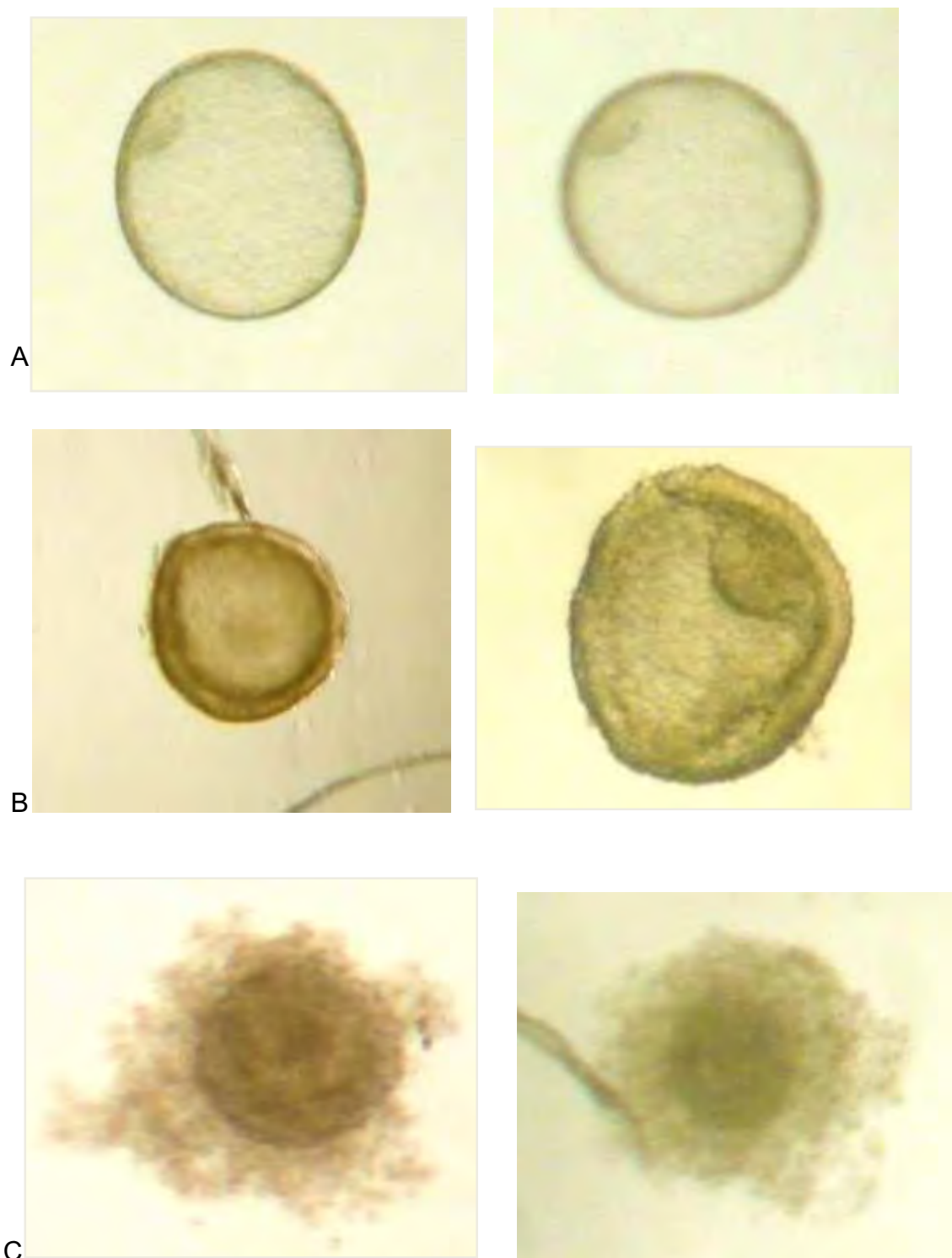


Figura 10: (A,B) Blastocistos após 90 minutos em Solução com 10% soro de coelho, (C,) Após 60 minutos na Solução 5% IgG, (C) Após exposição a solução 20% Complemento. (aumento 8X no microscópio estereoscópico)

Tabela 3: Cultivo de MCI submetidas ao Isolamento por Imunocirurgia

Número de MCI	Adesão	Características do Cultivo
4	Não Aderiram	Células Suspensas e Morte Celular
2	Total	Morfologia de Es e Presença de Corpos Embrióides

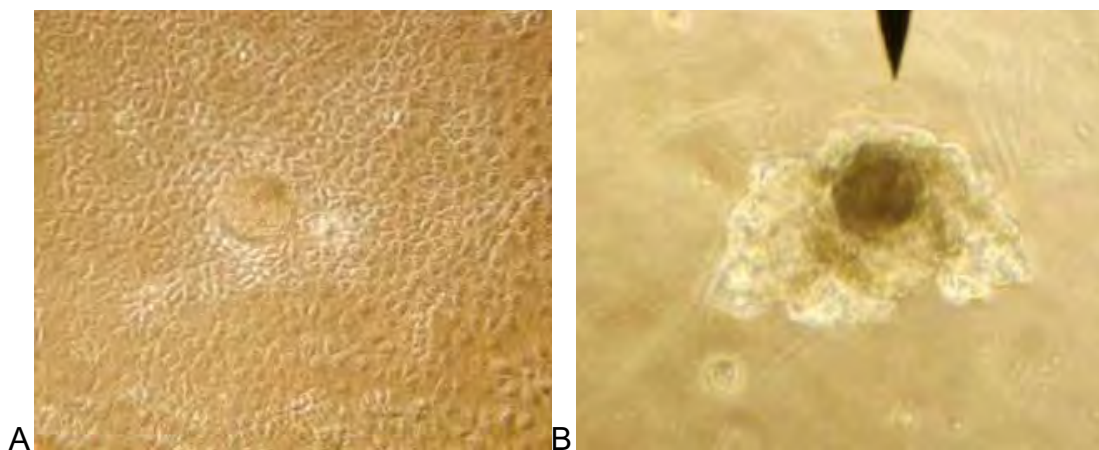


Figura 11 - MCI aderida cresceu até o sexto dia e soltou-se após remoção de células diferenciadas (A) dia 6, (B) dia 7 (aumento de 100X, microscópio invertido com contraste de fase Ph1).

