



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



"CULTIVO E CARACTERIZAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO EMBRIONÁRIAS DE BOVINOS"

MIDYAN DAROZ GUASTALI

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração Biologia Celular Estrutural e Funcional.

Orientadora: Fernanda da Cruz Landim

BOTUCATU-SP

2012



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"Júlio de Mesquita Filho"
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

"CULTIVO E CARACTERIZAÇÃO DE CÉLULAS TRONCO
EMBRIONÁRIAS DE BOVINOS"

MIDYAN DAROZ GUASTALI

FERNANDA DA CRUZ LANDIM

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração Biologia Celular Estrutural e Funcional.

BOTUCATU – SP
2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: *SULAMITA SELMA CLEMENTE COLNAGO*

Guastali, Midyan Daroz.

Cultivo e caracterização de células-tronco embrionárias bovinas / Midyan
Daroz Guastali. – Botucatu : [s.n.], 2012

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de
Biotecnologia de Botucatu

Orientador: Fernanda da Cruz Landim

Capes 20601000

1. Células-tronco embrionárias. 2. Bovino. 3. Células – Cultura e meios
de cultura.

Palavras-chave: Blastocistos; Bovinos; Células-tronco embrionárias; Cultivo
celular; Marcadores moleculares.

DEDICATÓRIA

A Deus, pela vida e pela força para superar os obstáculos e conquistar meus objetivos.

AGRADECIMENTOS

À minha mãe, pelo amor incondicional e fiel, pilar essencial para a concretização deste sonho.

Ao meu pai, pelas palavras de encorajamento e confiança na minha caminhada.

Ao Joel, por todo o incentivo, interesse e respeito pelo meu trabalho. Suas palavras de sabedoria me fizeram perceber a riqueza das pequenas coisas.

Ao meu irmão Mathias, pessoa muito especial. Sempre esteve ao meu lado, trocando informações, confortando e dando apoio nos vários momentos da vida.

Ao meu namorado Renê, por toda a paciência, compreensão e exemplo de superação. Ao lado dele aprendi que os dias podem ser mais leves, simples e muito mais divertidos.

À minha família, que, mesmo estando a alguns quilômetros de distância, sempre estava perto transmitindo carinho e apoio.

À Prof^a Dr^a Fernanda da Cruz Landim, pela orientação deste trabalho, também pela amizade e incentivo constante. Acreditou em meu propósito e sempre deu forças para lutar.

Aos amigos do Laboratório de LANÇA: Daniela, Mateus, Rosiara, Tatiana, João, Camila, Isadora, Amanda, Henrique, Bianca, Loreta, Bruna e agregados de outros laboratórios. Obrigada pelo companheirismo precioso durante essa etapa.

Às amigas da República Gandaia: Gabriela (Muxiba), Mariana (Tuga), Simone (Mazza), Yve (Cólica), Jaqueline, Ivana (Xev's) e Bruna (Twix) pela amizade, paciência e convívio harmonioso. A energia dessas meninas foi um grande incentivo a prosseguir.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada-IBB-UNESP e seus colaboradores pela agilidade e competência.

Aos professores, Dr. Wellerson Rodrigo Scarano, Dr^a Patrícia Fernanda Felipe Pinheiro, Dr^a Maria Terezinha Serrão Peraçoli pela contribuição no exame de qualificação.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pela concessão da bolsa de mestrado e auxílio financeiro do projeto.

À todos que de alguma forma estiveram envolvidos com esse trabalho e que permitiram assim, que uma simples ideia se transformasse em um grande projeto.

Muito obrigada a todos!

EPÍGRAFE

“Lute com determinação, abrace a vida com paixão, perca com classe e vença com ousadia, porque o mundo pertence a quem se atreve e a vida é muito para ser insignificante”. Charles Chaplin

SUMÁRIO

1. <i>Resumo</i>	6
2. <i>Abstract</i>	8
3. <i>Introdução</i>	9
4. <i>Revisão de Literatura</i>	
4.1. <i>Células-Tronco Pluripotentes</i>	10
4.2. <i>Células-Tronco Multipotentes</i>	12
4.3. <i>Cinética Celular das Células-Tronco</i>	15
4.4. <i>Células-Tronco Embrionárias</i>	16
4.5. <i>Produção de Embriões in vitro</i>	18
4.6. <i>Cultivo das Células-Tronco Embrionárias</i>	20
4.7. <i>Cultivo de Fibroblastos de Pele</i>	23
4.8. <i>Caracterização da Pluripotência das Células-tronco Embrionárias</i>	25
5. <i>Objetivos</i>	28
6. <i>Capítulo I</i>	
<i>Título</i>	29
<i>Resumo</i>	29
<i>Abstract</i>	30
<i>Introdução</i>	31
<i>Objetivos</i>	32
<i>Materiais e Métodos</i>	32
<i>Resultados</i>	37
<i>Discussão</i>	41
<i>Conclusão</i>	44
<i>Referências Bibliográficas</i>	45
7. <i>Capítulo II</i>	
<i>Título</i>	48
<i>Resumo</i>	48
<i>Abstract</i>	49
<i>Introdução</i>	50
<i>Objetivos</i>	51
<i>Materiais e Métodos</i>	51
<i>Resultados</i>	57
<i>Discussão</i>	61
<i>Conclusão</i>	65
<i>Referências Bibliográficas</i>	65
8. <i>Referências Bibliográficas da Introdução</i>	69

RESUMO

1.RESUMO

Introdução: Células tronco embrionárias (CTE) são caracterizadas pelas capacidades de auto-renovação e diferenciação. No entanto, os mecanismos moleculares que regulam estes dois processos são mal compreendidos. CTE de camundongos foram originalmente isoladas a partir da massa celular interna (MCI) de blastocistos produzidos *in vitro* e *in vivo* e mantidas em cultura sem perda da pluripotência, originando tecidos das três camadas germinativas. Há profundo interesse em conhecer os processos envolvidos na proliferação e diferenciação das células embrionárias contribuindo, no futuro, para engenharia de tecidos e clonagem terapêutica. **Objetivos:** Comparar o potencial gerador de CTE de embriões bovinos produzidos *in vitro* em meio contendo alta e baixa concentração de soro, assim como avaliar a manutenção da pluripotência das células em cultivo através da ação de dois fatores, a LIF e o bFGF, utilizados isoladamente ou em conjunto, no cultivo *in vitro* de CTEbov. **Materiais e métodos:** Foram utilizados blastocistos bovinos com 9 dias de desenvolvimento *in vitro* para remoção da massa celular interna (MCI) e posterior cultivo das mesmas em placas tratadas com monocamada de fibroblastos bloqueados. As colônias celulares semelhantes a células-tronco foram analisadas através da identificação da expressão *in situ* dos fatores de indiferenciação Oct-4, Nanog, SSEA-1, SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60, TRA-1-81. Os blastocistos bovinos com 9 dias de idade também foram submetidos à marcação imunocitoquímica. Adicionalmente foi avaliado o potencial de diferenciação *in vitro* das CTEbov para linhagens celulares de origem endodermal, mesodermal e ectodermal. **Resultados:** Em média, 525 embriões de cada um dos dois grupos (2,5% e 10% de soro fetal bovino, respectivamente) foram selecionados para o isolamento da MCI. Foram utilizados 300 blastocistos iniciais, 160 blastocistos expandidos e 45 blastocistos eclodidos por grupo. No entanto, somente os blastocistos expandidos aderiram à monocamada de fibroblastos e se desenvolveram em colônias semelhantes a células tronco. Alguns blastocistos eclodidos não aderiam e formavam corpos embrióides císticos permanecendo em suspensão. Das 21 rotinas realizadas utilizando-se embriões produzidos em presença de 10% de SFB 10 (47,6%) resultaram na formação de colônias semelhantes a CTE. Já quando foram utilizados embriões produzidos em presença de 2,5% de SFB o índice de formação de colônias foi de 52,4% (11/21). Da mesma forma não se observou diferença quanto à morfologia das células presentes nas culturas obtidas a partir dos dois tipos de embriões. A LIF foi

essencial para o cultivo das CTE, já a presença de bFGF não demonstrou diferença significativa. Observaram-se, por imunofluorescência que as proteínas Oct4, Nanog, SSEA-3 e TRA-1-81 estavam presentes tanto na MCI quanto no trofoblasto dos blastocistos produzidos in vitro. Não se observou marcação quanto às proteínas SSEA-1, SSEA-4 e TRA-1-60. O controle negativo não apresentou fluorescência para nenhuma proteína. Da mesma forma, as células em cultivo foram marcadas positivamente para as mesmas proteínas observadas nos blastocistos. **Conclusão:** Blastocistos cultivados in vitro por 9 dias são potencialmente melhores doadores de MCI, as colônias de células isoladas realmente são células-tronco embrionárias confirmadas pelas marcações imunocitoquímicas.

Palavras-chaves: Células-tronco embrionárias; bovinos; LIF; bFGF; marcadores de pluripotência.

ABSTRACT

2.ABSTRACT

Introduction: Embryonic stem cells (ESC) are characterized by their capacity for self-renewal and differentiation. However, the molecular mechanisms which regulate these two processes are poorly understood. ESC of mice were originally isolated from the inner cell mass (ICM) of blastocysts in vitro and in vivo and maintained in culture without loss of pluripotency, yielding three germ layers of tissue. There is keen interest in learning about the processes involved in proliferation and differentiation of embryonic cells contribute in the future, tissue engineering and therapeutic cloning.

Objectives: to compare the potential generator ESC of bovine embryos produced in vitro in medium containing high and low concentrations of serum, as well as evaluating the maintenance of pluripotency of the cells in culture through the action of two factors, the LIF and bFGF, used singly or together, in vitro cultivation of ESCbov. **Materials**

and methods: We used bovine blastocysts to nine days of in vitro development to remove the inner cell mass (ICM) and further cultivation of the same plates treated with fibroblast monolayer blocked. The cell colonies similar to stem cells were analyzed by in situ identification of the expression of differentiation factors Oct-4, Nanog, SSEA-1, SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60, TRA-1-81 . The bovine blastocysts with 9 days of age were also subjected to immunocytochemical labeling. Additionally it was evaluated the potential of differentiation in vitro of cell lines to ESCbov endodermal origin, mesodermal and ectodermal. **Results:** The average 525 embryos from each of the two groups (2.5% and 10% fetal bovine serum, respectively) were selected for isolation of the ICM. Early blastocysts were used 300, 160 expanded blastocysts and 45 hatched blastocysts per group. However, only expanded blastocysts adhered to the monolayer of fibroblasts and developed into colonies similar to stem cells. Some hatched blastocysts did not adhere and formed cystic embryoid bodies remained in suspension. 21 of the routines performed using embryos produced in the presence of 10% FCS 10 (47.6%) resulted in the formation of colonies similar to ESC. Now, when used embryos were produced in the presence of 2.5% FCS the rate of colony formation was 52.4% (11/21). Likewise there was no difference in the morphology of the cells present in the cultures obtained from both types of embryos. The LIF was essential to the cultivation of the ESC, since the presence of bFGF showed no significant difference. It was observed by immunofluorescence proteins Oct4, Nanog, SSEA-3 and TRA-1-81 were present both in the ICM and the trophoblast in vitro produced blastocysts. There was no protein as marking SSEA-1 and SSEA-4-TRA 1-60. The negative control showed no fluorescence for any protein. Similarly, cells in culture were positively stained for the same protein observed in blastocysts. Conclusion: blastocysts cultured in vitro for 9 days are potentially suitable donors ICM, isolated colonies of cells are truly embryonic stem cells confirmed by immunocytochemical markers.

Keywords: Embryonic stem cells, bovine, LIF, bFGF, markers of pluripotency.

INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

3. INTRODUÇÃO

Apesar da grande diversidade de células que podem ser reconhecidas em tecidos adultos, todas derivam de uma única célula-ovo, após a fecundação de um oócito por um espermatozóide. Essa única célula tem, portanto, a propriedade de formar todos os tecidos do indivíduo adulto. Inicialmente, essa célula divide-se formando células idênticas, mas, muito precocemente na formação do embrião, os diferentes grupos celulares vão adquirindo características especializadas e, ao mesmo tempo, vão restringindo sua capacidade de diferenciação (ALBERTS *et al.*, 2010)

No entanto, na maioria dos tecidos adultos existem reservas de células com capacidade de multiplicar-se, diferenciando-se naquele tecido a que pertencem e ao mesmo tempo mantendo essa própria reserva de células indiferenciadas. Essas células-tronco tecido-específicas são as responsáveis pela manutenção da integridade dos tecidos adultos, pelo reparo de tecidos lesados e pela remodelação dos tecidos e órgãos (JUNQUEIRA E CARNEIRO, 2005). Não se sabe ainda se no adulto persistem células com a capacidade de diferenciação ilimitada ou de formar múltiplos tecidos, ou seja, células-tronco pluripotentes; se existem, devem ser muito raras e de difícil isolamento. Essas células progenitoras capazes de diferenciar-se em tecidos adultos especializados são denominadas células-tronco (CT).

As CT podem ser definidas segundo três propriedades: I) auto-renovação, ou seja, capacidade de originar outra CT com características idênticas; II) habilidade de se diferenciar em mais de uma linhagem celular; e III) capacidade de originar células funcionais nos tecidos derivados da mesma linhagem (VERFAILLIE *et al.*, 2002). Assim, as CT são células indiferenciadas capazes de se diferenciar originando progenitores maduros, bem como células efectoras completamente diferenciadas.

É importante distinguir as CT dos muitos tipos de células progenitoras (CP), de forma que as primeiras se auto-renovam por toda a vida de um organismo, enquanto as CP possuem auto-renovação e potencialidade limitadas.

As CT podem ser classificadas segundo a potencialidade em toti, pluri ou multipotentes. São chamadas de totipotentes as células capazes de gerar todos os tipos celulares embrionários e extra-embrionários, como o zigoto e o blastômero; as

pluripotentes podem originar todas as células que formam um embrião (propriamente dito) e são provenientes da massa interna do blastocisto (CT-embrionárias); são classificadas como multipotentes as células que originam apenas um subgrupo de linhagens celulares, por exemplo, as CT-mesenquimais (CTM) e neurais. Existem ainda células oligopotentes, capazes de gerar células mais restritas a uma linhagem do que as multipotentes, e as unipotentes, que originam apenas um único tipo celular maduro (WAGERS & WEISSMAN, 2004). Estas duas últimas devem ser consideradas células progenitoras e não-CT. Sendo esta uma área nova, é comum a confusão de conceitos e o uso impróprio das definições acima.

As células tronco embrionárias (TCE) estão bem caracterizadas em camundongos e humanos. Entretanto em espécies de ungulados, a caracterização destas células em cultivo ainda não ocorreu de maneira eficiente. A falta de marcadores exclusivamente expressos pelas células pluripotentes é frequentemente indicada como uma das responsáveis por esse problema (KEEFER et al., 2007; MUÑOZ et al., 2008). Discrepâncias entre os níveis de detecção dos diferentes marcadores de CTE têm sido observados na literatura indicando a necessidade de maiores estudos sobre os fatores envolvidos na regulação da pluripotência em CTE de bovinos.

4. REVISÃO DA LITERATURA

4.1. CÉLULAS-TRONCO PLURIPOTENTES

São células capazes de dar origem aos mais de 250 tipos diferentes de tecidos do adulto. São obtidas a partir do embrião em sua fase precoce do desenvolvimento e cultivadas *in vitro*. Incluem células derivadas do embrião, do feto ou de um tipo de célula híbrida em um processo chamado de transferência de núcleo somático também conhecido como clonagem (ZAGO E COVAS, 2006).

Células-tronco embrionárias: quando o oócito (contendo 23 cromossomos de origem materna, no humano, ou metade de material genético nuclear de uma célula do corpo) é fecundado pelo espermatozóide (contendo 23 cromossomos de origem paterna), forma-se uma célula cujo núcleo contém 23 pares de cromossomos. Essa célula sofre repetidas divisões formando um embrião que, se conseguir implantar-se no útero, poderá desenvolver-se até a fase final de um feto e finalmente um adulto. Na fase

inicial desse processo (4º ou 5º dia), o “embrião” (neste momento chamado blastocisto) contém uma camada externa e uma massa celular interna. As células da massa celular interna vão dar origem ao feto e a parte dos tecidos extra fetais (âmnio e alantóide), ao passo que a camada externa de células (trocotoderma) vai originar alguns tecidos restritos da placenta. Essas células da massa celular interna podem ser retiradas e cultivadas, dando origem a linhagens de células-tronco embrionárias, que têm capacidade de diferenciar-se nos tecidos do adulto.

Células germinais embrionárias: numa fase mais avançada do desenvolvimento fetal (5ª a 10ª semana), da região da prega gonadal (de onde vão se originar as células germinais do adulto) podem ser retiradas células que dão origem a células pluripotentes, geralmente denominadas células embrionárias germinais.