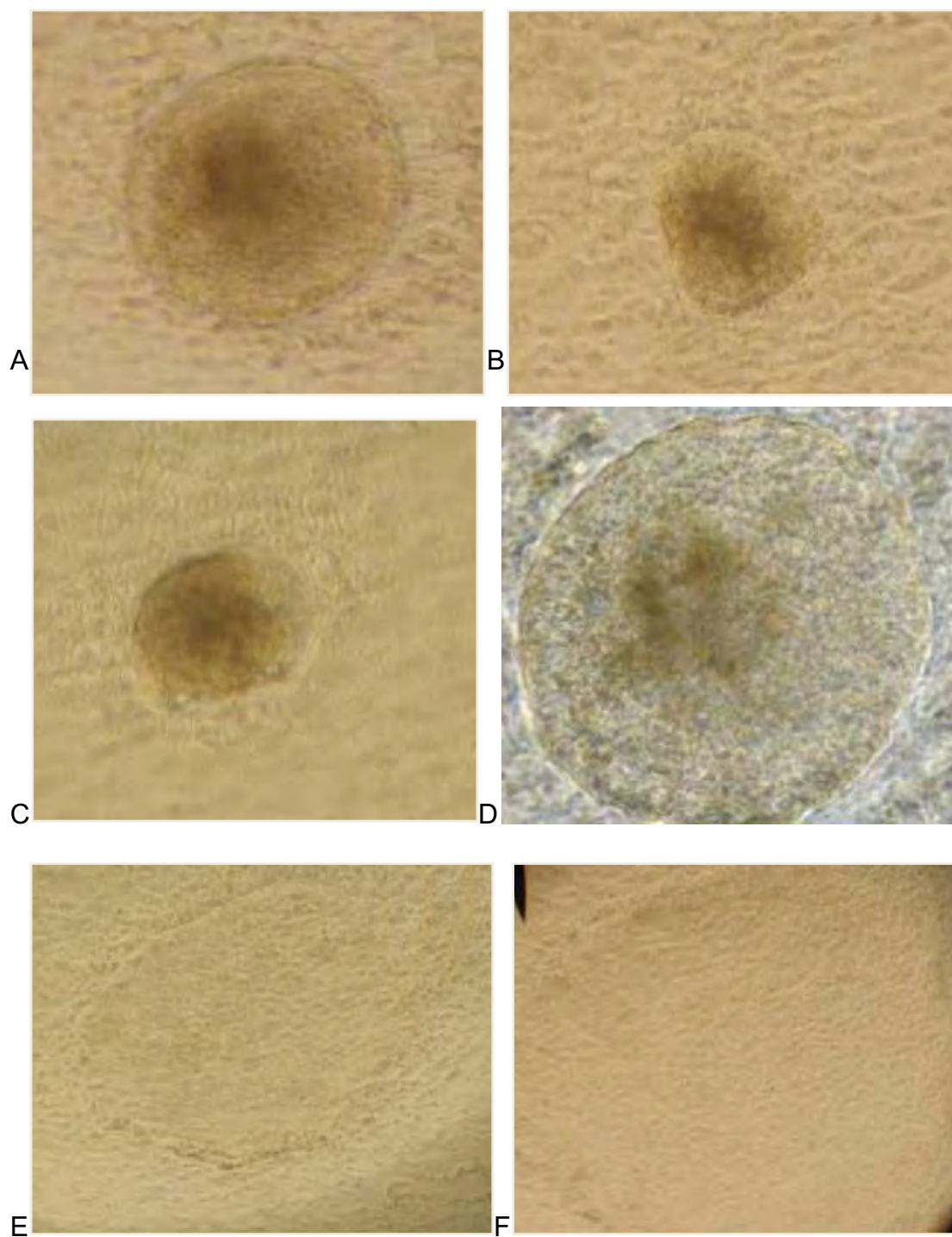


Figura 12 - Cultivo de MCI até o dia 18 antes do repique celular - (A) dia 3, (B) dia 6, (C) dia 10 (aumento 200X), (D) dia 10 (aumento de 400X), (E) dia 15, (F) dia 18 (aumento 100X).

- **Grupo III: Aspiração por Micromanipulação:**

Em nenhuma placa houve aderência das células da MCI, que permaneceram dispersas, não se multiplicaram e foram de difícil identificação na placa, sendo descartadas no quinto dia (Fig.13).

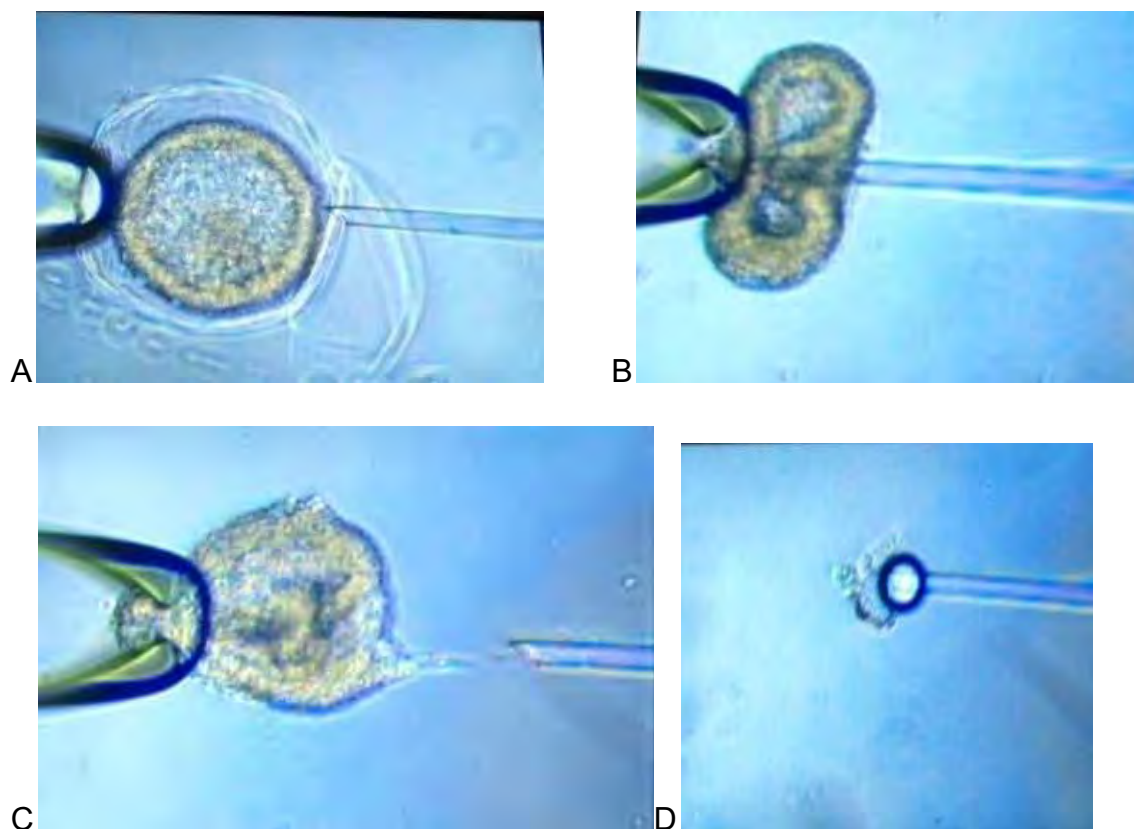


Fig. 13 – Aspiração da MCI por Micromanipulação – (A) Blastocisto com cápsula delgada fixado na agulha de holding, (B) Resistência à Perfuração do Blastocisto, (C): Blastocisto após retirada da capsula, (D) MCI aspirada (aumento 15X em microscópio invertido).

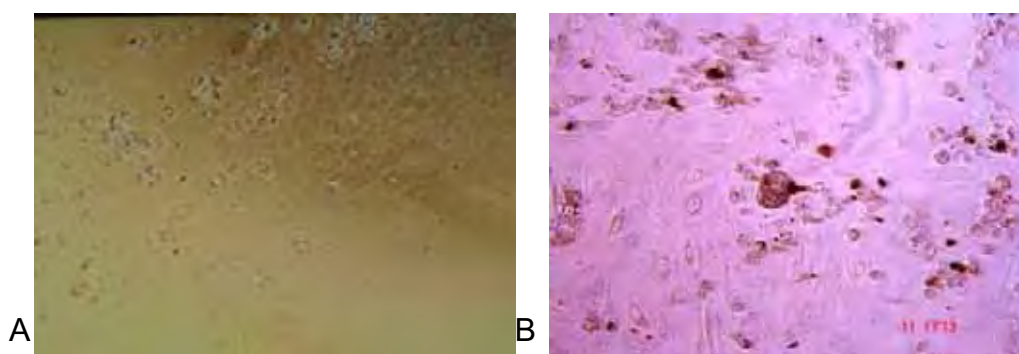


Figura 14 - MCI aspiradas em diferentes momentos de cultivo- (A) Dia2 de cultivo, aumento 20X em microscópio invertido com contraste de fase, B-Dia4 de cultivo, aumento 40X em microscópio invertido.

2.2.2. Realização de passagens a partir do cultivo primário

No grupo 1 apenas uma MCI aderiu à placa e apresentou crescimento suficiente para que fosse realizado o repique. A MCI aderiu e apresentou crescimento constante até o dia 14 de cultivo. Após o repique celular houve formação de corpos embrióides, mas os fragmentos não aderiram e apresentaram alteração no tamanho e coloração seguida de morte celular no dia 3 (Fig.15).

No grupo 2 duas MCIs aderiram à placa de cultivo, mas apenas uma conseguiu proliferação e estabilidade no cultivo até a fosse realização do repique celular. O cultivo primário foi repicado após 18 dias de cultivo e continuou desenvolvendo colônias celulares (Fig.15). As colônias mantiveram-se estáveis durante a primeira passagem e foram cultivadas por 9 dias até a realização do segundo repique (Fig.16). Após o crescimento e multiplicação celular da 2ª passagem houve formação de corpos embrióides entre os

fragmentos aderidos (Fig.17). Duas colônias aderidas na placa foram utilizadas para a marcação molecular. O restante foi congelado.

No grupo 3 não foram realizadas passagens devido a falha no estabelecimento do cultivo primário das MCI.

Tabela 4 – Resultados do desenvolvimento do cultivo da MCI nos diferentes grupos, avaliados segundo: adesão, cultivo primário e repiques celular.