Transferência do núcleo somático (chamado também de clonagem): Esse método permite criar uma célula pluripotencial a partir de uma célula somática. O núcleo de uma célula adulta é retirado e transferido para um oócito do qual o próprio núcleo foi removido. Essa célula híbrida pode ser estimulada a se dividir, originando uma massa celular semelhante à blástula de um embrião normal. Dessa massa celular podem ser retiradas células que, sob condições apropriadas, diferenciam-se em muitos (ou todos) tecidos do organismo.

O objetivo inicial do cultivo de células-tronco embrionárias de camundongos era apenas obter animais transgênicos. Em 1998, o pesquisador James Thomson, da University of Wisconsin (THOMSON *et al.*, 1998) e o pesquisador John Gearhart, da Johns Hopkins University (GEARHART *et al.*, 1998) entraram para a história como os primeiros cientistas a cultivarem células-tronco embrionárias humanas (CTEH) *in vitro*.

O uso dessas células em terapias celulares, para diversos tipos de doenças, traz consigo muitas questões éticas. A primeira delas vem do fato de se utilizar embriões derivados de fertilização *in vitro* para obtenção das CTEH. A Lei de Biossegurança, que será discutida mais adiante, foi sancionada em março de 2005 e permite que embriões congelados, há mais de três anos, sejam utilizados para pesquisas, desde que os pais façam essa doação. Essa lei corre o risco de ser considerada inconstitucional, conforme o pedido de Ação Direta de Inconstitucionalidade (ADI 3.510), apresentado ao Supremo Tribunal Federal. Isso se deve ao fato de vários grupos, religiosos ou não, lutarem contra o uso de CTEH, por considerarem os embriões congelados vidas em potencial (ZAGO E COVAS, 2006).

Outra polêmica, em torno do uso dessas células é a clonagem terapêutica (transferência nuclear), que consiste na fusão de uma célula somática de um indivíduo adulto com um oócito sem núcleo, gerando, assim, um blastocisto com as características genéticas do doador da célula somática.

Dessa forma, poderiam obter-se CTEH feitas sob medida para cada paciente, evitando problemas de rejeição. No entanto, muito se discute sobre a geração de novos embriões para fins terapêuticos, considerando-se que isso poderia incentivar um comércio de embriões. Outro problema ético, relacionado à clonagem terapêutica, é que a técnica seria a mesma para se clonar um indivíduo, como a utilizada na clonagem da ovelha Dolly (CAMPBELL, 1996) só que, no caso da clonagem terapêutica, esse processo se interromperia no quinto dia após a fertilização.

Questões religiosas também levantam dúvidas sobre o uso dessas células. A principal questão é: quando começa a vida?

Para os judeus, após a adesão do oócito fecundado à parede do útero (nidação). Para os católicos, após a fecundação. A clonagem terapêutica não envolve fecundação e, dessa forma, não se encaixaria na questão (SCHWINDT, 2005). Os pesquisadores brasileiros planejam criar uma rede nacional de células-tronco, para terem o direito de isolar as linhagens de CTEH no Brasil e não dependerem de pesquisadores estrangeiros para a obtenção dessas células (ZAGO E COVAS, 2006). Há diversos países onde tanto a obtenção de novas linhagens de CTEH como a clonagem terapêutica são possíveis.

4.2.CÉLULAS-TRONCO MULTIPOTENTES

No outro extremo, temos as CT-adultas que, ao contrário das CTE, não são capazes de manter suas propriedades por longos períodos em cultura e podem ser induzidas à diferenciação com a administração de fatores de crescimento apropriados ou outros sinais externos (WURMSER, 2004). Uma das fontes mais utilizadas para extração de CT-adultas é a medula óssea, amplamente estudada face ao uso clínico em transplantes. Nesse tecido, encontramos dois tipos de CT: as hematopoiéticas e as mesenquimais. As CT-hematopoiéticas são responsáveis por toda progênie granulocítica e mielocítica. Além da medula óssea, vários outros tecidos possuem suas próprias CT-mesenquimais, como sangue periférico, tecido adiposo e sangue de cordão umbilical, entre outros. Vários grupos evidenciaram que as células extraídas de medula óssea

podem tornar-se precursores de células neurais e de células hepáticas, além dos três tipos de músculo – cardíaco, esquelético e liso (BONILLA *et al.*, 2005; FERRARI *et al.*, 1998; MINGUELL *et al.*, 2000; ORLIC *et al.*, 2001; PETERSEN *et al.*, 1999; SCHWARTZ *et al.*, 2002). Mais recentemente, com a descoberta da neurogênese em mamíferos adultos (KEMPERMANN *et al.*, 2004), sugeriu-se a existência de CT-neurais no encéfalo adulto, ocorrendo em dois locais principais: na zona subventricular (ZSV) dos ventrículos laterais, que geram os neurônios do bulbo olfatório (ALVAREZ-BUYLLA *et al.*, 2002) e na zona subgranular do hipocampo (ERIKSSON *et al.*, 1998). Outro tipo de células-tronco são as CT-fetais, que assim como as adultas, não se diferenciam espontaneamente e ainda apresentam outras vantagens: estão presentes em abundância por todo o organismo em desenvolvimento e possuem maior potencial de auto-renovação. Teoricamente, pode-se isolar CT-fetais de qualquer tecido, desde que a extração ocorra durante a formação destes tecidos no período fetal. No entanto, há importantes questões éticas envolvidas na extração de tais células de humanos. As CT-fetais e adultas, sendo mais comprometidas a determinadas linhagens celulares, são consideradas multipotentes.

No entanto, há inúmeros trabalhos indicando que CT provenientes de um tecido possuem a capacidade de originar células específicas de outro tecido não-relacionado. Assim, foram criadas algumas hipóteses que tentam explicar os mecanismos pelos quais a diferenciação celular ocorre (WAGERS *et al.*, 2004). Vale ressaltar que os mecanismos evocados parecem depender da população celular e do tecido analisado. De forma geral, as CT expressam, em sua superfície, muitas moléculas associadas a interações célula-célula e célula-matriz (MINGUELL *et al.*, 2000; PROCKOP, 1997). Os mecanismos de sinalização celular são de fundamental importância no processo de diferenciação, levando em conta que as CT, ao se dividirem, podem originar uma célula filha idêntica e outra mais especializada (divisão assimétrica) de acordo com o microambiente (LIN, 2003).

A transdiferenciação é um dos mecanismos propostos para explicar, por exemplo, a origem de células da linhagem hematopoiética a partir de CT-neurais (BJORNSSON *et al.*, 1999) e a diferenciação de células da medula óssea em células neurais e hepatócitos.

Nesse mecanismo, a conversão de uma linhagem a outra ocorreria diretamente, a partir da ativação de um conjunto de genes que alteraria a especificidade celular. A conversão entre diferentes linhagens celulares também poderia ocorrer via de

diferenciação, um estágio intermediário, em que uma célula especializada torna-se uma célula mais primitiva, multipotente, para então se rediferenciar em outro tipo celular. (HU *et al.*, 2010).

Uma terceira explicação baseia-se na pureza e na homogeneidade da população em estudo, ou seja, há a possibilidade de coexistirem distintos tipos de CT e progenitores em um tecido, que contribuiriam para o surgimento dos outros tipos celulares (KUHN, 2010). A contribuição de células entre diversos tecidos também pode ocorrer a partir da ação de uma única CT-pluripotente, que é capaz de dar origem a células de tecidos formados a partir de diferentes folhetos embrionários.

O último mecanismo de plasticidade a ser considerado é a fusão celular em que, após a fusão entre células de diferentes linhagens, os marcadores das células do hospedeiro são transferidos para a célula fundida (ACQUISTAPACE *et al.*, 2011).

Terada *et al.*, 2002 demonstraram, *in vitro*, que células da medula óssea podem fundir-se espontaneamente com células-tronco embrionárias. Dessa forma, as células da medula óssea fundidas podem assumir o fenótipo das células receptoras, sugerindo uma “transdiferenciação” (TERADA *et al.*, 2002; WURMSER, 2004). No entanto, parece improvável que o mecanismo de fusão seja responsável pela regeneração tecidual em larga escala, visto a baixíssima frequência com que esse evento ocorre.

Em diversos estudos, a proporção de CT transplantadas, que foram incorporadas pelo tecido lesado e que se diferenciaram, não explica a melhora funcional observada (SVENDSEN & LANGSTON, 2004). Assim, uma explicação relevante para a regeneração tecidual após aplicação de CT é a liberação de citocinas e fatores tróficos no local da lesão. Como a maioria das CT é capaz de identificar e migrar até o local lesado, é clara sua capacidade de responder a fatores quimiotáticos (liberados pelo tecido lesado). Há ainda evidências de que estas células, por sua vez, podem ser capazes de liberar outras moléculas em resposta aos estímulos recebidos (BOULANGER & SHATZ, 2004). Há várias hipóteses quanto às supostas funções de tais fatores na lesão, dentre elas: liberação de moléculas que previnem a morte celular, recrutamento de CT adjacentes do próprio tecido (com subsequente diferenciação), interferência na inflamação provocada pelo dano tecidual (modulando a resposta do sistema imune), suporte de moléculas ou enzimas que suprem defeitos metabólicos (FALLON *et al.*, 2000; KELLY *et al.*, 2004; KERR *et al.*, 2003, MUÑOZ-ELIAS *et al.*, 2004).

Nos últimos cinco anos, diversos trabalhos têm fornecido pistas da existência de CT em praticamente todos os tecidos de um organismo adulto, não se tratando apenas de progenitores comprometidos, mas células com capacidade de se diferenciar em tipos celulares não relacionados ao tecido de onde provêm.

Se o próprio corpo possui essa gama de células com elevada potencialidade, então por que não ocorre regeneração completa de todos os tecidos, após a lesão aguda ou mesmo nas situações de desgaste natural e envelhecimento?

Provavelmente as CT mais potentes em um organismo adulto mantêm-se “indiferenciadas” desde estágios iniciais do desenvolvimento, porém estão sob controle de microambientes que sinalizam para uma especificidade celular de acordo com o contexto tecidual. Já na condição de cultura, tais células são estimuladas por diversos fatores que não existem em seu ambiente de origem e que alteram o seu comportamento (DISCHER, 2009). Assim sendo, muitos experimentos realizados *in vitro* não podem ser extrapolados para modelos *in vivo*. Em um futuro, não distante, uma possível estratégia será recrutar as CT presentes no próprio tecido lesado, a fim de que elas dividam-se e reparem o dano. Até lá, muitos estudos devem ser realizados no sentido de compreender a natureza das CT e sua importância no organismo adulto.

4.3.CINÉTICA CELULAR DAS CÉLULAS-TRONCO

Já foi dito que uma das propriedades fundamentais das células-tronco é a sua capacidade de passar por “divisão celular assimétrica”, quando ela dá origem a uma célula que vai se diferenciar e a uma outra, que retém as características de célula-tronco, permitindo que a população de células-tronco permaneça estável. As células das criptas intestinais, da epiderme e do sangue são exemplos de populações em equilíbrio, nas quais a perda contínua de células é compensada pela produção a partir de células-tronco (SNIPPERT *et al.*, 2010).

Muitas vezes, no entanto, a dinâmica do tecido precisa ser modificada, seja para produzir mais células-tronco ou mais células diferenciadas. O compartimento de células-tronco precisa ser expandido ou reparado, como, por exemplo, durante o crescimento corporal ou após uma lesão que o reduz ou destrói parcialmente. Neste caso as células-tronco podem passar por divisões simétricas. Por outro lado, após um grande

sangramento, a produção de células diferenciadas por parte da medula óssea aumenta significativamente. Além disso, parte da população está quiescente ou fora de ciclo. (LI & CLEVERS, 2010). As proporções de células que estão em ciclo ou fora de ciclo, ou ainda as que passam por divisões simétricas ou assimétricas, variam e estão sob regulação do organismo.

Os mecanismos gênicos que controlam esses diferentes destinos das células-tronco começam a ser parcialmente esclarecidos e acredita-se que poderão servir para sua manipulação terapêutica (SHERLEY, 2002 & LEE *et al.*, 2003). Por exemplo, dois genes que parecem ter um papel importante nessa regulação são o p53 e o IMPDH (inosina-monofosfato desidrogenase) e substâncias como hipoxantina, xantosina ou xantina promovem SACK (suppression of asymmetric cell kinetics, supressão da cinética celular assimétrica), fazendo com que as células-tronco dividam-se predominantemente de modo simétrico, originando apenas outras células-tronco. Essa estratégia permite ampliar consideravelmente a população de células-tronco adultas *in vitro*, sem diferenciação (“expansão”). Como esse é um efeito reversível, as células assim geradas poderiam ser empregadas em terapias com células-tronco adultas (PARÉ *et al.*, 2011).

4.4.CÉLULAS-TRONCO EMBRIONÁRIAS

Durante o desenvolvimento embrionário, a proliferação e a diferenciação celular criam um número crescente de células e tipos celulares. À medida que as células se comprometem com uma linhagem específica, há uma diminuição progressiva do seu potencial de diferenciação. No camundongo, cada uma das células do embrião na fase de duas células tem o potencial de contribuir para qualquer tipo celular do embrião ou dos tecidos extra-embrionários. Já no estágio de blastocisto, as células do trofotoderma estão irreversivelmente restritas a uma diferenciação de linhagens extra-embrionárias. Nesse estágio, somente as células da massa celular interna (MCI) ainda mantêm o potencial de contribuir para todos os tecidos do embrião (GILBERT, 2010).

Se as células da MCI do blastocisto de camundongo são retiradas do embrião e dissociadas, sob condições apropriadas podem permanecer indiferenciadas *in vitro*, multiplicando-se indefinidamente e mantendo o potencial de contribuir para todos os tipos celulares adultos (WOBUS & BOHELER, 2005). Essas células derivadas da MCI

satisfazem aos critérios de células-tronco – células com proliferação prolongada e auto-renovação, e com capacidade de diferenciação clonal em diferentes linhagens – e assim são chamadas de células-tronco embrionárias.

Linhagens de células-tronco embrionárias (CTE) têm como característica principal sua pluripotência, ou seja, quando reintroduzidas em um blastocisto, podem retomar o desenvolvimento normal colonizando diferentes tecidos do embrião, incluindo a linhagem germinativa (BRADLEY *et al.*, 1984). Outra demonstração *in vivo* da pluripotência das CTE deriva da injeção dessas células não diferenciadas em camundongos imunodeficientes SCID. Nestes animais, na presença de diversos estímulos *in vivo*, as CTE injetadas multiplicam-se e diferenciam-se de forma desorganizada, dando origem a teratomas, onde são encontrados tecidos derivados dos três folhetos embrionários (NUSSBAUM *et al.*, 2007).

Quando cultivadas em condições específicas, as CTE podem ser mantidas em seu estado indiferenciado por múltiplas divisões celulares (TISCORNIA & BELMONT, 2010). Por outro lado, estas células também podem ser induzidas a iniciar um programa de diferenciação *in vitro*, simulando o desenvolvimento de um embrião pré-implantado ou então seguindo um caminho específico de diferenciação em tipos celulares desejados (HWANG, 2007)

Essas propriedades das CTE levaram ao seu uso como instrumento de pesquisa e como fonte de tecidos para transplante.

Durante o desenvolvimento embrionário, o período entre a implantação e a gastrulação é marcado por intensa proliferação e migração celular, resultando na determinação e posicionamento do endoderma, ectoderma e mesoderma para que ocorra a organogênese. A execução coordenada destes processos depende de uma cascata gênica complexa no embrião, cuja hierarquia ainda é pouco conhecida e difícil de ser estudada *in vivo* devido também a limitações técnicas de se estudar o embrião nestes estágios. Um modelo experimental alternativo torna-se ainda mais necessário quando o objetivo é estudar o desenvolvimento embrionário do ser humano (GILBERT, 2010).

O estabelecimento de linhagens de CTE permitiu o desenvolvimento de estratégias alternativas para este tipo de estudos. Enquanto cultivadas sobre uma camada de fibroblastos fetais e na presença de LIF (leucemia inhibitory fator), estas células se

mantém indiferenciadas. Porém, a remoção dos fibroblastos fetais e de LIF e seu cultivo em suspensão podem induzi-las a entrar em um programa de diferenciação *in vitro* de forma sincronizada (KAWAHARA *et al.*, 2009). Nestas condições, as CTE formam espontaneamente agregados de células diferenciadas chamados “corpos embrióides” (EB=embryoid bodies), simulando o desenvolvimento de um embrião pré-implantado. Nos primeiros dois a quatro dias de cultura em suspensão, observa-se a formação de endoderma na superfície dos agregados de CTE. Após mais alguns dias em cultura, forma-se uma cavidade cística, células do endoderma e ectoderma aparecem, e a seguir, uma série de linhagens embrionárias se desenvolve, incluindo linhagens hematopoiética, neuronal, endotelial, cardíaca e muscular (BAUTCH *et al.*, 1996; FRAICHARD *et al.*, 1995; LING e NEBEN, 1997). Assim, a diferenciação de CTE em cultura em suspensão representa um modelo *in vitro* poderoso para o estudo da determinação das linhagens embrionárias durante o desenvolvimento mamífero.