Grupo	MCI Aderidas	Cultivo Primário	1ª Passagem	2ª Passagem
1	16/26 (61%)	1/26 (4%)	1/26 (4%)	0/26 (0%)
2	2/6 (33%)	2/6 (33%)	1/6 (17%)	1/6 (17%)
3	0/6 (0%)	0/6 (0%)	0/6 (0%)	0/6 (0%)
Total	18/36 (50%)	3/36 (8%)	2/36 (5%)	1/36 (3%)

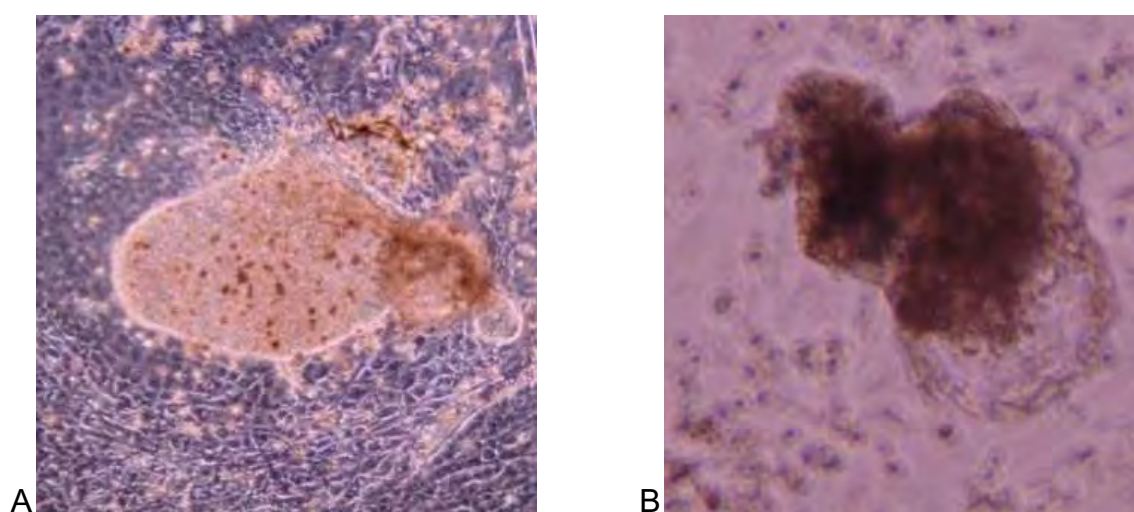


Figura 15 (A) MCI de embrião do grupo I no dia 14 do cultivo, (B) Corpos embrióides e morte celular (200X em microscópio invertido)

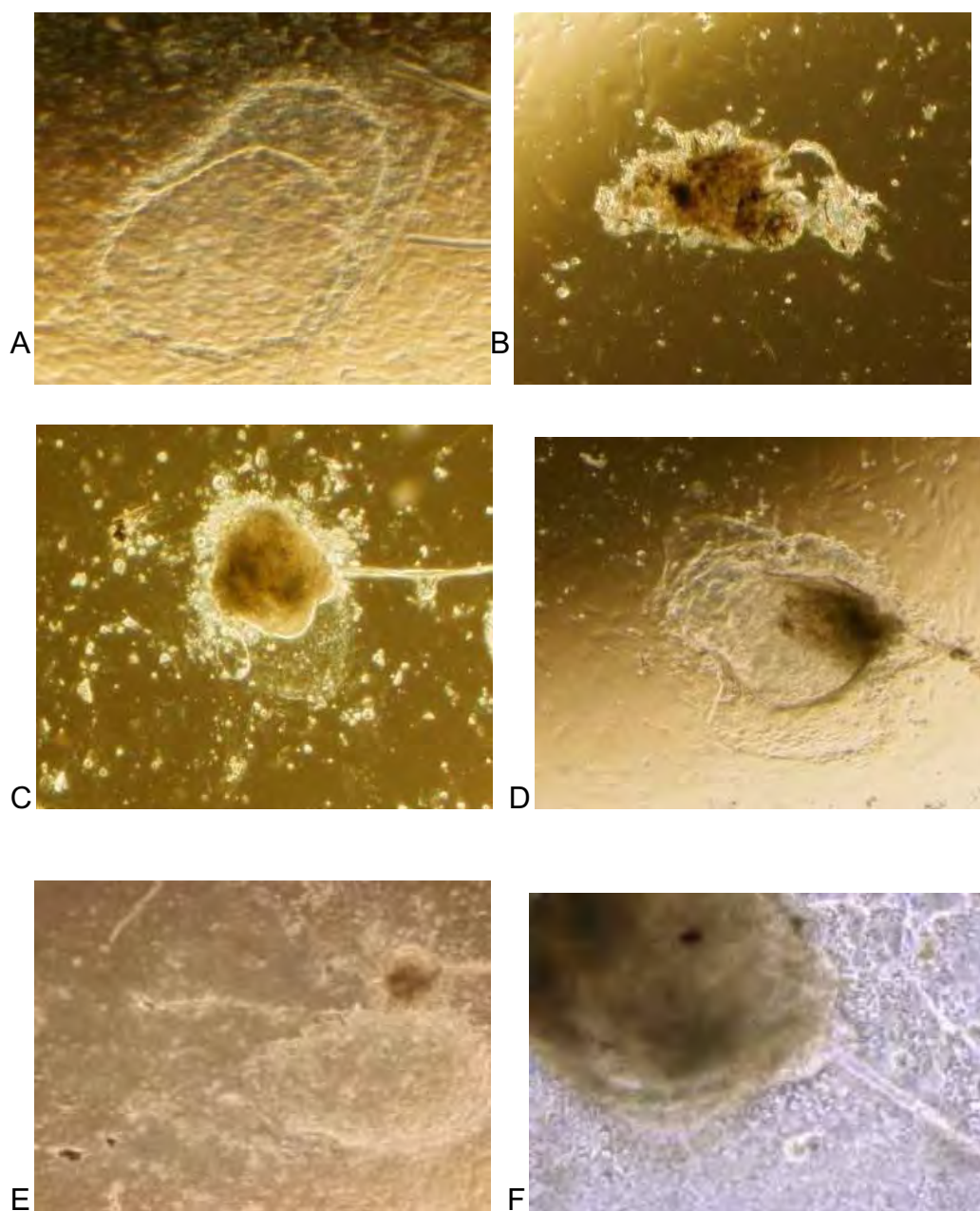


Figura 16: (A) Cultivo Primário de MCI obtida de embrião do grupo II até o 18^o dia de cultivo antes do repique (aumento de 100X em microscópio invertido com contraste de fase Ph1). B-F: Fragmentos após repique do cultivo primário da MCI em diferentes momentos, (B e C) Dia 2 (100X), (D) dia 5 (200X), (E) dia 9 (100X), (F) dia 9 (400X).

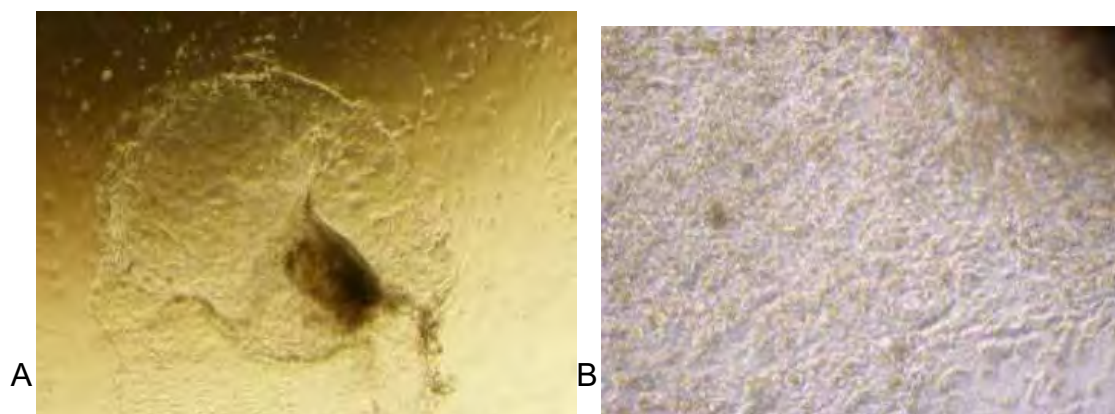


Figura 17 - Colônia da 1ª Passagem do Cultivo Primário de MCI do Grupo II no Dia 9 - (A) aumento de 200X, (B) aumento 400X.