Se após dois a quatro dias em cultura os EB forem cultivados na presença de diferentes fatores, a diferenciação pode ser dirigida para seguir uma programação tecido-específica. Assim, as CTE também são um modelo experimental para o estudo de determinação e diferenciação celular. Além disso, outros processos que acontecem no início do desenvolvimento embrionário, como a iniciação da inativação do cromossomo X e os efeitos de substâncias tóxicas e biologicamente ativas no desenvolvimento embrionário (HEARD *et al.*, 1999; KELLER, 1995; SCHOLZ *et al.*, 1999) também podem ser estudados nestas células.

Finalmente, nas CTE também podemos estudar os mecanismos moleculares subjacentes à sua pluripotência. Neste sentido, um trabalho recente demonstrou a importância da expressão do gene Oct-4, expresso somente em células pluripotentes do embrião mamífero e em CTE (HOCHEDLINGER *et al.*, 2005). Quando sua expressão foi induzida em células adultas, este gene conferiu uma capacidade maior de proliferação e diferenciação àquelas células. Este trabalho ilustrou como as pesquisas com CT embrionárias podem elucidar vias envolvidas na pluripotência de células-tronco, o que por sua vez pode no futuro servir de base para modificarmos células-tronco adultas de forma a aumentar sua capacidade de diferenciação e proliferação.

4.5.PRODUÇÃO DE EMBRIÕES IN VITRO

A produção *in vitro* de embriões (PIV) é uma biotécnica de reprodução assistida e uma ferramenta para pesquisa de eventos relacionados à maturação e fecundação de oócitos, capacitação espermática e desenvolvimento embrionário na fase de pré-implantação. Além disso, a PIV é um instrumento de suporte para outras biotécnicas como clonagem, transgênese e transferência nuclear. Sua aplicação em escala comercial se tornou viável após o advento da aspiração folicular *in vivo* e pelo aprimoramento das condições de cultivo *in vitro*. Os embriões que conseguem se desenvolver *in vitro* apresentam qualidade inferior àqueles produzidos *in vivo* (THOMPSON, 2000). Diversos parâmetros são utilizados para avaliar a qualidade dos embriões PIV como morfologia, criotolerância, transcrição (mRNA), eclosão *in vitro* e prenhez após a transferência. O aumento da eficiência da PIV está condicionado ao desenvolvimento de trabalhos que visem aperfeiçoar e simplificar as condições de cultivo durante as várias etapas do processo, principalmente no que se refere à maturação citoplasmática e molecular de oócitos (GONÇALVES *et al.*, 2008), melhorar a eficiência espermática (VILLAMIL *et al.*, 2012) e utilizar elementos para suplementar o meio de cultivo *in vitro* (MINGOTI *et al.*, 2011).

A produção *in vitro* de embriões de bovinos, em geral, é empregada para fins comerciais e a investigação, mas todas as etapas da PIV ainda são ineficientes quando comparada a produção *in vivo* (GUTIÉRREZ-ADÁN *et al.*, 2001). Em vários estudos que envolvam a produção de embriões bovinos, melhores resultados foram obtidos quando foram utilizadas macromoléculas indefinidas ou semi-definidas de origem animal (CAROLAN *et al.*, 1995). Os suplementos mais comuns são albumina de soro bovino (BSA) e soro fetal bovino (SFB). Estes compostos são partículas colóides que fornecem o meio com fatores de crescimento, hormônios, aminoácidos, e proteínas, que são benéficas ao desenvolvimento embrionário (WEBSTER, 1982; ZUELKE & BRACKETT, 1990).

No entanto, as desvantagens destas macromoléculas são alta variação entre lotes (MCKIERNAN & BAVISTER, 1992) e o risco de transmissão da doença (KRISHER *et al.*, 1999), que prejudica o estudo apurado dos embriões. Buscando a padronização dos procedimentos de PIV e segurança sanitária dos embriões produzidos, muitas moléculas sintéticas foram utilizadas em substituição a BSA e SFB durante o cultivo *in vitro* (PINYOPUMMINTR e BAVISTER, 1991; FUKUI *et al.*, 2000), mas sem muito sucesso.

O cultivo embrionário *in vitro* varia de 7-9 dias a 38,5°C, atmosfera controlada (5% de O₂, 5% de CO₂ e 90% de N₂) e umidade saturada. A taxa de blastocisto geralmente é avaliada no 7º dia após a fecundação sendo que, os blastocistos podem permanecer na estufa até o 9º dia para avaliar a taxa de eclosão *in vitro*.

A otimização da técnica de PIV visando à produção de embriões de boa qualidade e em número cada vez mais expressivo resulta na diminuição do custo por embrião produzido e possibilita uma maior difusão da técnica entre os pesquisadores. Faz-se necessário o desenvolvimento de um sistema de maturação e cultivo *in vitro* adequados, que permita uma maior capacitação dos oócitos e, conseqüentemente uma maior taxa de desenvolvimento embrionário e qualidade dos embriões (BRUM *et al.* 2006). Ainda, tais melhorias seriam de grande valia para o aprimoramento de outras biotécnicas que dependam da PIV, como extração da MCI e cultivo das células-tronco embrionárias.

4.6.CULTIVO DAS CÉLULAS-TRONCO EMBRIONÁRIAS

De maneira geral, no cultivo celular se utiliza células oriundas de organismo vivo (animais ou vegetais). Baseia-se na capacidade de as células multiplicarem-se numa placa de cultura de tecidos em condições adequadas, mantendo suas características próprias. A cultura de tecidos implica numa prévia desagregação mecânica ou enzimática do tecido original e o cultivo de tais células é feito em uma camada aderente, em um substrato sólido ou cultura em suspensão. O cultivo de células deve ser feito em condições ótimas de temperatura e pH, conforme o tipo de células em estudo (FRESHNEY, 2010).

A nutrição com meios suplementados com aminoácidos e carboidratos deve ser fornecida para que as células se mantenham vivas e se comportem como se estivessem no organismo vivo. Desde os primeiros experimentos com células em cultivo, ficaram evidentes as significativas transformações ocorridas quando as células foram mantidas fora do organismo de origem. Inicia-se um processo de degeneração e posteriormente a morte, ou tornam-se células cancerígenas que se proliferam intensamente. Em determinadas circunstâncias podem passar por diferenciação celular, transformando-se em células com função mais especializadas (ALBERTS *et al.*, 2009).

Culturas preparadas diretamente de tecidos de um organismo, com ou sem um passo inicial de fracionamento das células, são chamadas culturas primárias. Na maioria dos casos, células em culturas primárias podem ser retiradas da placa de cultura e usadas para formar um número razoável de culturas secundárias; elas podem ser repetidamente subcultivadas desta forma, por semanas ou meses. Tais células apresentam muitas propriedades diferenciadas apropriadas a sua origem: fibroblastos continuam a secretar colágeno; células derivadas de músculo esquelético embrionário fusionam-se para formar fibras musculares gigantes, que contraem espontaneamente na placa de cultura; células nervosas lançam axônios que são eletricamente excitáveis e fazem sinapse com outra célula nervosa; e células epiteliais formam extensivas lâminas com muitas das propriedades de um epitélio intacto. Como tais fenômenos ocorrem em cultura, eles são acessíveis para estudar eventos que não são possíveis de serem estudados em tecidos intactos (MANI *et al.*, 2008).

Até o início dos anos 70, a maioria dos meios utilizados para a cultura de células também incluía uma mistura pobremente definida de macromoléculas, na forma de soro de cavalo ou soro fetal de bezerro ou um extrato cru preparado de embriões de pinto (ALBERTS *et al.*, 2010). Tais meios são ainda hoje utilizados para a maioria dos cultivos rotineiros de células, mas eles dificultam o conhecimento de quais macromoléculas específicas são necessárias para cada tipo de célula se desenvolver e manter sua fisiologia normal.

Esta dificuldade levou ao desenvolvimento de vários meios sem soro, meios quimicamente definidos. Além das pequenas moléculas usuais, tais meios definidos contêm uma ou mais proteínas específicas que a maioria das células necessitam para sobreviver e proliferar em cultura. Estas incluem fatores de crescimento, que estimulam a proliferação celular, e transferina, que transporta ferro para dentro das células. (FRESHNEY, 2010). Muitas das moléculas sinalizadoras protéicas extracelulares, essenciais para a sobrevivência, desenvolvimento, e proliferação de tipos específicos de células têm sido muito facilitada pela disponibilidade de meios quimicamente definidos, sem soro.

A principal função do soro nas culturas celulares é fornecer fatores hormonais que estimulem o crescimento celular e suas funções, fatores de adesão e expansão e transporte de proteínas carregadoras de hormônios, minerais, lipídeos etc. O papel mais

importante do soro está na promoção de adesão e expansão de uma linhagem através de fatores como o colágeno, fibronectina, dentre outros (BASTOS *et al.*, 2007).

A maioria das células de vertebrados morrem após um número finito de divisões em cultura. Células da pele humana, por exemplo, duram por vários meses em cultura, dividindo-se apenas 50 a 100 vezes antes de morrerem (HWANG *et al.*, 2007). Tem sido sugerido que este limite de tempo de vida está relacionado com o limite de tempo de vida do animal do qual a célula se derivou. Entretanto, ocasionalmente, algumas células em cultura sofrerão uma mudança genética que as tornem efetivamente imortais. Tais células se proliferarão indefinidamente e poderão ser propagadas como uma linhagem de células.

Ao conseguir uma quantidade adequada da linhagem de células, essas podem ser estocadas em nitrogênio líquido a -196°C , por um período indefinido e continuarem viáveis, quando descongeladas. No entanto, é importante lembrar que as células quase sempre diferem de seus progenitores nos tecidos dos quais elas são originárias.

As células tronco embrionárias foram isoladas pela primeira vez, a partir de embriões de camundongo, a mais de 20 anos atrás (EVANS e KAUFMAN, 1981; MARTIN, 1981). Hoje em dia, estas células representam enorme potencial como fonte provedora, *in vitro*, dos mais variados tipos celulares para a realização de terapia celular, teste de novas drogas e estudo de sua toxicidade, bioengenharia genética e compreensão completa do processo de embriogênese. Em animais de produção (suínos, bovinos, caprinos, ovinos e eqüinos) o estabelecimento de linhagens de CTE possibilitaria, ainda, a criação de animais transgênicos a serem utilizados como modelo para o estudo de doenças humanas bem como em testes farmacológicos (MUÑOZ *et al.*, 2008b).

No entanto, apesar de compartilharem similaridades quanto à morfologia e alguns marcadores de superfície celular e de expressão gênica, as CTE possuem características únicas em cada espécie.

Apesar de inúmeros esforços estarem sendo realizados por diversos grupos de pesquisa, no sentido de isolar e manter CTE de animais domésticos, linhagens validadas ainda não foram obtidas (KEEFER *et al.*, 2007; MUÑOZ *et al.*, 2008b). Como agravante, a propagação continuada de linhas de CTE inapropriadamente caracterizadas

pode induzir os pesquisadores ao erro e, dessa forma prejudicar a descoberta de condições de cultivo mais adequadas ao cultivo de verdadeiras CTE.

4.7.CULTIVO DE FIBROBLASTOS DE PELE

O método padrão utilizado para expandir células-tronco embrionárias consiste na utilização da co-cultura de fibroblastos embrionários irradiados ou mitoticamente inativados (EVANS e KAUFMAN, 1981; BRYJA *et al.*, 2006). As células-tronco embrionárias crescem sob a monocamada de fibroblastos, na forma de colônias, que posteriormente são subcultivadas. Para o subcultivo são isoladas enzimaticamente com tripsina para obter células individuais, por dissociação mecânica ou ainda imunocirurgia, em que há a separação da MCI do trofectoderma (HWANG *et al.*, 2004). Nos três métodos as células são plaqueadas sobre outra monocamada de fibroblastos.

Os fibroblastos que constituirão a monocamada de sustentação das células-tronco embrionárias são obtidos a partir da técnica do explante. O tecido pode ser extraído da pele asséptica de camundongos, bovinos ou equinos, no laboratório o pedaço da pele é picado com lâmina cirúrgica e os fragmentos de aproximadamente 1mm³ são colocados em garrafas de cultivo de 25 cm³ contendo meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino, 0,5 µL/mL de gentamicina e 0,2 µL/mL de fungizona. As garrafas já com os fragmentos são mantidas em estufas, com atmosfera úmida a 37°C e com 5% de CO₂.

Quando as células atingem confluência de 80%, os fibroblastos são destacados das garrafas com solução de tripsina 0,05%, seguida de inativação com o meio de cultura. As células destacadas e inativadas são centrifugadas por 3 minutos a 30000 rpm e o pellet formado é ressuspenso em novo meio de cultura. Os fibroblastos utilizados para formarem a monocamada devem ser de primeira à quarta passagem (GARFIELD, 2010).

Como mencionado previamente, o protocolo padrão para expansão das células-tronco embrionárias consiste na utilização da co-cultura de fibroblastos de camundongo (MEF). Tal monocamada é necessária porque os fibroblastos fornecem o fator inibidor de leucemia (LIF), que é crítico para promover a auto-renovação e impedir a diferenciação das células-tronco embrionárias.

O LIF é uma glicoproteína solúvel da família de citocinas IL-6, que exerce sua função ao se ligar ao receptor LIFR e a proteína gp130, formando um heterodímero e induzindo a ativação de JAK (proteína tirosina quinase da família Janus quinase), a qual ativa a proteína STAT3 (Sinal transdução e ativador transcricional) permitindo assim a manutenção das células-tronco embrionárias no estado indiferenciado (BOEUF *et al.*, 1997; NIWA *et al.*, 1998). Em adição, o heterodímero LIFR-gp130 também induz a associação de SHP-2 (tirosina fosfatase) e da proteína adaptadora Gab1 com ativação de ERK (proteína regulada por sinais extracelulares), levando a diferenciação das células-tronco embrionárias (KAWAHARA *et al.*, 2009). Desta forma, o equilíbrio entre a ativação de STAT3 e a inibição de ERK por P13K (fosfoinosítideo quinase) permite que as células-tronco embrionárias continuem proliferando em cultura sem apresentar diferenciação (TISCORNIA & BELMONT, 2010).

De acordo com a literatura a adição de LIF ao meio de cultura pode manter as células-tronco embrionárias de camundongo em um estado não diferenciado, o que permite a não utilização de monocamada de MEF. Porém, essa citocina não é suficiente para manter a pluripotência de células-tronco embrionárias humanas (CTEH) cultivadas na ausência de MEF (HOFFMAN & CARPENTER *et al.*, 2005). A razão para isso não é bem clara, mas alguns pesquisadores atribuem esse fato a uma baixa ativação da via STAT3 em células humanas (SATO *et al.*, 2004). Outros sugerem que possa ser devido à ausência ou ao baixo nível de expressão dos componentes da via de ativação por LIF (RICHARDS *et al.*, 2004).

O uso de monocamada de MEF para a manutenção e proliferação das células CTEH não é desejável, pois compromete a aplicação clínica dessas células, uma vez que pode ocorrer a transmissão de patógenos animais (ULLOA-MONTOYA *et al.*, 2005). Vários estudos têm como objetivo eliminar o uso da monocamada de MEF substituindo-a por uma monocamada de células humanas obtidas a partir de fibroblastos embrionários (LEE *et al.*, 2004) ou monocamada de células uterinas endometriais adultas (LEE *et al.*, 2005), entre outras. A utilização de células humanas como suporte elimina a possibilidade de transferência de patógenos murinos para homem, mas não a possibilidade de transferir patógenos humanos para humanos.

É cada vez mais crescente a necessidade de expandir as células-tronco embrionárias na ausência de uma monocamada celular. Vários estudos têm utilizado

Matrigel ou laminina na presença de meio condicionado em MEF contendo o fator de crescimento bFGF (fator de crescimento fibroblástico básico) como sistema de cultura (XU *et al.*, 2001). Embora esse sistema elimine o contato direto de CTEH com os fibroblastos, ele não elimina a possibilidade de contaminação por patógenos animais que podem ser introduzidos na cultura através do meio condicionado em fibroblastos.

Pesquisadores também têm utilizado biorreatores para expandir e/ou diferenciar células-tronco embrionárias em grande escala (FOK & ZANDSTRA, 2005; ABRANCHES *et al.*, 2007). A expansão de células-tronco embrionárias de camundongo (CTEC) indiferenciadas pode ser realizada em um biorreator, uma vez que, a monocamada celular e o meio condicionado não são necessários na presença de LIF. Em estudos recentes utilizando biorreator com agitação as CTEC foram cultivadas em suspensão formando agregados ou em microcarreadores, sendo que, após expansão, essas células expressavam marcadores de indiferenciação e a habilidade para formar corpos embriões (ABRANCHES *et al.*, 2007). Mas, a expansão de células CTEH no estado indiferenciado através de um biorreator se torna mais difícil, porque tais células necessitam de monocamada celular ou meio condicionado, mesmo na presença de LIF. Recentemente, Fernandes *et al.* (2009) utilizaram um biorreator com agitação para expandir CTEH na presença de meio condicionado em MEF e microcarreadores baseados em dextrana cobertos com colágeno, obtendo uma grande concentração de células no estado indiferenciado. Porém, como já mencionado a presença de meio condicionado em MEF inviabiliza a utilização das células CTEH em aplicações terapêuticas.

Recentemente, um método novo foi utilizado para expandir células tronco mesenquimais na ausência de MEF e meio condicionado em MEF. O método consiste em adicionar nanopartículas magnéticas a um meio de cultura enriquecido com soro fetal e LIF. Nesse meio as células se ligam às nanopartículas e aderem à superfície do frasco ou placa de cultura, devido à aplicação de um campo magnético externo, podendo desta forma expandir-se sem o risco de contaminação por patógenos e manter-se em um estado indiferenciado (ITO *et al.*, 2004a).

4.8. CARACTERIZAÇÃO DA PLURIPOTÊNCIA DAS CÉLULAS-TRONCO EMBRIONÁRIAS

As CTE indiferenciadas são caracterizadas por apresentarem as seguintes propriedades: (i) a capacidade de se auto-renovar indefinidamente, (ii) a capacidade para diferenciar em células somáticas, (iii) alta atividade de fosfatase alcalina, (iv) expressão de antígenos embrionários estágio-específicos como o SSEA-1, (v) expressão do fator de transcrição de linhagem germinativa Oct-4, (vi) grande núcleo em relação ao raio citoplasmático, (vii) alta atividade de telomerase e (viii) regulação da auto-renovação por citocinas da família de IL-6 (interleucina-6) (WOBUS, 2001; NIWA *et al.*, 1998; VASSILIEVA *et al.*, 2000). Assim, as pesquisas são direcionadas para a identificação e caracterização desses fatores que regulam a auto-renovação e diferenciação das CTE.

A pluripotência para CTEC pode ser caracterizada pela expressão de certos marcadores, como antígenos de superfície (SOLTER & KNOWLES, 1978), receptores de membrana (NIWA *et al.*, 1998), atividade enzimática como a fosfatase alcalina (WOBUS *et al.*, 1984) e telomerase (PRELLE *et al.*, 1999) e fatores de transcrição, como o Oct-4 (SCHOLER *et al.*, 1989).

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

Os marcadores para células tronco embrionárias humanas também apresentam algumas características fundamentais da linhagem murina, tais como a expressão de Oct-4 e atividade de telomerase (THOMSON *et al.*, 1998). Ao contrário das células CTEC, as CTEH apresentam como marcadores as proteoglicanas TRA-1-60, TRA-1-81, GCTM-2 e os antígenos embrionários estágio-específicos SSEA-3, SSEA-4, os quais estão ausentes em células CTEC. A identificação desses marcadores, tanto para CTEC

quanto para CTEH, tem sido importante para monitorar e quantificar a pluripotência de CTE submetidas a diferentes condições de cultura (ITSKOVITZ-ELDOR *et al.*, 2000; REUBINOFF *et al.*, 2000).

A manutenção *in vitro* das CTE no estado indiferenciado pode ser monitorada através de sua morfologia típica. Essas células apresentam uma alta razão núcleo/citoplasma e proeminente nucléolo, formando colônias compactas com bordas bem delineadas. As colônias formadas pelas células CTEH são achatadas enquanto que as colônias de células CTEC são esféricas (THOMSON *et al.*, 1998; AMIT & ITSKOVITZ-ELDOR, 2002).

Após o isolamento de CTE de camundongo (EVANS & KAUFMAN, 1981; MARTIN, 1981) e humana (THOMSON *et al.*, 1998; REUBINOFF *et al.*, 2000), as tentativas foram feitas para estabelecer linhagens celulares de rato (IANNACCONE *et al.*, 1994), coelho (GRAVES & MOREADITH, 1993), hamster (DOETSCHMAN *et al.*, 1981) e macaco Rhesus (THOMSON *et al.*, 1995). Entre os animais de exploração econômica, células semelhantes à CTE foram estabelecidas em ovinos (NOTARIANNI *et al.*, 1991), suínos (WHEELER, 1994), cavalo (SAITO *et al.*, 2002) e bovinos (STRELCHENKO, 1996). Recentemente, CTE de búfalos foram estabelecidas por Verma *et al.* & Sritanaudomchai *et al.* (2007), Huang *et al.* (2010). No entanto, a eficiência da criação de linhagens de CTE de outras espécies é mais baixa quando comparadas às linhagens de CTE de camundongos e ratos. (EVANS *et al.*, 1990; NOTARIANNI *et al.*, 1991). Portanto, uma compreensão completa dos fatores que controlam o isolamento e sua manutenção em longo prazo na cultura é fundamental.

OBJETIVOS

5.OBJETIVOS

5.1. Comparar o potencial gerador de CTE de embriões bovinos produzidos in vitro em meio contendo alta (10%) e baixa (2,5%) concentração de soro.

5.2. Avaliar a ação da LIF e do bFGF na manutenção da pluripotência de CTEbov em cultivo.

5.3. Identificar a expressão in situ dos fatores de indiferenciação Oct-4, Nanog, SSEA-1, SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60 e TRA-1-81 em blastocistos bovinos com 9 dias de idade e em células tronco embrionárias em cultivo através de marcação imunocitoquímica.

CAPÍTULO 1

ESTE TRABALHO DEU ORIGEM A ESTE ARTIGO QUE FOI ESCRITO CONFORME OS MOLDES DA REVISTA: **REPRODUCTION, FERTILITY AND DEVELOPMENT**, EXCETO PELA LÍNGUA.

CAPÍTULO 1

Título: Influência do meio de cultivo e da idade dos blastocistos bovinos no estabelecimento de colônias de células-tronco embrionárias.

Resumo: *Introdução:* As células-tronco são células indiferenciadas e podem ser definidas por suas propriedades de auto-renovação e potencial de diferenciação. De acordo com seu potencial de diferenciação as células-tronco podem ser classificadas em totipotentes, multipotentes e pluripotentes. As pluripotentes têm a capacidade de gerar células dos três folhetos embrionários (ectoderma, mesoderma e endoderma). O maior exemplo de células-tronco pluripotentes são as células da massa celular interna (MCI) do blastocisto, as chamadas células-tronco embrionárias (CTE). Diversos estudos têm sido realizados visando descobrir qual a melhor fase de desenvolvimento dos blastocistos bovinos para o estabelecimento das CTEbov. *Objetivos:* Dessa forma, os objetivos deste trabalho foi estudar as diferentes idades dos blastocistos bovinos no estabelecimento das colônias de CTEbov, comparar o potencial gerador de CTE em meio contendo alta (10%) e baixa (2,5%) concentração de soro, assim como avaliar a ação da LIF e do bFGF na manutenção da pluripotência de CTEbov em cultivo. *Material e métodos:* Para tanto, foram utilizados blastocistos bovinos (PIV) cultivados em meio básico com adição de 2,5% (grupo 1) e 10% de SFB (grupo 2), as MCIs dos blastocistos iniciais, blastocistos expandidos e blastocistos eclodidos foram removidas mecanicamente com auxílio de duas agulhas de insulina. As células das MCIs foram colocadas em placas de 6 poços contendo meio específico para CTE, subdivididas em grupos: G1(meio+LIF), G2 (meio+bFGF) e G3 (meio+LIF+bFGF) sob monocamada de fibroblastos bovinos mitoticamente inativados (20×10^4 cels/ 1.9cm^2 por poço). *Resultados:* Observou-se que as únicas MCI que aderiram adequadamente à monocamada foram as obtidas de blastocistos e blastocistos expandidos (n = 160) independente da concentração de soro utilizada durante o cultivo. Essa aderência se iniciou cerca de 2 dias após o plaqueamento. Nenhuma das MCI obtidas de blastocistos iniciais (n = 300) aderiu e cresceu em cultivo. Por outro lado, as MCI obtidas de blastocistos eclodidos (n = 45) apresentaram uma tendência a se descolar e formar

corpos embriões císticos. A produção de embriões com meio de cultivo de 2,5% e 10% de SFB foi proporcionalmente igual, não interferindo na qualidade dos embriões nem no cultivo das CTE. A LIF foi fundamental para o estabelecimento das colônias, o bFGF não foi fator significativo no cultivo das CTE. Conclusão: Os blastocistos expandidos são mais viáveis para o cultivo e estabelecimento de células-tronco semelhantes às células-tronco embrionárias bovinas e a adição de LIF é fundamental para manutenção das células em cultivo.

Abstract: *Introduction:* Stem cells are undifferentiated cells and can be defined by their properties of self-renewal and differentiation potential. According to their differentiation potential of stem cells can be classified as totipotent, pluripotent and multipotent. The pluripotent cells have the capacity to generate cells of three germ layers (ectoderm, mesoderm and endoderm). The greatest example of pluripotent stem cells are the cells of the inner cell mass (ICM) of blastocyst, called embryonic stem cells (ESC). Several studies have been conducted to find out what the best stage of development of bovine blastocysts for the establishment of ESCbov. *Objectives:* Thus, the objectives of this study was the different ages of bovine blastocysts in the establishment of colonies ESCbov, compare the potential generator of ESC in medium containing high (10%) and low (2.5%) serum concentration, and assess the action of bFGF and LIF in maintaining pluripotency of ESCbov in cultivation. *Materials and Methods:* For this, we used bovine blastocysts (IVP) cultured in basal medium with addition of 2.5% (group 1) and 10% FCS (group 2), the ICM of early blastocysts, expanded blastocysts and hatched blastocysts were mechanically removed by using two needles for insulin. The ICM cells were plated in six wells containing medium specific for ESC, subdivided into groups: G1 (medium + LIF), G2 (medium + bFGF) and G3 (medium + bFGF + LIF) bovine fibroblasts in monolayer of mitotically inactivated (20×10^4 cels/ 1.9cm^2 per well). *Results:* It was observed that the only ICM properly joined to the monolayer were obtained blastocyst and expanded blastocyst ($n = 160$) independent of the concentration of serum used during cultivation. This adherence began about two days after plating. None of the ICM obtained from early blastocysts ($n = 300$) joined and raised in cultivation. Moreover, the ICM of hatched blastocysts obtained ($n = 45$) showed a tendency to peel and form cystic embryoid bodies. The production of embryo culture medium of 2.5% and 10% FCS was proportionally equal,

not interfering with the quality of embryos or cultivating ESC. The LIF was instrumental in the establishment of colonies, the bFGF was not a significant factor in the cultivation of ESC. Conclusion: The expanded blastocysts are more viable for cultivation and establishment of stem cells similar to embryonic stem cells bovine and the addition of LIF is important for maintaining cells in culture.

INTRODUÇÃO

As células-tronco embrionárias são derivadas da massa celular interna de embriões, e podem se diferenciar nos tecidos das três camadas germinativas, tanto in vivo, quanto in vitro apresentando assim alta plasticidade. Podem ainda ser expandidas quase que infinitamente em laboratório, e preservar seu cariótipo estável.

Ainda é controversa a idade ideal dos embriões bovinos para o isolamento da massa celular interna bem como o meio de cultivo apropriado para produção de embriões de alta qualidade visando um bom cultivo de células-tronco embrionárias.

O soro fetal bovino (SFB) e soro albumina bovina (BSA) são as fontes de proteína mais usado para a cultura in vitro (CIV) de embriões bovinos. Algumas formulações de meios de CIV in vitro substituem BSA ou SFB por soro sintético ou uma macromolécula sem atividade biológica, o que permitiria uma composição definida para o meio (LEIVAS *et al.*, 2011), entretanto, ocorre uma queda substancial nos índices de produção embrionária. Outros estudos incorporaram BSA associado com SFB em vários períodos da CIV (DUQUE *et al.*, 2003).

A suplementação de soro durante a produção in vitro (PIV) de embriões de bovinos pode aumentar a produção de blastocisto (LEIVAS *et al.*, 2011), porém alguns estudos apontam seu efeito negativo sobre a qualidade do embrião (RIZOS *et al.*, 2003). Vale ressaltar que o SFB teve uma ação discreta em estágios iniciais de desenvolvimento embrionário, sendo importante durante a fase de compactação e formação do blastocisto. A adição de soro tem sido relatada como essencial para obter produção satisfatória de embrião, mas concentrações reduzidas de soro durante algumas etapas do PIV são necessárias para manter a qualidade do embrião.

Um pré-requisito para a pluripotencialidade das células-tronco embrionárias *in vitro*, é a capacidade de mantê-las em estado indiferenciado em cultura, o que é bastante complicado, já que a tendência destas células é sofrer diferenciação celular. A técnica de co-cultura das células tronco embrionárias com fibroblastos inativados é bastante empregada para este fim. A adicionalmente, realiza-se a cultura em presença de LIF (fator inibidor de leucemia) (WILLIANS *et al.*, 1988; SMITH *et al.*, 1988), sendo esta citocina capaz de manter as células indiferenciadas mesmo na ausência de co-cultura com fibroblastos. O efeito do LIF consiste em ativar o fator STAT 3 indispensável para a continuação da multiplicação de células indiferenciadas (NIWA *et al.*, 1998, NIWA *et al.*, 2000).

É comum também utilizar-se em meios específicos para cultivo de células-tronco embrionárias humanas contendo bFGF ou FGF-2 (fator de crescimento fibroblástico) visando manter também a indiferenciação celular (AMIT *et al.*, 2004). Tem sido demonstrado que o bFGF induz a expressão da Gremlina,, uma proteína que atua como antagonista de BMPs capazes de induzir a diferenciação celular (LIU *et al.*, 2006).

OBJETIVOS

Comparar o potencial gerador de CTE de embriões bovinos produzidos *in vitro* com diferentes idades, cultivados em meio contendo alta (10%) e baixa (2,5%) concentração de soro, assim como avaliar a ação da LIF e do bFGF na manutenção da pluripotência de CTEbov em cultivo.

MATERIAIS E MÉTODOS

1. Produção de embriões *in vitro*

1.1. Colheita e Maturação dos oócitos

Os oócitos foram obtidos a partir de ovários de abatedouro. Os ovários foram lavados e transportados em solução salina (NaCl) a 0,9%, aquecida a 36°C e acrescida de penicilina e estreptomicina.

A colheita dos oócitos foi realizada através da aspiração de folículos com diâmetro entre 2 e 8 mm. Os oócitos que apresentaram aspecto homogêneo do citoplasma e compactação das células do cumulus, com duas a três camadas de células de revestimento foram selecionados.

Os oócitos selecionados foram maturados em estufa a 38,5 °C, com 5% de CO₂ em ar por 22 a 24 h em gotas de 90uL (25 oócitos). Foi utilizado o meio TCM 199 com sais de Earle e L-glutamina suplementado com 10% SFB, 0,2 mM piruvato de sódio, 50 µg/mL hCG, 5µg/mL FSH e 100 mg/mL de estreptomicina e 100 UI/mL de penicilina.

1.2.Fertilização in vitro (FIV)

Após a maturação, oócitos foram submetidos à FIV. O sêmen foi preparado por centrifugação em gradiente de Percoll de 45 e 90%. A concentração foi ajustada para 2x10⁶ espermatozoides/mL. A fertilização ocorreu em meio HTF (Irvine Scientific) acrescido de 6mg/mL de BSA, 0,2mM de piruvato, 30ug/mL de heparina, 18uM de penicilamina, 10uM de hipotaurina, e 1,8uM de epinefrina, 100 mg/mL de estreptomicina e 100 UI/mL de penicilina. Oócitos e espermatozoides foram incubados em gotas de 90uL (25 oócitos) em estufa a 5% CO₂ em ar por aproximadamente 18 h.

1.3.Cultivo in vitro

Decorridas as 18 h de FIV, os possíveis zigotos foram desnudados e cultivados em meio SOFaa com 2,7mM de mio-inositol, 0,2 mM de piruvato, 5mg/mL de BSA, 100 mg/mL de estreptomicina e 100 UI/mL de penicilina (meio base – MB). Ao MB foi acrescido 2,5% de SFB no grupo 1 e 10% de SFB no grupo 2.

Todos os embriões foram cultivados em gotas de 90uL (20 oócitos/gota) em cobertos com óleo mineral em estufa com 5% de CO₂, 5% O₂ e 90% N₂. Após 72 horas a clivagem foi avaliada, as estruturas que não estavam clivadas foram descartadas. Os embriões foram transferidos para outras gotas de 90uL contendo MB idêntico ao meio de cultivo. Cinco dias após a fertilização, 80 uL do meio de cultivo foi retirado e substituído por meio recém preparado. Sete dias após a FIV a formação de blastocistos

foi avaliada. Os embriões foram utilizados para análise por imunocitoquímica ou tiveram sua massa celular interna individualizada para cultivo das CTE.