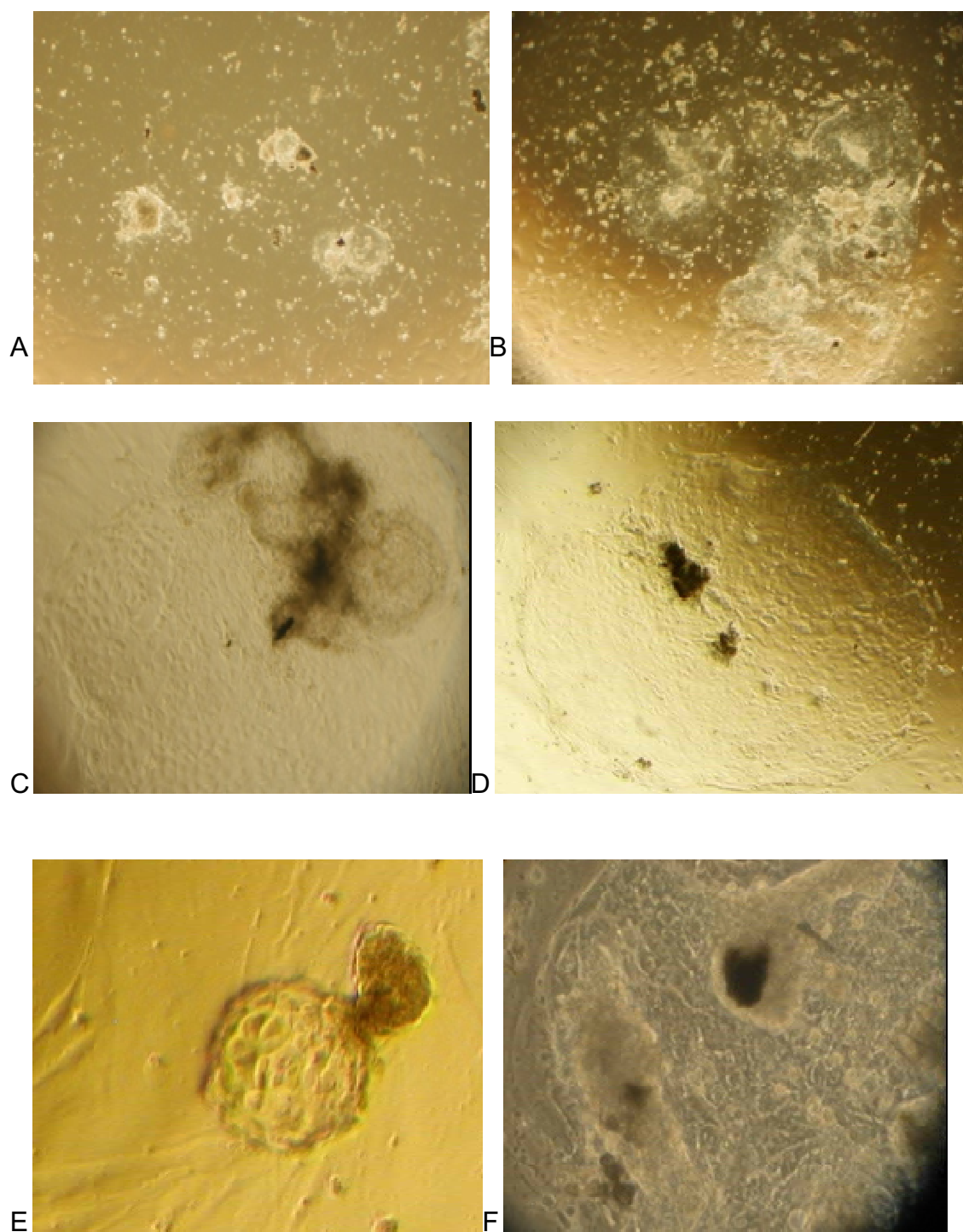


Figura 18 - Diferentes momentos de cultivo da 2ª Passagem. (A) well no segundo dia com ampliação de 50X, (B) well no segundo dia do cultivo ampliação de 200X, C,D) colônias no quinto dia (aumento de 200X microscópio

invertido com contraste de fase Ph1), E:Corpo embrióide, (F) colônia no sétimo dia (aumento200X).

3 DISCUSSÃO

A obtenção de uma nova linhagem de CTE apresenta dificuldades além das enfrentadas na manutenção do cultivo de linhagens já imortalizadas. A acentuada sensibilidade a mudanças do ambiente, componentes do meio e contaminação somam-se à necessidade de grande número de embriões, preparação de monocamada de suporte e baixa aderência das MCI às placas de cultivo.

A aderência das MCI está relacionada à viabilidade do embrião utilizado, qualidade e características da monocamada de suporte e formulação do meio de cultivo.

A espécie equina é composta por animais sazonais e monovulatórios, o que demanda vários animais e fármacos para a obtenção de embriões a um custo elevado. A distância entre laboratórios e piquetes assim como tempo dedicado e mão de obra qualificada destinada ao manejo reprodutivo das éguas tornam a obtenção dos embriões um entrave à pesquisa.

O aprimoramento do protocolo de estabelecimento de linhagem de ES e o uso do menor número possível de embriões são essenciais para o estudo futuro dessas células na espécie.

A preparação das monocamadas tem função fundamental no sucesso do cultivo, quanto mais saudáveis as células mais fatores capazes de auxiliar e manter o desenvolvimento das CTE serão secretados no ambiente de cultivo. A consistência dos resultados possibilita a melhor avaliação de outras etapas do protocolo que possam influenciar os resultados, eliminando uma variável nas possíveis causas de falha no cultivo.

A administração da mitomicina foi eficiente no bloqueio da divisão celular e é um procedimento de baixo custo e fácil realização. No entanto, no presente estudo, os fibroblastos com o ciclo celular bloqueados por mitomicina apresentaram menor adesão no plaqueamento inicial da monocamada, e muitas células se soltaram a cada troca do meio de cultivo, visto que em um cultivo de CTE, o meio é trocado a cada 24 horas, o que torna a perda celular foi significativa. Estes resultados estão de acordo com o observado por Nieto et al (2006), que demonstraram que fibroblastos submetidos a mitomicina apresentam tempo de vida menor e desenvolvem áreas necróticas, entrando em apoptose entre dois e dez dias.

Também Roy et al, (2001) demonstraram que células bloqueadas pela mitomicina apresentam alterações metabólicas e são menos eficientes na manutenção do cocultivo.

Quanto às diferentes técnicas de isolamento da MCI, pode-se concluir que o isolamento mecânico apesar de ser o grupo com maior número de embriões, necessita ser aprimorado.

A realização do isolamento manual da MCI em ambiente estéril é de difícil realização devido a características intrínsecas do embrião equino, como a presença da cápsula acelular associada à dificuldade de visualização da MCI no blastocisto expandido. Estes fatores acabaram por facilitar a contaminação das colônias com outros tipos celulares. O aproveitamento de 4% na derivação da MCI até a realização do primeiro repique situa-se inferior ao encontrado na literatura. Saito et al (2002) obtiveram 14% de sucesso no isolamento mecânico da MCI na espécie equina.

A contaminação com células do trofoblasto foi frequente e a identificação da massa celular interna no embrião equino foi realizada por estimativa, uma vez que, nessa espécie a MCI não é facilmente identificada no blastocisto inicial. Na espécie equina, esta contaminação é muito difícil de ser evitada, pois embriões normalmente obtidos no oitavo dia após a ovulação já estão no estágio de blastocisto expandido, apresentando saco vitelínico envolto por uma estrutura bilaminar de células do trofoblasto e células da endoderme (FLOOD et al, 1982). Como essas células recobrem também a região do botão embrionário, sua retirada completa é muito difícil. Como agravante temos ainda sua elevada velocidade de replicação, o que faz com que seu crescimento *in vitro* seja mais rápido do que aquele observado nas células da MCI.

Apesar de a separação mecânica ser livre de produtos de origem animal e requerer menor tempo de exposição do embrião no ambiente, são necessárias prática e acurácia extremas na realização do procedimento, cujos os resultados variam de acordo com o técnico que a realiza.

No isolamento por microcirurgia, uma agulha de *holding* fixa o embrião em uma posição em que a MCI permaneça adjacente à agulha de biopsia que atravessa a blastocela e aspira a MCI. Apesar de conseguir o isolamento total da MCI esse procedimento pode levar a danos permanentes nas células, como a desintegração, e prescinde de equipamentos caros.

Os resultados obtidos no grupo II estão acordes com os encontrados na literatura, Li et al (2006) criaram três linhagens de CTE a partir de 24 embriões equinos, com 13% de aproveitamento. Apesar de a imunocirurgia expor a MCI à produtos com proteínas de outras espécies animais, foi a técnica de derivação com melhores resultados e pode ser realizada, uma vez que haja os anticorpos para a espécie desejada, sem a necessidade equipamento de alta tecnologia e de treinamento exaustivo na identificação e isolamento da MCI.

A microcirurgia com aspiração da MCI foi o grupo com pior resultado: não houve crescimento de colônias de CTE no cultivo primário, provavelmente por lesão das células no procedimento.

Como o blastocisto eqüino apresenta resistência à perfuração, preconiza-se a incubação em solução de Pronase, que deve ser breve para que a dissolução da zona pelúcida ocorra sem que haja desintegração do embrião. Na derivação de linhagens de CTE humanas, essa técnica foi descrita com sucesso por Chung et al (2006) com 9% de aproveitamento de um total de 125 embriões. Pode-se concluir que a pouca quantidade de embriões disponibilizados para esse grupo e a difícil manipulação do embrião eqüino sejam as causas do resultado obtido.

Os repiques realizados mecanicamente permitiram não só a retirada de células morfológicamente diferenciadas mas ainda a separação e fragmentação das colônias com morfologia similar de CTE, como alta proporção núcleo/citoplasma, formato circular, células pequenas agregadas umas às outras.

A presença de corpos embrióides em algumas placas e o extenso período de crescimento do cultivo primário com subsequente aumento da multiplicação celular após o primeiro repique, atingindo a frequência de um repique por semana, está de acordo com o descrito na literatura e nos protocolos de cultivo celular da WiCell Research Institute, INC e da Rutgers Stem Cell Research Center.

Apesar de um número de embriões considerado grande para a espécie ter sido utilizado, o cultivo da MCI só foi obtido em três embriões, dos quais em um deles as células se multiplicaram e permaneceram viáveis para realização do repique celular.

Quanto à viabilidade de imortalização da linhagem, nosso estudo abstem-se de conclusões devido à limitação de tempo para a conclusão do experimento. As células foram criopreservadas após o segundo repique celular.

Estes achados são discordantes dos obtidos por Li et al (2006), que conseguiram isolar CTE equinas e mantiveram-nas *in vitro* no cocultivo com fibroblastos fetais bovinos por até 28 passagens, e por Saito et al (2002), que cultivaram CTE equinas de blastocistos por 56 passagens. Na literatura, estes

são os únicos artigos que referiram êxito ao trabalhar com a espécie, já que resultados semelhantes não foram descritos posteriormente.

4 CONCLUSÕES

A monocamda de suporte independe de ser da espécie homóloga para o cultivo de CTE equinas, uma vez que fibroblastos tanto de origem murina como equina permitiram a aderência da MCI e seu crescimento no cultivo *in vitro*.

A inativação do ciclo celular da monocamada de sustentação pela mitomicina, apesar de eficiente, apresenta variação quanto à aderência celular e tempo de vida dos fibroblastos em cultivo.

O uso de 3000 rads para bloquear fibroblastos murinos foi eficiente e apresentou adequada aderência na placa permitindo que o cultivo primário de CTE fosse realizado sem necessidade de adicionar mais células.

A imunocirurgia foi o método mais eficaz de isolamento da MCI em blastocistos equinos, permitindo o isolamento da MCI com menor contaminação de células do trofoblasto, e não apresentando efeitos deletérios nas células, mantendo-as aptas ao cultivo *in vitro*.

O repique do cultivo pelo método manual permite a manutenção da linhagem celular e seleção de colônias indiferenciadas.

CAPITULO II

CARACTERIZAÇÃO DO CULTIVO DA MCI

1 MATERIAIS E MÉTODOS

As células embrionárias equinas utilizadas foram obtidas no experimento anterior, a partir do isolamento da MCI por imunocirurgia e coletadas para análise após a segunda passagem do cultivo celular. As amostras de linhagem CTE murinas já estabelecidas (gentilmente cedidas pelo Prof. John Schimenti da College of Veterinary Medicine, Cornell University, Campus Ithaca) serviram como controle positivo da RT-PCR.

1.1 Análise Da Expressão Gênica Do Gene Oct-4

1.1.1 Extração do RNA

O RNA total (10µg) foi isolado das células tronco embrionárias (CTE) pelo Qiagen RNeasy Kit ⁷ seguindo o protocolo sugerido pelo fabricante, a primeira banda de cDNA foi sintetizada a partir de 250ng do RNA total utilizando o Protocolo padrão USB's M-MLV Reverse Transcriptase ⁸

A quantidade de RNA presente nas amostras foi mensurada por Espectrofotômetro Thermo Scientific NanoDropTM, sendo 26ng/ul de Ácidos

⁷ Qiagen®

⁸ Affymetrix®

Nucléicos nas amostras de CTE equinas, 535ng/ul em CTE murinas e 38ng/ul nas amostras de fibroblastos murinos.

1.1.2 Avaliação da qualidade do cDNA

Foi realizada a RT-PCR para detecção do gene SDHA equino nas amostras de cDNA extraídos a fim de verificar a qualidade do material antes que fosse realizada a RT-PCR para a detecção do gene Oct-4 e Nanog.

1.1.3 Detecção do gene Oct-4 pela técnica de RT-PCR:

O primer do gene Oct-4 equino foi desenhado a partir da obtenção da sequência do gene na espécie equina, murina e humana do banco de dados NCBI, alinhamento e comparação dos genes utilizando o software Primer 3.

A solução para PCR: cDNA (equivalente a 25µg do total de RNA) ou DNA genômico (0.5µg), 5 pmol de primers específicos para Oct-4 mRNA SENSE 5'-CTC TTT GGR AAG GTG TTC AG-3' e ANTISENSE 5'-AGT TTG ART GCA TGG GAG AG-3"', 50mM dNTPs, 1X buffer e 0.5 U polimerase. Cada ciclo térmico para ampliação constituiu de incubação a 94°C por 15 segundos, 55°C por 30 segundos e 72°C por 2 minutos. O ciclo foi repetido por 40 vezes com extensão final de 10 minutos a 72°C.

A letra R na sequência do *primer* indica a possibilidade de duas bases diferentes. Os *primers* foram desenhados para tornar possível a ligação também ao gene Oct-4 da espécie murina.

1.1.4. Confirmação da Detecção do Oct-4 na RT-PCR

Para confirmação que o primer desenhado se ligou ao gene Oct-4 e não à qualquer outro gene, foi realizada a extração e purificação do material genético utilizado na RT-PCR, das amostras de ES murinas e ES equinas, com o uso do Qiagen Qiaquick PCR purification kit, seguindo o protocolo indicado pelo fabricante Qiagen®. Em seguida foram criados vetores introduzidos com o material purificado utilizando Promega pGEM-T Easy vector®. Os vetores foram colocados no cultivo com Bactérias Top 10 e Coli⁹ resistentes a ampicilina para que fossem clonados. A seguir as bactérias foram incubadas em placas contendo Ágar LB e 50ug/ml Ampicilina. Seis colônias brancas (cor indicativa de sucesso na inserção do vetor) foram escolhidas de cada placa. Essas colônias foram colocadas em cultivo por 16 horas sendo centrifugadas à 250rpm em caldo Ágar LB adicionado 50ug/ml Ampicilina.

O Pellet concentrado de bactérias foi removido e os plasmídeos com o DNA foram purificados com o auxílio do Qiagen Qiaprep Spin Mini-prep kit. 2µl de Plasmídeos submetidos a digestão com 8µl de EcoR1¹⁰ durante uma hora por 37°C a seguir 7.5ul da digestão foi colocado no gel de Agarose 1%. Dois plasmídeos positivos sequenciados com os primers universais M13F e M13R tiveram a sequência analisada com o auxílio do software Vector NTI¹¹.

1.2 Detecção Do Gene Nanog Pela Técnica De RT-PCR

O primer do gene Nanog equino foi desenhado a partir da obtenção da sequência do gene na espécie equina, murina e humana do banco de dados

⁹ Invitrogen®

¹⁰ Invitrogen®

¹¹ Invitrogen®

NCBI, alinhamento e comparação dos genes. O primer para a RT-PCR foi desenhado com auxílio do *software Primer 3*.

A solução para PCR : cDNA (equivalente a 25µg do total de RNA) ou DNA genômico (0.5µg), 5 pmol de primers específicos para NANOG mRNA: SENSE 5'-TGT TCT CTC AGR CCC AGC TS-3' e ANTISENSE 5'-CAG YYY AYT TTT GCT GSA AC 3''' , 50mM dNTPs, 1X buffer e 0.5 U polimerase. Cada ciclo térmico para ampliação constituiu de incubação a 94°C por 15 segundos, 55°C por 30 segundos e 72°C por 2 minutos. O ciclo foi repetido por 40 vezes com extensão final de 10 minutos á 72°C.

As letras R, Y e S na sequência do *primer* indicam a possibilidade de duas bases diferentes no número total primers na amostra . O *primers* foram desenhados de forma que fosse possível se ligar também ao gene Nanog da especie murina.

1.3 Marcação In Situ Da Expressão Do Fator De Indiferenciação Oct-4 Em Blastocistos

Foi realizada a marcação *in situ* do Oct-4 em dois embriões, visando o estudo da distribuição deste fator no embrião intacto.

Os embriões foram fixados por 30 minutos em paraformaldeído 3% á temperatura de 4°C e permeabilizados por 5 minutos em solução salina com 1,5% de triton-X-100 + 1,5% de gelatina. Após a permeabilização, os embriões foram incubados por 1 hora á temperatura ambiente em solução 1:100 do

anticorpo policlonal de coelho anti OCT-3/4¹². Os embriões foram então lavados por 3 vezes em PBS e incubados em solução com anticorpo secundário de coelho anti-cabra conjugado com Alexafluor 555 na diluição 1:500 durante 30 minutos. Após nova lavagem em PBS, os embriões foram montados em lâminas histológicas com gotas contendo Hoechst 33342 diluído em glicerol (1:10) e cobertos com lamínulas.