2. Isolamento das células tronco embrionárias

2.1. Preparo das células de sustentação (Monocamada):

Foram coletadas amostras com aproximadamente 1mm³ de tecido epitelial de fetos bovinos, as quais foram lavadas em solução fisiológica por duas vezes, e colocadas em frasco de transporte contendo meio de Eagle modificado por Dulbecco's (DMEM, Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA) em temperatura ambiente.

As amostras foram processadas em placas de Petri (de 60mm de diâmetro) contendo meio de cultivo. O tecido foi fragmentado em pedaços diminutos (média de 0,1 mm² 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 por solução de tripsina a 0,25% em PBSA e 1% de EDTA para obter a individualização celular.

Foi utilizado o meio de cultivo DMEM. Os fragmentos foram semeados distribuindo a suspensão celular em quatro frascos de cultivo de 25cm² e incubados durante meia hora em estufa a 37°C em atmosfera úmida contendo 95% de ar e 5%CO₂, para favorecer sua adesão à superfície. Após esse tempo foi adicionado cerca de 3 ml de meio fresco em cada frasco, contendo 10% de soro fetal bovino e 1% de solução antibiótica-antimicótica.

Os frascos foram devidamente identificados, datados e levados à estufa de cultivo com as tampas semi-abertas.

A monitoração do crescimento celular e de sua evolução foi feita a cada 24 horas utilizando-se microscópio de observação direta, para detecção precoce de qualquer anomalia. Após 7 dias foi realizada a primeira troca de meio de cultivo. Uma vez que se iniciou o crescimento celular ao redor dos explants, o meio de cultivo foi renovado a cada 3 dias. Quando 70% do fundo do frasco de cultura estava coberto por células (subconfluência), essa cultura primária foi sub-cultivada.

Para tanto, as garrafas confluentes passaram por tripsinização: depois de retirado todo meio de cultivo das garrafas, estas foram lavadas com solução de PBS, e adicionadas de 2 ml de Tripsina Vernese (Instituto Adolfo Lutz, 0,2% Tripsina e 0,02% Versene) à 36°C. As garrafas foram mantidas em estufa a 38,5° C por no máximo 10 minutos, ou até que todas as células se soltassem do fundo.

Foi realizada então, a neutralização com meio DMEM acrescido de 20% de SFB e Penicilina/Estreptomicina, na proporção de 3:1 (3ml de meio para 1ml de tripsina). Uma amostra de 50 µl desta mistura células + meio foi retirada e adicionada a 50 µl do corante Tripán Blue, onde as células azuis, que permitem a passagem do corante, estavam mortas e, as células translúcidas, que não permitem passagem do corante, estavam vivas. A mistura foi então, destinada ao preenchimento da Câmara de Neubauer para contagem das células translúcidas dos 4 quadrantes mais externos. Após isso, as células que descolaram das garrafas foram centrifugadas com meio DMEM e ressuspendidas em placas de cultura de poliestireno com 6 poços em uma concentração de 1×10^5 células por poço.

Para o bloqueio do crescimento celular, os poços contendo células em confluência (20×10^4 cels/ 1.9cm^2 por poço) tiveram seu meio substituído por 4,0 ml de solução contendo mitomicina C ($10 \mu\text{g/ml}$), previamente preparada. Tal meio foi incubado por 24 horas. Em seguida, o meio foi retirado, os poços foram lavados por duas vezes com PBS e então, foi colocado meio específico para células-tronco embrionárias.

2.2. Isolamento das células tronco embrionárias

Foram utilizados os blastocistos produzidos in vitro e cultivados até o 7º, 8º e 9º dia de desenvolvimento. As MCI foram isoladas de Blastocistos iniciais, Blastocistos expandidos e Blastocistos eclodidos

Para facilitar a remoção das respectivas zonas pelúcidas bem como o isolamento das massa celulares internas, uma cunha foi feita no fundo da placa pela pressão da lâmina de bisturi contra o fundo plástico da mesma. Esta cunha serviu como apoio para rompimento da zona pelúcida e remoção do trofoblasto. As MCIs foram isoladas por microcirurgia, com auxílio de duas agulhas de insulina sob estereomicroscópio

(aumento de 10x). Após o isolamento, as MCIs foram transferidas para as placas contendo a monocamada de fibroblastos inativados previamente preparada.

3. Cultivo das células tronco embrionárias

As CTE foram cultivadas sobre monocamada de suporte (20×10^4 céls/ 1.9cm^2), utilizando-se 3 meios de cultivo:

- Grupo LIF: DMEM:F12 (Gibco®), suplementado com 20% SFB, penicilina G sódica 10000 UI e sulfato de estreptomicina $10.000 \mu\text{g/ml}$ para cada 1ml de meio, 1% de aminoácidos não essenciais, 0,1mM de 2-Mercaptoetanol, 0,1mM de Piruvato de Sódio e 1000U de Fator inibitório de leucemia (LIF).
- Grupo bFGF: Foi utilizado o mesmo meio do controle, o qual foi acrescido de 8ng/ml de fator de crescimento fibroblastico básico (bFGF).
- Grupo LIF + bFGF: Foi utilizado o mesmo meio do controle, o qual foi acrescido de 1000U de Fator inibitório de leucemia (LIF) e 8ng/ml de fator de crescimento fibroblastico basico (bFGF).

O cultivo foi realizado em estufa úmida a 38.5°C com umidade relativa próxima de 100% e atmosfera gasosa de 5% de CO_2 , e foi realizada a troca do meio a cada 48 horas. A taxa de crescimento e aspectos morfológicos das células foi avaliada utilizando-se o microscópio invertido com as lentes objetivas de aumento 10, 20 e 40X.

Após o cultivo inicial dos blastômeros, as colônias estabelecidas foram repicadas mecanicamente sob o estereomicroscópio. Para tanto, as colônias iniciais foram repicadas com o auxílio de agulhas de insulina e pipetas de vidro estéreis sob o estereomicroscópio (aumento de 10X) em fluxo laminar. Cada colônia foi dividida em três a quatro fragmentos os quais foram adicionados a novas placas de cultivo (também previamente tratadas com monocamada de fibroblastos) na concentração de dois fragmentos por poço.

Análise Estatística

O número de replicatas ficou limitado a, no mínimo, 3 repetições para cada comparação para que diferenças estatísticas pudessem ser detectadas.

Para análise estatística dos dados de 3 replicatas para cada comparação foi utilizada a análise de variância seguido de múltiplas comparações, aos pares, pelo teste Student-Newman-Kleus. O nível de significância utilizado foi de 5%.

4. Resultados

Foram realizadas 21 rotinas de PIV, selecionou-se, em média, 190 oócitos em cada rotina, os quais foram distribuídos homogeneamente em gotas de 90µl de meio específico cada uma.

Não houve diferença estatística na produção in vitro dos embriões quanto ao grupo 1 (meio CIV contendo 2,5% de soro fetal bovino) e grupo 2 (meio CIV contendo 10% de soro fetal bovino).

Tabela 1. Porcentagem de embriões produzidos.

Rotinas	Oócitos selecionados	Mórulas		Blastocistos		Blastocistos expandidos		Blastocistos eclodidos	
		G1	G2	G1	G2	G1	G2	G1	G2
1	200	19,0	16,0	12,5	13,5	6,0	7,0	1,0	0,5
2	200	17,5	15,5	12,0	12,5	7,0	6,5	0,5	1,0
3	175	12,6	15,4	10,3	10,9	8,6	8,0	0,0	0,6
4	200	17,0	19,0	11,0	10,5	4,5	4,0	1,0	1,0
5	180	21,1	15,0	12,8	14,4	7,2	7,8	0,6	0,6
6	165	13,9	15,2	12,7	13,3	9,1	8,5	0,6	1,2
7	275	16,4	14,5	12,7	12,0	5,8	6,2	0,0	0,7
8	175	21,7	22,9	14,3	15,4	8,6	9,1	4,6	4,0
9	150	21,3	26,0	18,0	18,7	9,3	12,0	4,7	4,7
10	145	25,5	26,2	19,3	16,6	11,7	9,0	4,8	4,1
11	175	21,7	21,1	16,6	15,4	9,1	9,7	3,4	5,1

12	200	20,0	21,0	13,0	13,0	9,0	9,0	4,5	4,0
13	185	24,3	22,2	13	13,5	7,0	8,1	4,3	3,2
14	190	22,6	19,5	14,2	15,3	7,9	8,9	3,2	4,2
15	165	24,2	23,6	15,8	15,8	10,3	8,5	4,2	4,2
16	200	24,0	23,5	18,0	17,0	7,5	6,5	1,5	2,0
17	195	26,7	23,6	17,4	19,0	7,2	6,7	1,0	1,0
18	225	20,9	22,2	15,6	14,7	6,7	6,2	0,4	2,2
19	190	22,6	23,7	20,5	21,1	6,8	6,8	2,1	1,6
20	200	21,0	26,5	18,0	17,5	8,0	7,5	1,0	0,5
21	225	18,2	22,2	16,9	16,0	6,2	7,6	0,9	0,9
Média	191,2	20,6	20,7	15,0	15,1	7,8	7,8	2,1	2,3

G1 – 2,5% SFB; G2 – 10% SFB

Quanto às células da monocamada de sustentação, se observou um eficiente crescimento e boa inativação das células fibroblásticas bovinas (Figura 1). O protocolo utilizado (10 μ g/mL de mitomicina C) foi adaptado de camundongos e funcionou bem para espécie bovina.



Figura 1. Fibroblastos de pele de bovino adulto inativados. Foto à direita: aumento de 10X. Foto à esquerda: aumento de 20X.

Em média, 525 embriões de cada um dos dois grupos (2,5% e 10% de soro fetal bovino, respectivamente) foram selecionados para o isolamento da MCI. Foram utilizados 300 blastocistos iniciais, 160 blastocistos expandidos e 45 blastocistos eclodidos por grupo. No entanto, somente os blastocistos expandidos aderiram à monocamada de fibroblastos e se desenvolveram em colônias semelhantes a células

tronco. Alguns blastocistos eclodidos não aderiam e formavam corpos embrióides císticos permanecendo em suspensão.

Das 21 rotinas realizadas utilizando-se embriões produzidos em presença de 10% de SFB 10 (47,6%) resultaram na formação de colônias semelhantes à CTE (Figura 3A, 3B e 3C). Já quando foram utilizados embriões produzidos em presença de 2,5% de SFB o índice de formação de colônias foi de 52,4% (11/21 – Figura 3D, 3E e 3F). Da mesma forma não se observou diferença quanto à morfologia das células presentes nas culturas obtidas a partir dos dois tipos de embriões (Figura 2).

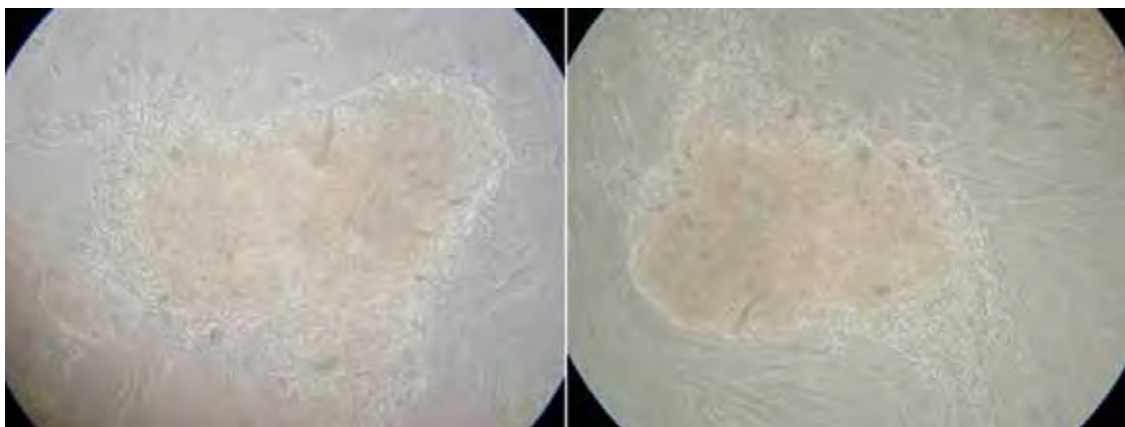


Figura 2. Aspecto da MCI aderida a monocamada de fibroblastos 48 horas após o isolamento. Aumento de 20X. A direita, células obtidas de embriões cultivados com 2,5% de SFB; à esquerda, células obtidas de embriões cultivados com 10% de SFB.

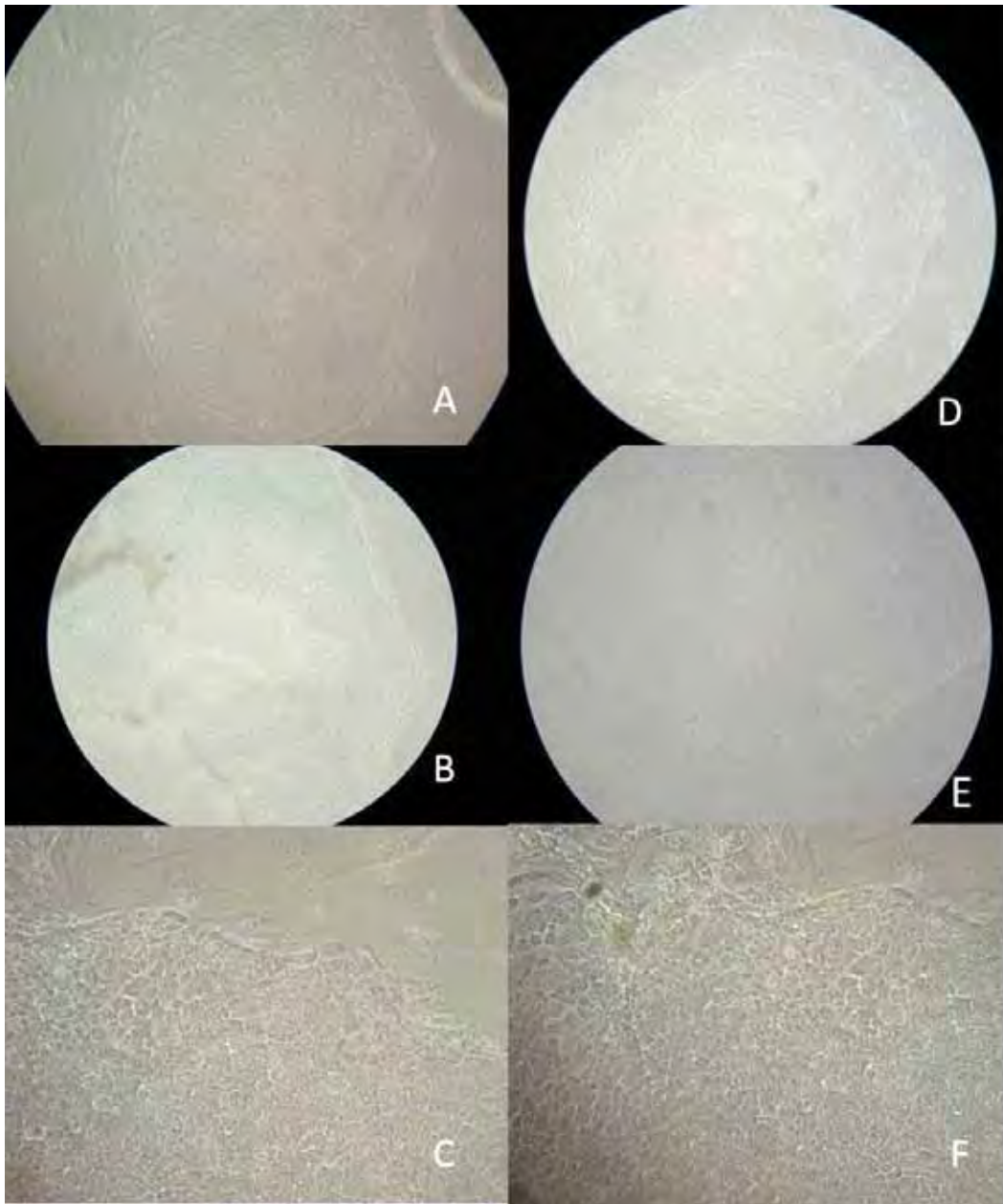


Figura 3. Colônias semelhantes a células tronco embrionárias em crescimento mais avançado sob a monocamada de fibroblastos bovinos. A, B e C são MCI de blastocistos produzidos com 10% de SFB. D, E e F são MCI de blastocistos produzidos com 2,5% de SFB. A, B, D e E - Aumento de 10X; C e F - Aumento de 20 X.

As MCI transferidas para o cultivo aderiram e se desenvolveram igualmente em presença de LIF associada ou não ao bFGF, portanto este último não foi fundamental para o desenvolvimento das colônias. Entretanto, a adição do bFGF sozinho não foi suficiente para sustentar o desenvolvimento das colônias de células semelhantes a CTE bovinas.

DISCUSSÃO

Desde o sucesso no isolamento, caracterização e cultivo por longos períodos de células tronco embrionárias de camundongos no início dos anos 80 e de humanos, uma década depois, esforços consideráveis tem sido feitos para estabelecer linhagens de CTEs de espécies domésticas. No entanto, até o momento a validação de linhagens de CTEs de bovinos ainda não foi estabelecida adequadamente (MALAVER-ORTEGA et al., 2012). Nesta espécie são observadas dificuldades técnicas relacionadas a particularidades morfológicas das células em cultura e a falta de marcadores moleculares específicos para a identificação das CTE. Por exemplo, é difícil a distinção entre colônias formadas a partir do crescimento de células do trofoectoderma, do endoderma ou do epiblasto baseado somente em características morfológicas (TALBOT et al, 2008).

Apesar disso, células com propriedades de CTE foram isoladas de bovinos e espécies relacionadas (ROACH et al., 2006; LI et al. 2010). Contudo dissimilaridades entre CTE de ungulados, humanas e de camundongos são óbvias desde o início do cultivo. Parte destas diferenças parece estar associada a discrepâncias no padrão de desenvolvimento embrionário encontrado entre as espécies. Em camundongos a segregação do epiblasto e da endoderme primitiva ocorre concomitantemente com a implantação. Desta forma, o isolamento das CTE ocorre em uma fase do desenvolvimento anterior a este evento. Nos bovinos, o início da formação da endoderme primitiva é concomitante com a eclosão, dando origem a um embrião tubular e extremamente longo (RIELLAND et al., 2008).

Não existem muitos estudos, na espécie bovina, sobre o melhor momento para o isolamento da massa celular interna objetivando a produção de colônia semelhantes a CTE (BREVINI et al., 2010). Chen et al, (1999) constatou que blastocistos iniciais suínos produzidos *in vivo* tinham um número relativamente pequeno de células do trofoectoderma e uma MCI menor e achatada. Desta forma a taxa de sucesso para o estabelecimento de culturas de células semelhantes à CTE foi maior quando se utilizou blastocistos expandidos quando comparado a blastocistos iniciais (CHEN *et al*, 1999). Ao comparar a geração de culturas de CTE provenientes de blastocistos produzidos *in vivo* de porco de 5-6 dias e de 10-11 dias de gestação observou-se que esses últimos geraram culturas semelhantes à CTE, enquanto nenhuma colônia foi propagada de

blastocistos de 5-6 dias (HOCHEREAU-DE REVIERS & PERREAU, 1993). Dados semelhantes foram observados no presente experimento, onde observamos a geração de colônias semelhantes a CTE somente quando utilizamos blastocistos expandidos, em detrimento do grande número de blastocistos utilizados. O tamanho da MCI pode ter sido um fator importante na geração das colônias, uma vez que a visualização e isolamento destas foi realizado mais facilmente nos blastocistos expandidos em relação aos blastocistos iniciais, de menor diâmetro.

Apesar dos blastocistos eclodidos apresentarem facilidade de manipulação, em nenhum caso foi observada aderência da MCI a monocamada de fibroblastos. Quando estes embriões foram utilizados, as MCI rapidamente se reorganizavam formando corpos embrioides císticos que permaneciam em suspensão. O estágio mais avançado de desenvolvimento embrionário, com o início da separação entre epiblasto e endoderme primitiva pode ter contribuído para esta formação dos corpos embrioides. A separação entre epiblasto e endoderme extra embrionária marca a segregação da MCI em dois tecidos caracterizando o segundo evento de diferenciação embrionária (GASPEROWICZ e NATALE, 2010).

Um dos fatores fundamentais para o sucesso do estabelecimento de cultivo de TCE é a qualidade dos embriões utilizados. Neste sentido a qualidade dos embriões bovinos PIV está diretamente relacionada às condições de cultivo utilizadas (WRIGHT & ELLINGTON, 1995). A adição de SFB ao meio de cultivo tem sido motivo de estudo em vários laboratórios, com resultados que mostram um efeito favorável no desenvolvimento embrionário (CAROLAN et al., 1995) e resultados que ressaltam os efeitos deletérios da adição de soro durante o cultivo (YOSHIOKA et al 1997). No presente experimento foi avaliado o efeito da concentração de SFB no meio de CIV no estabelecimento de colônias de células semelhantes a CTE, não tendo sido observada diferenças entre os grupos (10% x 2,5% de SFB). Estes resultados são condizentes com os obtidos em experimentos anteriores realizados em nosso laboratório onde a taxa de produção de blastocistos, o número de células e a viabilidade embrionária foi semelhante quando utilizou-se sistemas contendo 2,5 ou 10% de SFB no cultivo embrionário (SUDANO et al., 2012)

Em comparação com o grande número de estudos explorando as condições de cultura apropriadas para camundongos e CTE humanos, há uma quantidade mínima de dados disponíveis para CTE de espécies domésticas. Informações limitadas são principalmente baseadas nos sistemas de cultura de CTE de camundongos. A qualidade da monocultura de fibroblasto necessária é um destes aspectos pouco conhecidos. CTE de camundongos podem ser mantidas indiferenciadas quando cultivadas em meio de cultivo com adição do fator inibitório de leucemia (LIF). O efeito do LIF consiste em ativar o fator STAT 3 indispensável para a continuação da multiplicação de células indiferenciadas (NIWA et al, 1998, NIWA et al, 2000). Entretanto, possivelmente as condições de cultivo consideradas adequadas para a manutenção de células tronco de camundongos são diferentes das necessárias para outras espécies de animais. É conhecido que alguns fatores necessários para a manutenção da pluripotência de CTE murinas são não só dispensáveis, mas até deletérios para o cultivo de CTE humanas. Por exemplo, a estimulação do fator STAT-3 pela LIF em CTE humanas parece não induzir a proliferação do cultivo, como ocorre em camundongos (MUÑOZ et al., 2008a).

Estudos preliminares realizados por Keefer et al. (2007) demonstraram que células da MCI de blastocistos bovinos apresentam receptores para LIF. No entanto, a presença da LIF não auxiliou no estabelecimento e manutenção de CTE em outros ungulados. De fato, Vejlsted et al. (2005) demonstraram um efeito deletério da adição de LIF ao cultivo de CTE em bovinos. No presente experimento, a adição da LIF se mostrou necessária para a aderência, manutenção e crescimento das colônias de células semelhantes as CTE.

Outros fatores de crescimento como o bFGF, EGF e IGFs que suprimem a diferenciação de CTE murinas, aparentemente não foram capazes de inibir a diferenciação de CTE de suínos (PRELLE et al., 1994). Acredita-se que o bFGF atua na fosforização da tirosina de várias proteínas e ativação da sinalização extracelular das kinases ERK1/2. Além disso, tem sido demonstrado que o bFGF induz a expressão da Gremlina,, uma proteína capaz de induzir a diferenciação celular (LIU et al, 2007). No presente experimento não se observou alteração no padrão de crescimento, e ou morfologia das células cultivadas em presença ou ausência do bFGF. Além disso, a adição do bFGF sozinho não foi capaz de sustentar o desenvolvimento das colônias de células semelhantes a CTE bovinas. Cai et al., 2006, visando detectar pequenas alterações de diferenciação em culturas de CTE humanas removeram bFGF por um

período de três dias e, por imunocitoquímica para marcação de CTE, não detectaram qualquer diferença em células tratadas com bFGF relacionadas às culturas em que o bFGF foi retirado, ou seja a presença ou ausência do bFGF não causou alteração na indiferenciação das células.

Independente das condições de cultivo, ou da origem dos embriões as MCI se desenvolveram em colônias de espessura fina, com bordas bem definidas, formadas por células pequenas de aspecto hexagonal e tamanho uniforme com núcleo evidente contendo um a dois nucléolos. Esta morfologia se assemelha a descrita por LI et al. (2006) para CTE de humanos e eqüinos, mas difere da descrita para camundongos, que formam colônias espessas com células sobrepostas e com bordas pouco definidas. De acordo com GJORRET & MADDOX-HYTTEL (2005) as CTE bovinas possuem capacidade de proliferação *in vitro* e apresentam características morfológicas semelhantes à das células CTE de humanos, como uma alta razão núcleo/citoplasma, colônias achatadas, que podem crescer como monocamadas, com delimitação ou não nas suas bordas.

Os resultados do presente experimento demonstraram que embriões bovinos produzidos *in vitro* são capazes de originar colônias de células semelhantes à CTE independente das concentrações de soro utilizadas durante o cultivo *in vitro*. No entanto, a escolha do estágio de desenvolvimento embrionário se mostrou importante para o estabelecimento do cultivo, com a utilização de blastocistos expandidos sendo superior a de blastocistos iniciais e blastocistos eclodidos. Além disso, nas condições do presente estudo, a adição de LIF foi fundamental para manutenção das células em cultivo e o acréscimo de bFGF ao meio de cultivo não contribuiu para o melhor desenvolvimento das colônias.

CONCLUSÃO

Blastocistos expandidos produzidos *in vitro* são capazes de originar colônias semelhantes à células-tronco embrionárias, a LIF foi fundamental para a manutenção das células, porém o bFGF não demonstrou ação no desenvolvimento das mesmas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMIT, M.; SHARIKI, C.; MARGULETS, V.; ITSKOVITZ-ELDOR, J. Feeder layer and serum-free culture of human embryonic stem cells. **Biol. Reprod.**, v.70, p.837-845, 2004.

BREVINI, T.A.L.; PENNAROSSA, G.; ATTANASIO, L.; VANELLI, A.; GASPARRINI, B.; GANDOLFI, F. Culture conditions and signalling networks promoting the establishment of cell lines from parthenogenetic and biparental pig embryos. **Stem Cell Rev.**, v.6, p.484-495, 2010.

CAI, J.; CHEN, J.; LIU, Y.; MIURA, T.; LUO, Y.; LORING, J.F.; FREED, W.J.; RAO, M.S.; ZENG, X. Assessing self-renewal and differentiation in hESC lines. **Stem Cells**, v.24, p.516-530, 2006.

CAROLAN, C.; LONERGAN, P.; VAN-LANGENDONCKT, A.; MERMILLOD, P. Factors affecting bovine embryo development in synthetic oviduct fluid following oocyte maturation and fertilization *in vitro*. **Theriogenology**, v.43, p.1115-1128, 1995.

CHEN, L.R.; SHIUE, Y.L.; BERTOLINI, L.; MEDRANO, J.F.; BON DURANT, R.H.; ANDERSON, G.B. Establishment of pluripotent cell lines from porcine preimplantation embryos. **Theriogenology**, v.52, p.195-212, 1999.

DUQUE, P.; HIDALGO, C.O.; GOMEZ, E.; PINTADO, B.; FACAL, N.; DIEZ, C. Macromolecular source as dependent on osmotic pressure and water source: effects on bovine *in vitro* embryo development and quality. **Reprod. Nutr. Dev.**, v.43, p.487-496, 2003.

GASPEROWICZ, M.; NATALE, D.R. Establishing three blastocyst lineages--then what? **Biol Reprod**, v.84, n.4, p.621-630, 2011.

GJORRET, J.O.; MADDOX-HYTTEL, P. Attempts towards derivation and establishment of bovine embryonic stem cell-like cultures. **Reprod. Fertil. Dev.**, v.17, p.113-124, 2005.

HOCHEREAU-DE REVIERS, M.T.; PERREAU, C. *In vitro* culture of embryonic disc cells from porcine blastocysts. **Reprod. Nutr. Dev.**, v.33, p.475-483, 1993.

HUANG, B.; LI, T.; WANG, X.L.; XIE, T.S.; LU, Y.Q.; DA SILVA, F.M. Generation and characterization of embryonic stem-like cell lines derived from *in vitro* fertilization Buffalo (*Bubalus bubalis*) embryos. **Reprod. Domest. Anim.**, v.45, p.122-128, 2010.

KEEFER, C.L.; PANT, D.; BLOMBERG, L.; TALBOT, N.C. Challenges and prospects for the establishment of embryonic stem cell lines of domesticated ungulates. **Anim. Reprod. Sci.**, v.98, p.147-168, 2007.

LEIVAS, F.G.; BRUMB, D.S.; FIALHOA, S.S.; SALIBAB, W.P.; ALVIMB, M.T.T.; BERNARDIC, M.L.; RUBINA, M.I.B.; SILVA, C.A.M. Fetal calf serum enhances *in vitro* production of *Bos taurus indicus* embryos. **Theriogenology**, v.75, p.429-433, 2011.

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

LIU, X.; WU, X.; CAI, L.; SUN, S.; LIU, F. bFGF-induced angiogenesis in ischemic myocardium is associated with calreticulin downregulation **J. Mol. Cell Cardiol.**, v.42, suppl.1, p.S222, 2007.

MALAVAR-ORTEGA, L.F.; SUMER, H.; LIUA, J.; VERMA, P.J. The state of the art for pluripotent stem cells derivation in domestic ungulates, **Theriogenology**, <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.03.031>, 2012

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

NIWA, H.; MIYAZAKI, J.-I.; SMITH, A.G. Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. **Nat. Genet.**, v.24, p.372-376, 2000.

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

PRELLE, K.; WOBUS, A.M.; WOLF, E.; NEUBERT, N.; HOLTZ, W. Effects of growth factors on the in vitro development of porcine inner cell masses isolated by calcium ionophore. **J. Reprod. Fertil.**, v.13, p.41, 1994.

RIELLAND, M.; HUE, I.; RENARD, J.P.; ALICE, J. Trophoblast stem cell derivation, cross-species comparison and use of nuclear transfer: new tools to study trophoblast growth and differentiation. **Dev Biol**, v.322, n.1., p.1-10, 2008.

RIZOS, D.; GUTIÉRREZ, A.A.; GARNELO, S.P.; FUENTE, J.; LONERGAN, P.; BOLAND, M.P. Bovine embryo culture in the presence or absence of serum: Implications for blastocyst development, cryotolerance and messenger RNA expression. **Biol. Reprod.**, v.68, p.236-243, 2003.

ROACH, M.; WANG, L.; YANG, X.; TIAN, X.C. Bovine embryonic stem cells. **Methods Enzymol**, v.418, p.21-37, 2006.

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

SUDANO, M.J.; PASCHOAL, D.M.; RASCADO, T.S.; CROCOMO, L.F.; MAGALHÃES, L.C.O.; MARTINS JR, A.; MACHADO, R.; LANDIM-ALVARENGA, F.C. Crucial surviving aspects for vitrified in vitro-produced bovine embryos. **Zygote**, <http://dx.doi.org/10.1017/S0967199412000196>, 2012.

TALBOT, N.C.; BLOMBERG, L.A. The pursuit of ES cell lines of domesticated ungulates. **Stem Cell Rev**, v.4, p.235–254, 2008.

VEJLSTED, M.; AVERY, B.; SCHMIDT, M.; GREVE, T.; ALEXOPOULOS, N.; MADDOX-HYTTEL, P. Ultrastructural and immunohistochemical characterization of the bovine epiblast. **Biol. Reprod.**, v.72, p.678-686, 2005.

WILLIAMS, R.L.; HILTON, D.J.; PEASE, S.; WILLSON, T.A.; STEWART, C.L.; GEARING, D.P.; WAGNER, E.F.; METCALF, D.; NICOLA, N.A.; GOUGH, N.M. Myeloid leukemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells. **Nature**, v.336, n.6200, p.684-687, 1988.

WRIGHT Jr., R.W; ELLINGTON, J. Morphological and physiological differences between *in vivo*- and *in vitro*-produced preimplantation embryos from livestock species. **Theriogenology**, v.44, p.1167-1189, 1995.

YOSHIOKA, K.; OTHMAN, A.M.; TANIGUCHI, T.; KAMANAKA, H.; SEKIKAWA, K. Differential patterns of blastulation in bovine morulae cultured in synthetic oviduct fluid medium containing FCS or BSA. **Theriogenology**, v.48, p.997-1006, 1997.

CAPÍTULO 2

ESTE TRABALHO DEU ORIGEM A ESTE ARTIGO QUE FOI ESCRITO CONFORME OS MOLDES DA REVISTA: **CELLULAR REPROGRAMMING**, EXCETO PELA LÍNGUA.