A análise foi feita logo após a montagem das lâminas em microscópio invertido com luz fluorescente equipado com filtro UV para leitura do Hoechst 33342 e com filtro com luz visível verde para leitura do Alexafluor 55.

2 RESULTADOS

2.1 Análise da Expressão Gênica: O cDNA extraído das amostras de CTE equinas foi confirmado pela detecção do gene Keeper equino SDHA.

¹² Santa Cruz Biotechnology®

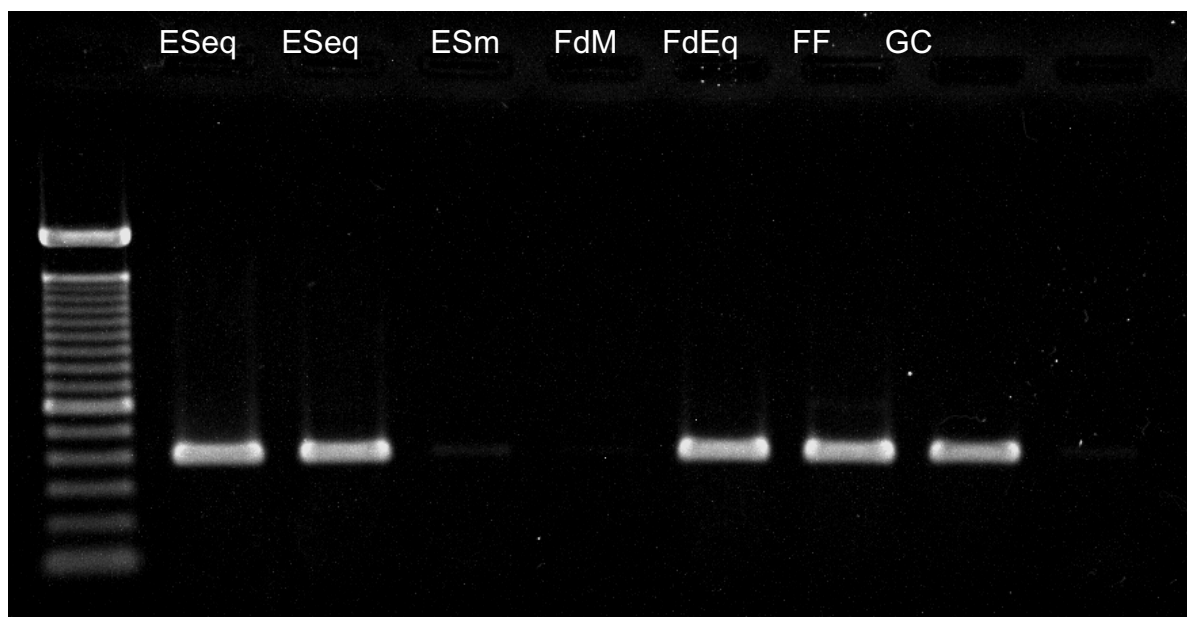


Figura 19: Gel com o resultado da PCR do gene SDHA. ESeq: Células Tronco equinas presentes no cultivo na 2^a passagem. ESm: Células-tronco embrionárias murinas, FdM: fibroblastos murinos. FEq: fibroblastos equinos, FF: fibroblastos fetais equinos, GC: Anel Corioniônico.

2.2 RT-PCR Para Detecção Dos Genes Oct-4 E Nanog

A RT-PCR para detecção do gene Oct-4 nas colônias CTE murinas e equinas foi positiva. Houve expressão do gene nas amostras de células de Cálices Endometriais e Anel Coriônico

A detecção do gene Nanog foi negativa, não houve ligação do primer na espécie murina (previamente testada) conclui-se que a reação foi negativa por falha na escolha do desenho do primer.



Figura 20 - Foto do Gel com a RT-PCR para detecção do gene Oct-4 positivo para amostras CTE equinas(ESeq), CTE murinas (ESm), Fibroblasto Fetal Equino(FF) e Anel Corioniônico(GC).

A análise do produto gênico ampliado pela criação de vetores, clonagem e cultivo em bactérias foi positiva para a espécie murina e equina. A sequência foi introduzida no banco de dados RefSeq e o resultado positivo da RT-PCR na ampliação e detecção do gene Oct-4 nas amostras foi confirmado.

	10	20	30	40	50	60	70	
Horse POU5F1	CTCTTTGGGAAGGTGTTTCAGCCAAACGACCATCTGCCGTTTTTGAGGCTCTGCAGCTCAGTTTCAAGAACAT							71
Mouse POU5F1	G..C.....T..C..C.....CT.....CC.T.....							71
	80	90	100	110	120	130	140	
Horse POU5F1	GTGTAAGCTGCGGCCCTGCTGCAGAAAGTGGGTGGAGGAAGCTGACACAAACGAAAATCTACAGGAGATAT							142
Mouse POU5F1	G.....C.....T..G..C..T.....							142
	150	160	170	180	190	200	210	
Horse POU5F1	GCAAAGCAGAGACCTGGTGCAGGCCCGAAAGAGAAAGCGAACTAGTATTGAGAACCGAGTGAGAGGCAAC							213
Mouse POU5F1	T.G.....G.....C.....T.....GT..G..GT							213
	220	230	240	250	260	270	280	
Horse POU5F1	CTGGAGAACATGTTCTTGCAGTGCCCGAAACCCACACATGCAGCAGATCAGCCACATCGCCAGCAGCTCGG							284
Mouse POU5F1	C.....T..A.....G...T.C..A.....CT.....A.T.....T..							284
	290	300	310	320	330	340	350	
Horse POU5F1	GCTCGAGAAGGACGTGGTACGAGTGTGGTTCTGCAACCGTCGCCAGAAGGGCAAACGATCAAGCAGTGACT							355
Mouse POU5F1	...A.....T.....T.....A.....T.....G.....A.....T..T...G.							355
	360	370	380	390	400	410	420	
Horse POU5F1	ATTTCGCAAAGAGAGGATTTTGAGGCTGCCGGGTCTCCTTTCTCAGGGGGACCGGTATCCTTTCCCTGGCA							426
Mouse POU5F1	...C...C...A..G.A.....A..A..A.....C.....GG.T.....T...C.C							426
	430	440	450	460	470	480	490	
Horse POU5F1	CCAGGGGCCCCATTTTGGTACCCAGGCTATGGGGGTCTCACTTCACTACGCTGTACTCCTCGGTGCCCTT							497
Mouse POU5F1	T.....C.....C.....AA.C..C.....C..A..C.....---A.....							494
	500	510	520	530	540	550	560	
Horse POU5F1	CCCTGAGGGTGAGGCCTTTCCTCTGTGCTGTCTCACCCTCTGGGCTCTCCCATGCACTCAAAC							562
Mouse POU5F1	T.....C.....TC.C.....TG.....							559

Figura 21 - Alinhamento da sequência obtida da análise dos clones ampliados obtidos a partir do produto da RT-PCR, certificação da expressão do gene Oct-4.

2.3 Marcação *in situ* Imunocitoquímica Da Expressão Do Gene Oct-4

As colônias analisadas expressaram o gene Oct-4. Desta forma, para caracterizar a distribuição desta marcação nos embriões intactos foi feita a marcação imunocitoquímica *in situ* para expressão deste fator em embriões produzidos *in vivo*.

A marcação mostrou que tanto células da MCI como do trofoblasto expressam o gene Oct-4 (Fig. 20). Estes dados validam os resultados do PCR onde a expressão do Oct-4 foi observada tanto nas células cultivadas como em células coriônicas de origem trofoblástica.