CAPÍTULO 2

Título: Caracterização da pluripotência de células-tronco embrionárias obtidas de blastocistos bovinos produzidos in vitro e cultivadas com bFGF (Fator de crescimento fibroblástico básico)

Resumo: *Introdução:* Células-tronco embrionárias (CTE) são células indiferenciadas, derivadas da massa celular interna de embrião. As características essenciais desse tipo de célula são: proliferação prolongada in vitro, auto-renovação e a habilidade para formar os mais diferentes tipos celulares. O cultivo das CTE depende da adição de alguns fatores de crescimento no meio básico, tais como o bFGF que mantém estas células em estado indiferenciado. Para comprovar a pluripotencialidade das CTE utilizam-se marcadores moleculares bem estabelecidos pela literatura como Oct-4, Nanog e os da família SSEA e TRA1. Pouca informação está disponível sobre a expressão da pluripotência relacionada aos marcadores de superfície em embriões pré-implantação e CTE de bovinos. *Objetivo:* Dessa forma, objetivo deste experimento foi caracterizar as CTE de bovinos cultivadas da presença e ausência de bFGF utilizando-se da técnica de imunomarcagem específica para CTE. *Materiais e Métodos:* Foram utilizadas blastocistos bovinos produzidos in vitro com 9 dias de desenvolvimento. Suas respectivas massas celulares internas foram isoladas com o auxílio de duas agulhas de insulina e depositadas sob monocamada de fibroblastos bovinos inativados em placas 24 poços contendo meio DMEM:F12 (Gibco®), suplementado com 20% SFB, penicilina G sódica 10.000 UI, sulfato de estreptomicina 10.000µg, 1% de aminoácidos não essenciais, 1% de aminoácidos essenciais, 0,1mM de 2-Mercaptoetanol, 1000U de LIF e 8ng de bFGF para cada mL de meio. As colônias foram fixadas e marcadas com Oct-4, Nanog, SSEA-1, SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60 e TRA-1-81 após 7 dias de desenvolvimento (cultivo primário) e também 4 dias após a realização da 1ª passagem. Cinco blastocistos foram marcados para cada anticorpo como controle positivo, e colônias de CTE e outros cinco blastocistos foram incluídos por meio da omissão da incubação com anticorpo primário de todos os marcadores como controle negativo. *Resultados:* Não houve diferença no cultivo das células cultivadas ou não com bFGF,

elas preservaram morfologia característica de indiferenciação. Observaram-se, por imunofluorescência que as proteínas Oct4, Nanog, SSEA-3 e TRA-1-81 estavam presentes tanto nos blastocistos quanto nas colônias de cultivo primário e de 1ª passagem. Não se observou marcação quanto às proteínas SSEA-1, SSEA-4 e TRA-1-60 em nenhum dos dois tipos de estruturas. Os controles negativos não apresentaram fluorescência para nenhuma proteína. Conclusão: As células cultivadas realmente são células-tronco embrionárias segundo as marcações imuflorescentes dos anticorpos específicos e o bFGF adicionado ao meio não é essencial para o cultivo das células estudadas.

Abstract: *Introduction:* Embryonic stem cells (ESC) are undifferentiated cells derived from the inner cell mass of the embryo. The essential characteristics of this type of cell are: prolonged proliferation in vitro self-renewal and the ability to form many different cell types. The ESC of cultivation depend on the addition of some growth factors in a basic medium, such as bFGF that keeps those cells in the undifferentiated state. To prove the pluripotency of ESC using molecular markers well established in the literature as Oct-4, Nanog and, SSEA and TRA1 families. Little information is available on the expression of pluripotency markers related to the surface in pre-implantation embryos and ESC of cattle. *Objective:* Therefore, objective of this experiment was to characterize the ESC of cattle grown on the presence and absence of bFGF using the technique of immunostaining specific for ESC. *Materials and Methods:* We used bovine blastocysts produced in vitro with 9 days of development. Their inner cell masses were isolated with the aid of two needles for insulin and deposited under inactivated bovine fibroblast monolayer in 24 well plates containing DMEM: F12 (Gibco ®) supplemented with 20% FCS, 10 000 IU penicillin G sodium sulphate 10.000µg streptomycin, 1% nonessential amino acids, 1% essential amino acids, 0.1 mM 2-Mercaptoethanol, 1000U 8ng of LIF and bFGF for each ml of medium. The colonies were fixed and stained with Oct-4, Nanog, SSEA-1, SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60 and TRA-1-81 after 7 days of development (primary culture) and after 4 days the realization of a first pass. Five blastocysts were scored for each antibody as a positive control, and colonies of ESC and five blastocysts were included by omission of incubation with primary antibody for all markers as negative control. *Results:* There was no difference in the cultivation of cells cultured with or without bFGF, they preserved morphology characteristic of

undifferentiated. It was observed by immunofluorescence proteins Oct4, Nanog, SSEA-3 and TRA-1-81 were present both in blastocysts and the colonies growing primary and a first pass. There was no protein as marking SSEA-1, SSEA-4 and TRA-1-60 in either of two kinds of structures. The negative controls showed no fluorescence for any protein. *Conclusion:* The cultured cells are actually embryonic stem cell according to the markings imuflorescentes specific antibody added to the medium and bFGF is not essential to the cultivation of cells studied.

INTRODUÇÃO

Células-tronco embrionárias (CTE) são caracterizadas por uma típica aparência morfológicas, que pode ser espécies relacionadas, capacidade de proliferar indefinidamente mantendo-se em um estado indiferenciado, capacidade de diferenciar nas três camadas germinativas: ectoderme, mesoderme e endoderme e por expressão de pluripotência garantida por marcadores específicos de superfície e intracelulares. Entre os marcadores de superfície estão antígenos estágio-específico 1 3 e 4 (do inglês stage-specific embryonic antigen-1, 3 e 4 (SSEA-1, SSEA-3, SSEA-4)), antígenos de rejeição tumoral 1-60 e 1-81 (do inglês tumour rejection antigen-1-60 e 1-81 (TRA-1-60 e TRA-1-81)) e entre os marcadores intracelulares como Oct4, Nanog e fatores de transcrição, têm sido comumente usados para a caracterização de CTE de camundongos (HENDERSON *et al.* 2002), humanos (DRAPER *et al.*, 2002; HENDERSON *et al.*, 2002; LEE *et al.*, 2005), ovinos (ZHAO *et al.*, 201), cabra (HE *et al.*, 2006), cavalo (LI ET AL., 2006).

Em estudos recentes, a expressão de alguns destes marcadores foi relatado em células derivadas de embriões produzidos *in vitro* (HUANG ET AL., 2010) ou em embriões partenotos (SRITANAUDOMCHAI *et al.*, 2007). Recentemente, houve relatos da expressão de transcrições de Oct4 em CTE derivadas de embriões PIV de búfalo (VERMA *et al.*, 2007).

Uma vez que as células CTE de camundongos (CTEC) diferem das CT humanas (CTEH) na expressão de alguns marcadores para pluripotência, células-tronco embrionárias têm sido isoladas de várias espécies de animais domésticos, na tentativa de se obter um modelo mais aproximado ao humano. As células-tronco embrionárias

bovinas (CTEB) podem oferecer algumas vantagens em relação CTEC, uma vez que o modelo bovino é imunologicamente e fisiologicamente mais semelhante ao humano (GJORRET & MADDOX-HYTTEL, 2005), a obtenção de seus embriões está bem estabelecida e fazem parte da rotina de empresas que trabalham com fertilização in vitro e transferência de embriões.

Pouca informação está disponível sobre a expressão da pluripotência relacionada marcadores de superfície em embriões pré-implantação e CTE de bovinos e, de acordo com a literatura, CTEB quando cultivadas de acordo com a metodologia padrão para este tipo celular, não suportam uma proliferação por um período prolongado de tempo, sem que ocorra a diferenciação (PRELLE et al., 1999; YADAV et al., 2005). Portanto, em relação às células tronco embrionárias bovinas, são necessários mais estudos para que se possam determinar quais os fatores críticos para a manutenção da sua pluripotência in vitro e também a expressão de marcadores moleculares já conhecidos.

OBJETIVOS:

Avaliar o potencial do bFGF (Fator de crescimento fibroblástico básico) no cultivo das células-tronco embrionárias de bovinos.

Examinar o fenótipo de antigênico de superfície em termos de expressão de Oct-4, Nanog, SSEA-1 SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60, TRA-1-81 em células-tronco semelhantes à CTE bovinas e em blastocistos PIV, visando relacionar os padrões fenotípicos de pluripotência em bovinos.

MATERIAIS E MÉTODOS:

1. Produção de embriões in vitro

1.1. Colheita e Maturação dos oócitos

Os oócitos foram obtidos a partir de ovários de abatedouro. Os ovários foram lavados e transportados em solução salina (NaCl) a 0,9%, aquecida a 36°C e acrescida de penicilina e estreptomicina.

A colheita dos oócitos será realizada através da aspiração de folículos com diâmetro entre 2 e 8 mm. Os oócitos que apresentarem aspecto homogêneo do citoplasma e compactação das células do *cumulus*, com duas a três camadas de células de revestimento foram selecionados.

Os oócitos selecionados foram maturados em estufa a 38,5 ° C, com 5% de CO₂ em ar por 22 a 24 h em gotas de 100uL (20 oócitos). Foi utilizado o meio TCM 199 com sais de Earle e L-glutamina suplementado com 10% SFB, 0,2 mM piruvato de sódio, 1 ug/mL estradiol, 50 µg/mL hCG, 5µg/mL FSH e 100 mg/mL de estreptomicina e 100 UI/mL de penicilina.

1.2. - Fertilização in vitro (FIV)

Após a maturação, oócitos foram submetidos à FIV. O sêmen foi preparado por centrifugação em gradiente de Percoll de 45 e 90%. A concentração foi ajustada para 2×10^6 espermatozoides/mL. A fertilização ocorreu em meio HTF (Irvine Scientific) acrescido de 6mg/mL de BSA, 0,2mM de piruvato, 30ug/mL de heparina, 18uM de penicilamina, 10uM de hipotaurina, e 1,8uM de epinefrina, 100 mg/mL de estreptomicina e 100 UI/mL de penicilina. Oócitos e espermatozoides foram incubados em gotas de 90uL (25 oócitos) em estufa a 5% CO₂ em ar por aproximadamente 18 h.

1.3.- Cultivo in vitro

Decorridas as 18 h de FIV, os possíveis zigotos foram desnudados e cultivados em meio SOFaa com 2,7mM de mio-inositol, 0,2 mM de piruvato, 5mg/mL de BSA, 100 mg/mL de estreptomicina, 100 UI/mL de penicilina e 2,5% de soro fetal bovino.

Todos os embriões foram cultivados em gotas de 100uL (20 oócitos/gota) cobertos com óleo mineral em estufa com 5% de CO₂, 5% O₂ e 90% N₂. Após 72 horas a clivagem foi avaliada, as estruturas que não estavam clivadas foram descartadas. Os embriões foram transferidos para outras gotas de 100uL contendo MB idêntico ao meio de cultivo. Cinco dias após a fertilização, 80 uL do meio de cultivo foi retirado e substituído por meio recém preparado. Sete dias após a FIV a formação de blastocistos foi avaliada. Aos nove dias de cultivo, os embriões foram utilizados para análise por imunocitoquímica ou tiveram sua massa celular interna individualizada para cultivo das CTE.

2. Isolamento das células tronco embrionárias

2.1. Preparo das células de sustentação (Monocamada):

Foram coletadas amostras com aproximadamente 1mm³ de tecido epitelial de fetos bovinos, as quais foram lavadas em solução fisiológica por duas vezes, e colocadas em frasco de transporte contendo meio de Eagle modificado por Dulbecco's (DMEM, Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA) em temperatura ambiente.

As amostras foram processadas em placas de Petri (de 60mm de diâmetro) contendo meio de cultivo. O tecido foi fragmentado em pedaços diminutos (média de 0,1 mm² 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 por solução de tripsina a 0,25% em PBSA e 1% de EDTA para obter a individualização celular.

Foi utilizado o meio de cultivo DMEM. Os fragmentos foram semeados distribuindo a suspensão celular em quatro frascos de cultivo de 25cm² e incubados durante meia hora em estufa a 37°C em atmosfera úmida contendo 95% de ar e 5%CO₂, para favorecer sua adesão à superfície. Após esse tempo foi adicionado cerca de 3 ml de meio fresco em cada frasco, contendo 10% de soro fetal bovino e 1% de solução antibiótica-antimicótica.

Os frascos foram devidamente identificados, datados e levados à estufa de cultivo com as tampas semi-abertas.

A monitoração do crescimento celular e de sua evolução foi feita a cada 24 horas utilizando-se microscópio de observação direta, para detecção precoce de qualquer anomalia. Após 7 dias foi realizada a primeira troca de meio de cultivo. Uma vez que se iniciou o crescimento celular ao redor dos explants, o meio de cultivo foi renovado a cada 3 dias. Quando 70% do fundo do frasco de cultura estava coberto por células (subconfluência), essa cultura primária foi sub-cultivada.

Para tanto, as garrafas confluentes passaram por tripsinização: depois de retirado todo meio de cultivo das garrafas, estas foram lavadas com solução de PBS, e adicionadas de 2 ml de Tripsina Vernese (Instituto Adolfo Lutz, 0,2% Tripsina e 0,02% Versene) à 36°C. As garrafas foram mantidas em estufa a 38,5° C por no máximo 10 minutos, ou até que todas as células se soltassem do fundo.

Foi realizada então, a neutralização com meio DMEM acrescido de 20% de SFB e Penicilina/Estreptomicina, na proporção de 3:1 (3ml de meio para 1ml de tripsina). Uma amostra de 50 μ l desta mistura células + meio foi retirada e adicionada a 50 μ l do corante Tripán Blue, onde as células azuis, que permitem a passagem do corante, estavam mortas e, as células translúcidas, que não permitem passagem do corante, estavam vivas. A mistura foi então, destinada ao preenchimento da Câmara de Neubauer para contagem das células translúcidas dos 4 quadrantes mais externos. Após isso, as células que descolaram das garrafas foram centrifugadas com meio DMEM e ressuspendidas em placas de cultura de poliestireno com 6 poços em uma concentração de 1×10^5 células por poço.

Para o bloqueio do crescimento celular, os poços contendo células em confluência (20×10^4 cels/ 1.9cm^2 por poço) tiveram seu meio substituído por 4,0 ml de solução contendo mitomicina C ($10 \mu\text{g/ml}$), previamente preparada. Tal meio foi incubado por 24 horas. Em seguida, o meio foi retirado, os poços foram lavados por duas vezes com PBS e então, foi colocado meio específico para células-tronco embrionárias.

2.2. Isolamento das células tronco embrionárias

Para facilitar a remoção da zona pelúcida bem como o isolamento da MCI, uma cunha foi feita no fundo da placa pela pressão da lâmina de bisturi contra o fundo plástico da mesma. Esta cunha serviu como apoio para rompimento da zona pelúcida e remoção do trofoblasto. A massa celular interna (MCI) foi isolada por microcirurgia, com auxílio de duas agulhas de insulina sob estereomicroscópio (aumento de 10x).

Após o isolamento, a MCI foi transferida para as placas contendo a monocamada de fibroblastos inativados previamente preparada.

3. Cultivo das células tronco embrionárias

Optou-se por utilizar blastocistos com 9 dias de desenvolvimento devido ao maior sucesso do cultivo das CTE em experimentos anteriores.

As CTE foram cultivadas sobre a monocamada de suporte (20×10^4 cels/ 1.9cm^2), em placas de 6 poços, utilizando-se meio DMEM:F12 (Gibco®), suplementado com 20%

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 Piruvato de Sódio e 1000U de Fator inibitório de leucemia (LIF) e 8ng/ml de fator de crescimento fibroblástico básico (bFGF).

O cultivo foi realizado em estufa úmida a 38.5°C com umidade relativa próxima de 100% e atmosfera gasosa de 5% de CO₂, e foi realizada a troca do meio a cada 48 horas. A taxa de crescimento e aspectos morfológicos das células foi avaliada utilizando-se o microscópio invertido com as lentes objetivas de aumento 10, 20 e 40X.

Após o cultivo inicial dos blastômeros, as colônias estabelecidas foram repicadas mecanicamente sob o estereomicroscópio. Para tanto, as colônias iniciais foram repicadas com o auxílio de pipetas de vidro estéreis sob o estereomicroscópio (aumento de 10X) em fluxo laminar. Cada colônia foi dividida em três fragmentos os quais foram adicionados a novas placas de cultivo (também previamente tratadas com monocamada de fibroblastos) na concentração de dois fragmentos por poço.

4. Confirmação da linhagem de células tronco

4.1. Análise imunocitoquímica

4.1.1. Imunomarcção para fatores de indiferenciação

Tanto embriões como colônias de células em cultivo foram examinados por imunofluorescência quanto à presença das proteínas Oct-4 (monoclonal mouse, MAB4305-20, Millipore), Nanog (monoclonal rabbit, ab80892, Abcam), SSEA-1 (monoclonal mouse, MAB4301-20, Millipore), SSEA-3 (monoclonal mouse, MAB4303-20, Millipore), SSEA-4 (monoclonal mouse, MAB4304-20, Millipore), TRA-1-60 (monoclonal mouse, MAB4360-20, Millipore), TRA-1-81 (monoclonal mouse, MAB4381—20, Millipore). Para bloquear ligações não específicas do anticorpo primário, as amostras foram incubadas em PBS + Triton X-100 a 0,1% por 10 minutos e depois lavadas em PBS acrescido de 5% de BSA por 60 minutos a temperatura ambiente. Todos os anticorpos primários foram diluídos 1:100 em PBS e aplicado às amostras por 60 minutos, depois as mesmas foram lavadas em PBS, os anticorpos secundários (anti-camundongo Alexa Fluor IgM 555, A21426, Invitrogen; anti-coelho

Alexa Fluor IgG, A21428, Invitrogen) foram aplicados e após 30 minutos as amostras foram analisadas em microscópio de fluorescência.