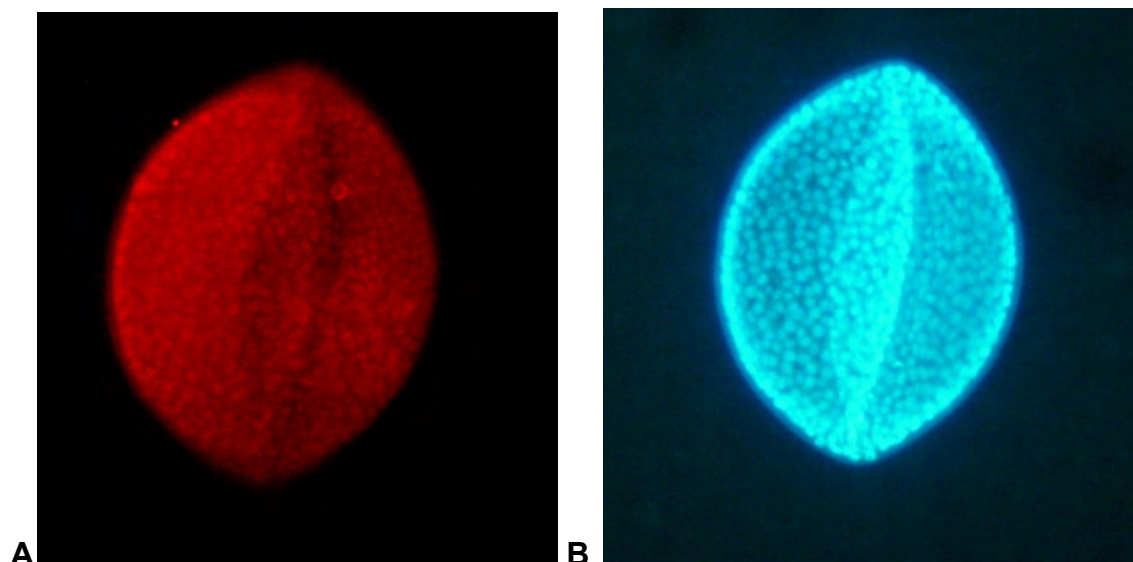


Figura 22: (A) Embrião tratado com Anticorpo anti OCT-3/4 associado a marcação secundária com anti-cabra conjugado com Alexafluor 555 (vermelho). Aumento 40X, (B) As amostras foram contra coradas com Hoechst 33342 (azul) para melhor visualização do núcleo das células. Aumento 40X

3 DISCUSSÃO

As amostras das células cultivadas foram positivas para a expressão do gene Oct- 4 e apesar do resultado negativo na análise do gene Nanog, não é possível afirmar, a partir deste experimento, que o material analisado não expressa esse gene. O resultado negativo obtido no grupo controle indica que o primer escolhido para a análise foi ineficaz.

e transfecção de vetores em bactérias terem eliminado dúvidas e corroborado os resultados apresentados.

Estudos prévios realizados em outras espécies de mamíferos apresentaram dados similares ao deste experimento. Neimann et al (2000) avaliaram embriões suínos, bovinos e murinos quanto a distribuição espacial do Oct-4 e constataram que os embriões bovinos e suínos apresentavam expressão do Oct-4 dispersa e não restrita apenas à MCI. Kurosaka et al (2004) também reportaram que a células do trofoblasto bovino apresentam expressão do gene Oct-4.

Mitalipov et al (2003), ao provarem que embriões do macaco rhesus assim como os humanos têm a expressão do gene Oct-4 restrita à MCI, confirmaram que, nos primatas, o gene Oct-4 pode ser um marcador fidedigno da pluripotência.

Apesar de existir homologia entre os genes relacionados à pluripotência, especialmente o Oct-4, em murinos, bovinos, primatas e equinos a localização e atividade desses genes não são idênticas entre as espécies. O tempo de desenvolvimento embrionário e reconhecimento materno entre elas podem ser responsáveis por essas diferenças.

Vejlsted et al (2006) demonstraram que no blastocisto expandido de camundongos, a proteína e RNA mensageiro do Oct-4 são expressos predominantemente na MCI. Quando a MCI se diferencia em hipoblasto e epiblasto, altos níveis de expressão desse gene são encontrados nas células do hipoblasto, que migram ao longo da superfície interna do trofoblasto.

O embrião equino de oito dias apresenta blastocele envolvida por duas camadas teciduais - uma mais externa composta por células do trofoblasto, e outra interna, composta por células de origem embrionária - que formam o correspondente ao hipoblasto (LANDIM-ALVARENGA et al, 1994). Desta forma, como a individualização dessas camadas não foi realizada, no presente experimento, permanece a dúvida se o Oct-4 está sendo expresso pelas células do trofoblasto ou por aquelas da camada endodérmica que recobrem a blastocele.

4 CONCLUSÕES

Os resultados deste experimento e a revisão sobre a expressão do Oct-4 permitem afirmar que a expressão do gene Oct-4 no cultivo de CTE não é suficiente para a seleção e confirmação de linhagens indiferenciadas na espécie equina.

O primer desenhado para a detecção do gene Nanog (SENSE 5'-TGT TCT CTC AGR CCC AGC TS-3' e ANTISENSE 5'-CAG YYY AYT TTT GCT GSA AC 3'') foi incapaz de identificar a expressão gênica em amostras equinas e murinas.

O embrião equino no estágio de blastocisto expressa o gene Oct-4 nas células do trofoblasto e na massa celular interna.

Células da MCI em cultivo *in vitro* mantém a expressão do gene Oct-4 após o segundo repique celular.

Capítulo IV

CONSIDERAÇÕES FINAIS:

O presente estudo indicou que a Imunocirurgia foi o melhor método de isolamento da MCI com aproveitamento de 16.7% dos blastocistos utilizados.

A manutenção do estado indiferenciado é dependente da presença de monocamada de suporte composta por fibroblastos inativados e adição do Fator Inibidor de Leucemia, sendo que, somente a LIF é incapaz de manter o cultivo. No presente experimento, as CTE puderam ser mantidas em monocamadas de origem heteróloga, essa conclusão esta de acordo com os dados publicados por Li et al (2005).

A morfologia das CTE cultivadas foi similar às de origem humana, com alta proporção núcleo:citoplasma, colônias com bordas delimitadas e pouco sobrepostas, formada por células muito aderidas e de tamanho pequeno. Li et al. (2005) também obteve cultivo de células com baixa proporção núcleo:citoplasma. Além disso, Saito et al. (2002) reportaram encontrar colônias com características similares ao deste presente estudo, entretanto, afirmaram ser possível manter o estado indiferenciado apenas com a monocamada de suporte, esse achado não foi repetido por Li et al. (2005), nem pelo presente experimento.

O gene Oct-4 apesar de expressar uma proteína característica de linhagens pluripotentes e estar relacionado ao desenvolvimento de células germinativas em camundongos e humanos apresenta distribuição diferente no embrião equino. Ele pode ser encontrado nas células do trofoblasto e é

expresso em tecidos extra-embrionários assim como em tecidos fetais já diferenciados. Os dois trabalhos publicados sobre CTE equinas não avaliaram a expressão desse gene em comparação com amostras diferentes, tendo sido demonstrado, no presente experimento que a expressão do gene Oct-4 não é capaz de confirmar a pluripotência excluindo a diferenciação celular para tecidos extra embrionários. O mesmo já havia sido comprovado em bovinos por Kurasaka et al. (2004).

A escassez de trabalhos sobre cultivo de CTE equinas e sua expressão genica torna impossível que seja estabelecido, até a presente data, um protocolo de cultivo capaz de potencializar a produção de células, assim como estabelecer suas características morfológicas. Nenhum grupo de pesquisa foi capaz de produzir quimeras a partir das células cultivadas. O presente estudo, no entanto, foi capaz de identificar um protocolo capaz de manter as CTE em cultivo e o melhor método de isolamento da MCI.

REFERÊNCIAS

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

ANDREWS, P.W., CASPER, J., DAMJANOV, I., DUGGAN-KEEN, M. Comparative analysis of cell surface antigens expressed by cell lines derived from human germ cell tumours. **International Journal of Cancer**. V.66, p. 806–816,1996.

BENJAMIN E. R., MARTIN F. P., CHUI-YEE FONG, A. T., BONGSO, A. Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro, **Nature Biotechnology**, v.18, p.398-404, 2000.

BREVINI, T.A.L., TOSETTI, V., CRESTAN, M., ANTONINI,S. ,GANDOLFI,F. Derivation and characterization of pluripotent cell lines from pig embryos of different origins. **Theriogenology**, v.67, p.54-63, 2007.

CAUFFMAN G, VAN DE VELDE H, LIEBAERS I, VAN STEIRTEGHEM A. Oct-4 mRNA and protein expression during human preimplantation development **Molecular Human Reproduction** v.11(3),p.173-81, 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**. v.30, p.643-55. 2003.

CHUNG, YOUNG; KLIMANSKAYA, IRINA; BECKER, SANDY; MARH. Embryonic and extra embryonic stem cell lines derived from single mouse blastomeres. **Nature** v.439,p. 216-219, 2006.

CORTEZ J.L., L. SÁNCHEZ, P. CATALINA, F. COBO, C. BUENO, A. MARTÍNEZ-RAMIREZ, A. NIETO; P. MENENDEZ. Whole-blastocyst culture followed by laser drilling technology enhances the efficiency of inner cell mass isolation and embryonic stem cell derivation from good- and poor-quality mouse embryos: new insights for derivation of human embryonic stem cell lines. **Stem Cells And Development** v.17, p.255–267, 2008.

COWAN, C A; KLIMANSKAYA, I; MCMAHON, J; ATIENZA, J; WITMYER, J; ZUCKER, J P; WANG, S P; MORTON, C C; MCMAHON, A P;POWERS, D; MELTON, D.A. Derivation of embryonic stem-cell lines from human blastocysts **Journal. New England Journal of Medicine**, v.350 (13):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 USA** ;v,95(18):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**. V.133(6): p.1193-201, 2006.

DAVEY R.E; ONISHI, K; MAHDAVI, A; ZANDSTRA, P.W. :LIF-mediated control of embryonic stem cell self-renewal emerges due to an autoregulatory loop. **FASEB Journal**, v. 21(9):p.2020-32. 2007.

DOETSCHMAN T, WILLIAMS P, MAEDA N. Establishment of hamster blastocyst derived embryonic stem (ES) cells. **Developmental Biology**. v. 127, p.224-227,1988.

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

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**. v: 24(10),p. 2170-6, 2006.

ESHKIND, L; TIAN ,Q; SCHMIDT, A; FRANKE W. W.; WINDOFFER, R; LEUBERE. Loss of desmoglein 2 suggests essential functions for early embryonic development and proliferation of embryonal stem cells. **European Journal of Cell Biology**. V.;81(11):p.592-8, 2002.

EVANS, M.J. AND KAUFMAN, M.H. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. **Nature**. v. 292, p.154–156,1981.

FRIEL, E.; SAR,S.; MEE, J.P. Embryonic stem cells: understanding their history, cell biology and signalling. **Advanced Drug Delivered Reviews**, v. 57, p.1894-1903, 2005.

HEIDERSBACH,A., GASPAR-MAIA, A., MCMANUS1, MT, RAMALHO-SANTOS M, RNA interference in embryonic stem cells and the prospects for future therapies. **Gene Therapy** 13, 478–486, 2006.

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**, v. 22 (3):p. 367-376, 2004.

HOFFMAN LM AND CARPENTER MK. Characterization and culture of human embryonic stem cells. **Nature Biotechnology**, v. 23,p.699–708, 2005.

HYSLOP, L., STOJKOVIC, M., ARMSTRONG, L., WALTER, T., STOJKOVIC,P., PRZYBORSKI, S., HERBERT, M., MURDOCH, A., STRACHAN, T., AND LAKO, M.. Downregulation of NANOG induces differentiation of human embryonic stem cells to extraembryonic lineages. **Stem Cells**, v. 23: 1035–1043. 2005.

KIRCHHOF, N., J.W. CARNWATH, E. LEMME, K. ANASTASSIADIS, H. SCHÖLER AND H. NIEMANN. Expression pattern of Oct-4 in preimplantation embryos of different species. **Biology of Reproduction** v.63(6), p.1698-1705, 2000.

KUROSAKA S, ECKARDT S, MCLAUGHLIN KJ Pluripotent lineage definition in bovine embryos by Oct4 transcript localization. **Biology of Reproduction.** v.71(5):p.1578-82, 2004.

LANDIM-ALVARENGA F.C., FERREIRA, J.C.P., ALVARENGA M.A., YABUKI A.T. Correlative scanning and transmission electron microscopy observations of a 9 day old horse embryo. **Revista Brasileira de Ciencias Morfológicas.**, v.11 p.4-8. 1994.

LI ,X; ZHOU, S.G; IMREH, M.P, ALLEN, W.R . Horse embryonic stem cell lines from the proliferation of inner cell mass cells. **Stem Cells Development** v.15, p. 523–53.2006

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

MCKINNON, A.O., SQUIRES, E.L., Equine embryo transfer. **Veterinary Clinicians North America: Equine Practitioners**, v.4, p.305-33, 1988.

MINGRONI-NETTO, R.C.; DESSEN E.M.B. Células-tronco: o que são e o que serão? **Genética na Escola**.Revista on line. Sociedade Brasileira de Genetica, v. 1, 2008.

MITSUI K, TOKUZAWA Y, ITOH H. The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. **Cell**; v.113:p.631-64, 2003.

MONTOYA, F.U., VERFAILLIE, M.C.; HU, W. Culture systems for pluripotent stem cells, J. **Bioscience and bioengineering**, v.100, p.12-27, 2005.

MOON,S.Y.; PARK, Y.B.; KIM,D.; OH, S.K., KIM,D. Generation, culture and differentiation of human embryonic stem cells for therapeutic applications.

Molecular Therapy, V.13(1),2006.

NAGY,A; ROSSANT,J.; NAGY R.; ABRAMOWNEWERLY,W.; RODER,J.C.

Derivation of completely cell culture-derived mice from early-passage embryonic stem cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**. v.90, p. 8424-8428, 1993.

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**, V. 31, p. 269-278,2007.

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

NIWA, H., MIYAZAKI, J., AND SMITH, A.G.. Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. **Nature Genetics**. 24, 372–376, 2000.

NOTARIANNI E, GALLI C, LAURIE S, MOOR RM, EVANS MJ. Derivation of pluripotent, embryonic cell lines from the pig and sheep. **Journal Reproduction Fertility Supplemental**. v.43: p.255-260, 1991.

PARK, I.H., ZHAO, R., WEST, J.A., YABUUCHI, A., HUO, H., INCE, T.A., LEROU, P.H., LENSCH, M.W., AND DALEY, G.Q. Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors. **Nature**. v.451, p.141–146, 2008.

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

ROY A, KRZYKWA E, LEMIEUX R, NÉRON S. Increased efficiency of gamma-irradiated versus mitomycin C-treated feeder cells for the expansion of normal human cells in long-term cultures. **Journal Hematotherapy and Stem Cell Research**. v.10(6), p.873-80, 2001.

SAITO, S., UGAI, H.; SAWAI, K., YAMAMOTO, Y., Isolation of embryonic stem-like cells from equine blastocysts and their differentiation in vitro. **FEEBS Letters**, v.531, p. 389-396, 2002.

SCHÖLER, H.R., Octamania: the POU factors in murine development. **Trends Genetics** v.7, p. 323–329, 1991.

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. **PNAS**. v. 97, p.11307–11312, 2000.

SINGEC, I; JANDIAL, R; CRAIN, A; NIKKHAH, G; SNYDER EVAN, Y. The leading edge of stem cell therapeutics. **Annual review of medicine**. V.;58(), p.313-282007

SMITH, A.G.Origins and properties of mouse embryonic stem cells. **Annual Review Cell Development Biology**, 2001.

SOLTER, D. AND KNOWLES, B.B. Immunosurgery of mouse blastocyst. **Proc Natl Acad Sci USA**. v.72 (12):p.5099-102,1975.

STRÖM S, INZUNZA J, GRINNEMO KH, HOLMBERG K, MATILAINEN E, STRÖMBERG AM, BLENNOW E, HOVATTA O: Mechanical isolation of the inner cell mass is effective in derivation of new human embryonic stem cell lines. **Human Reproduction**. v.22(12), p.3051–3058, 2007.

TESAR, P.J., CHENOWETH, J.G., BROOK, F.A., DAVIES, T.J., EVANS, E.P., MACK, D.L., GARDNER, R.L., MCKAY, R.D. New cell lines from mouse epiblast share defining features with human embryonic stem cells. **Nature** v. 448:196–199, 2007.

THOMSON, J.A. AND MARSHALL, V.S. Primate embryonic stem cells. **Current Topics Development Biology**, v. 38, p.133–165, 1998.

THOMSON, J.A., ITSKOVITZ-ELDOR, J., SHAPIRO S.S.; WAKNITZ A.M, JEFFREY, M.J. Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts. **Science**, v. 282, p. 1145-1148, 1998.

TUTTER AV, BALTUS GA, KADAM S. Embryonic stem cells: a great hope for a new era of medicine. **Current Opinion Drug Discovery and Development**. v. 9(2):p.169-75, 2006.

VALLIER, L., ALEXANDER M., PEDERSEN R. A : Activin/Nodal and FGF pathways cooperate to maintain pluripotency of human embryonic stem cells. **Journal of Cell Science** v.118, p. 4495-4509, 2005.

VEJLSTED, M.; OFFENBERG, H.; THORUP, F.; MADDOX-HYTTEL, P. Confinement and clearance of Oct-4 in the porcine embryo at stereomicroscopically defined stages around gastrulation. **Molecular Reproduction Development**, v. 73, p. 709-718, 2006.

YADAV PS, KUES WA, HERRMANN D, CARNWATH JW, NIEMANN H. Bovine ICM derived cells express the Oct-4 ortholog. **Molecular Reproduction Development**. v. 72(2):p.182-90, 2005.

YUAN, H., CORBI, N., BASILICO, C., AND DAILEY, L. Developmental-specific activity of the FGF-4 enhancer requires the syneraction of Sox2 and Oct-3. **Genes Development**, v.9, p. 2635–2645, 1996.