As colônias semelhantes às CTE foram fixadas e marcadas, logo após 7 dias de desenvolvimento (cultivo primário) e, 4 dias após o estabelecimento da 1ª passagem. Já os embriões passaram pela fixação e marcação, depois foram lavados e montados em lâminas, recobertos por lamínula e analisados também em microscópio de fluorescência.

Controles negativos para as CTE e embriões foram incluídos por meio da omissão da incubação com anticorpo primário de todos os marcadores.

4.1.2. Imunomarcção para a presença de citoqueratina (células do trofoectoderma)

As CTE isoladas foram avaliadas por imunocitoquímica utilizando-se marcadores celulares específicos de filamentos de citoqueratina. Para tanto as amostras foram fixadas nas placas de cultivo em 4% de paraformaldeído por 24 horas e, em seguida, submetidas à PBS acrescido de Triton X-100 a 0,1% por 10 minutos, lavado 3 vezes em PBS + 5% BSA para bloquear a ação do Triton e incubados por 60 minutos e marcadas com anticorpo anti-citoqueratina (cytokeratin, U7022, Dako, 1:100). Posteriormente, as colônias foram incubadas em anticorpo IgM de cabra anti-camundongo conjugado (Alexa Fluor IgM 555, A21426, Invitrogen). Os núcleos celulares foram marcados com DAPI (4'6'-diamidino-2- fenilindol-dicloridrato) (F6057, Sigma Aldrich).

4.1.3. Imunomarcção para α -fetoproteína (células da endoderme)

As CTE em cultivo foram fixadas em 4% de paraformaldeído por 24 horas e, em seguida, submetidas à PBS acrescido de Triton X-100 a 0,1% por 10 minutos, lavado 3 vezes em PBS + 5% BSA para bloquear a ação do Triton e incubados por 60 minutos em anticorpo monoclonal de camundongo anti- α -fetoproteína (AFP, SC8399, Santa Cruz, 1:100). Posteriormente, as colônias foram incubadas em anticorpo IgG de de cabra anti-camundongo conjugado (Alexa Fluor IgM 555, A21426, Invitrogen). Os núcleos celulares foram marcados com DAPI (4'6'-diamidino-2- fenilindol-dicloridrato).

4.1.4. Imunomarcação para vimentina (células da mesoderme)

As colônias cultivadas foram fixadas em 4% de paraformaldeído por 24 horas e, em seguida, submetidas à PBS acrescido de Triton X-100 a 0,1% por 10 minutos, lavado 3 vezes em PBS + 5% BSA para bloquear a ação do Triton e incubados por 30 minutos em anticorpo monoclonal de camundongo anti-vimentina (vimentin U7034 Dako. 1:100). Posteriormente, as colônias foram incubadas com anticorpo IgG de cabra anti-camundongo conjugado (Alexa Fluor IgM 555, A21426, Invitrogen). Os núcleos celulares foram marcados com DAPI (4'6'-diamidino-2- fenilindol-dicloridrato).

5. Análise Estatística

O número de replicatas ficou limitado a, no mínimo, 3 repetições para cada comparação para que diferenças estatísticas possam ser detectadas.

Para análise estatística dos dados de 3 replicatas para cada comparação foi utilizada a análise de variância seguido de múltiplas comparações, aos pares, pelo teste Student-Newman-Kleus. O nível de significância utilizado foi de 5%.

6.Resultados

Foram realizadas 21 rotinas de PIV. Priorizou-se utilizar blastocistos expandidos devido a experimentos anteriores em que foi detectado serem os mais adequados para produzirem colônias de células semelhantes às células-tronco embrionárias.

Em média, 320 blastocistos expandidos foram utilizados para o isolamento das respectivas massas celulares internas. Destes 164 (50%) resultaram em colônia de células bem definidas. As colônias apresentaram espessura fina, com bordas bem definidas, formadas por células pequenas de aspecto hexagonal e tamanho uniforme com núcleo evidente.

Não foi observada diferença no cultivo das massas celulares internas com relação à adição de bFGF ao meio. Tanto em cultivos com ausência de bFGF ou sua presença, as colônias cresceram na mesma velocidade (7 dias) e com a mesma morfologia. Entretanto a adição de LIF se mostrou fundamental para o desenvolvimento das colônias.

Não existem estudos em bovinos demonstrando a ação de outros fatores de crescimento sobre as CTE e no presente experimento não se observou alteração no padrão de crescimento, e ou morfologia das células cultivadas em presença ou ausência do bFGF.

Quando foi realizada a marcação imunocitoquímica dos embriões observou-se, por imunofluorescência que a proteína Oct4 estava presente tanto na MCI quanto no trofoblasto dos blastocistos produzidos in vitro (Fig. 1). Assim como as proteínas Nanog, SSEA-3 e TRA-1-81 (Fig. 2). Os controles negativos não apresentaram marcação alguma.

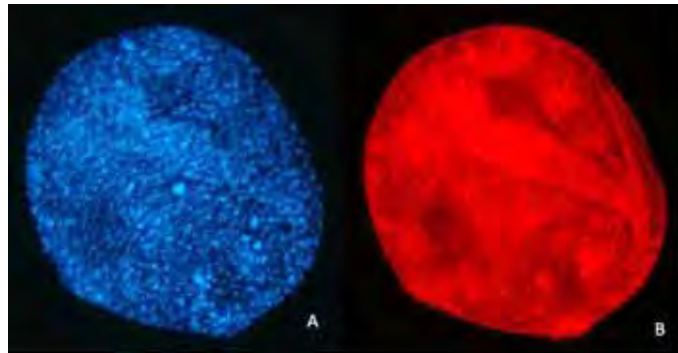


Figura 1. Blastocisto bovino apresentando a proteína Oct4 na MCI e trofoblasto. (Microscópio invertido. Aumento de 400X). A: marcação dos núcleos com DAPI. B: marcação de Oct-4.

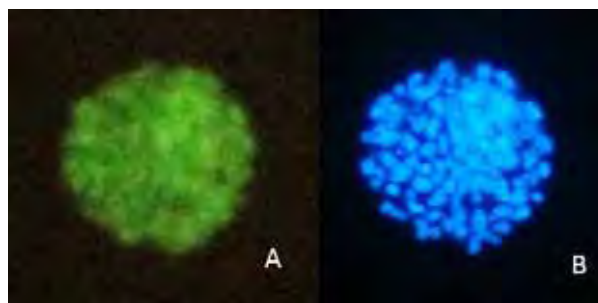


Figura 2. Blastocisto bovino apresentando a proteína TRA-1-81 na MCI e trofoblasto. (Microscópio invertido. Aumento de 200X). A: marcação de TRA-1-81, B: evidência dos núcleos do blastocisto com DAPI.

Tanto em colônias de células cultivadas por sete dias, ou seja, cultivo primário quanto em colônias em 1ª passagem, com 4 dias de estabelecimento, as proteínas Oct-4, Nanog, SSEA-3 e TRA-1-81 foram marcadas conforme evidenciado na Figura 3.

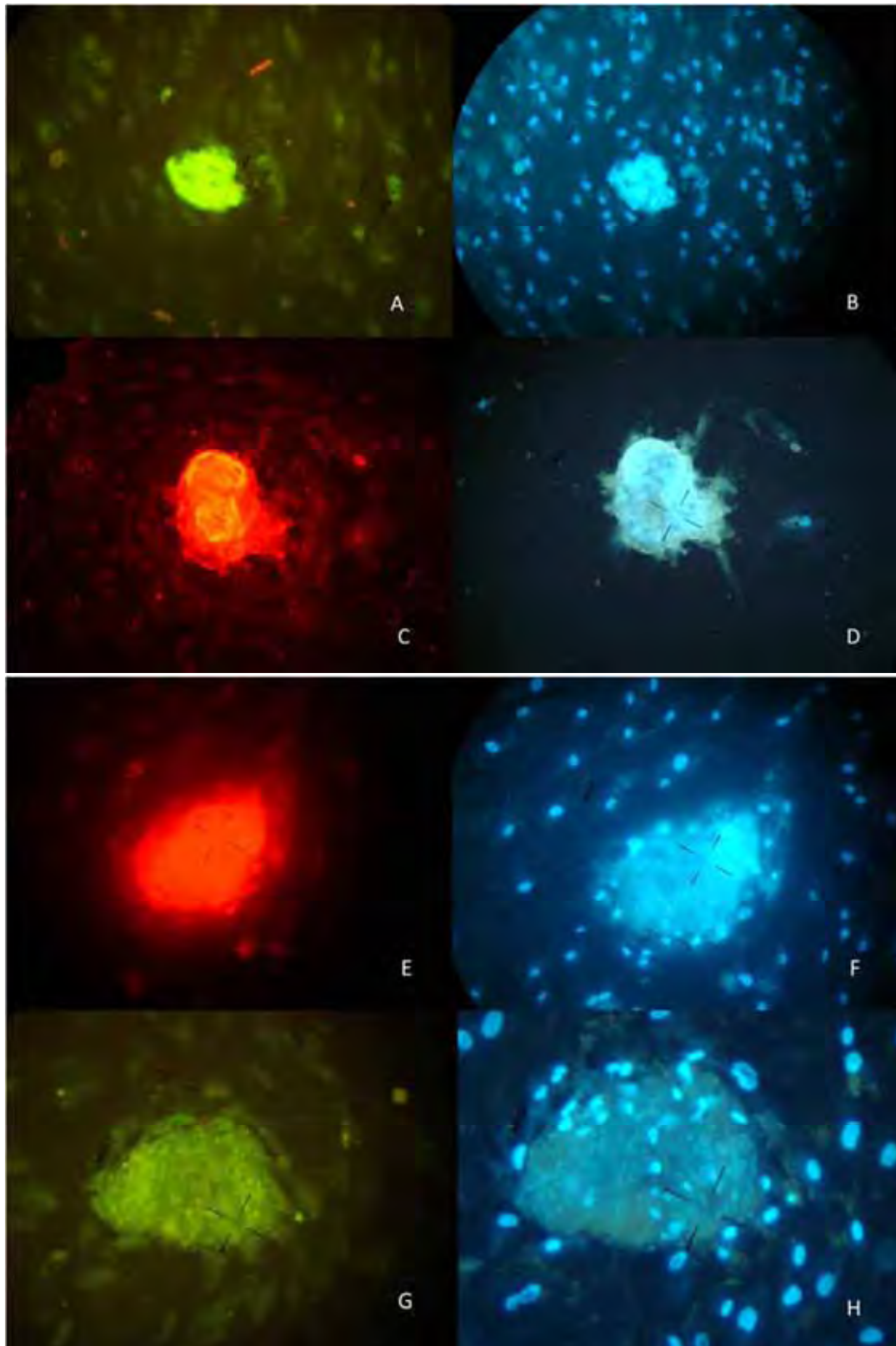


Figura 3. Imunomarcações das CTE bovinas. A e B: marcação positiva de TRA-1-81; C e D: marcação positiva de Nanog, E e F: marcação de SSEA-3 e, G e H: marcação de Oct-4. Todas as fotos foram obtidas por microscópio invertido, A, B, C, D, E, F: aumento de 200x, H: aumento de 400x.

Não se observou marcação quanto às proteínas SSEA-1, SSEA-4 e TRA-1-60. O controle negativo não apresentou fluorescência para nenhuma proteína.

Quando retirou-se a LIF observou-se a imunomarcação de α -fetoproteína (Fig.4A e B), vimentina (5A e B) e citoqueratina (Fig. 5C e D), que identificam, respectivamente, a presença de células da endoderme, mesoderme e ectoderme nas colônias de 1ª passagem. Foi observada a marcação de citoqueratina também em um cultivo primário.

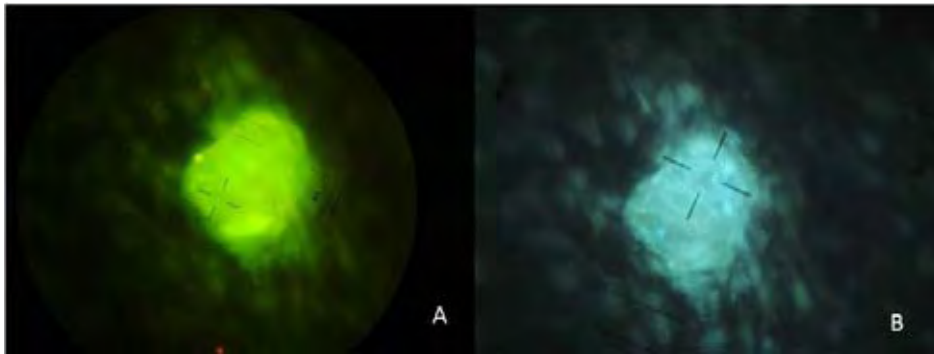


Figura 4. Imunomarcação da alfa-fetoproteína (AFP). A: marcação da proteína AFP, B: marcação dos núcleos celulares por DAPI. Microscópio invertido, 200X.

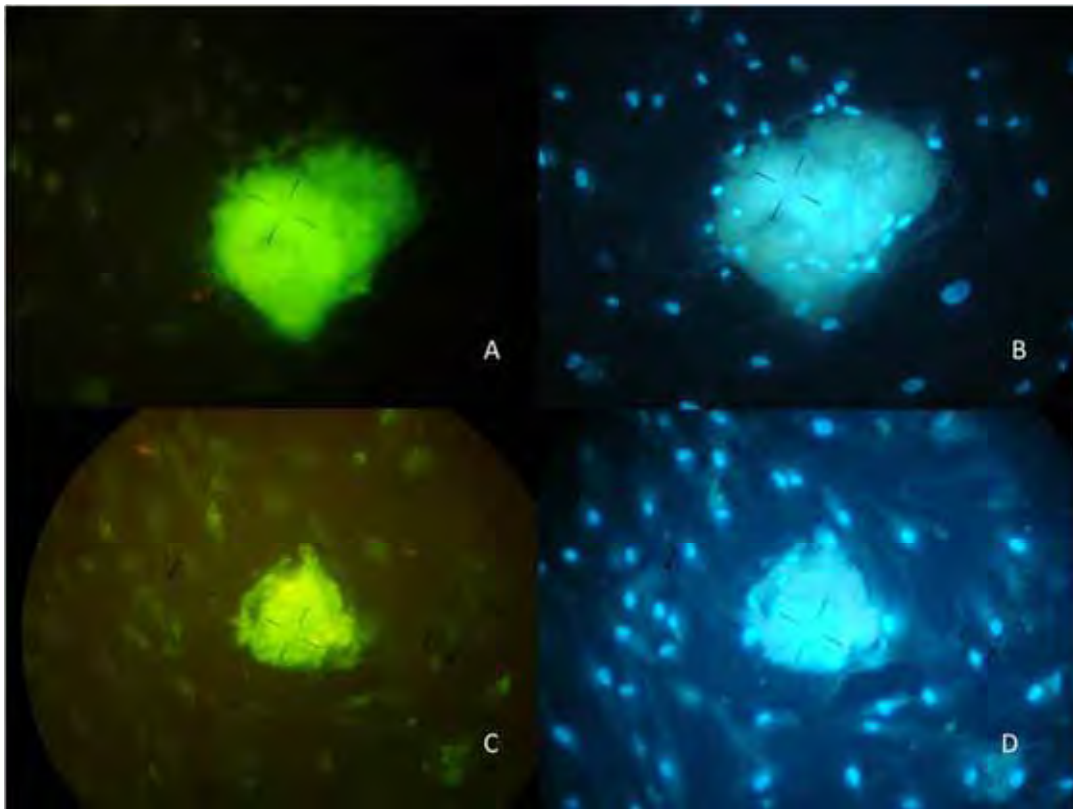


Figura 5. Imunomarcaco de vimentina e citoqueratina. A e B: Marcaco positiva de vimentina, C e D: marcaco positiva de citoqueratina. Microscópio invertido 200x.

DISCUSSÃO:

As células tronco embrionárias são células pluripotentes originadas da MCI e do epiblasto de blastocistos e possuem a capacidade de se multiplicar infinitamente in vitro, mantendo o cariótipo estável e normal sendo aptas a se diferenciar em qualquer tipo de células dos três folhetos embrionários, endoderme, ectoderme e mesoderme (FRIEL et al. 2005, Yu et al. 2006). Estas células estão bem descritas em camundongos e humanos, mas em animais domésticos sua caracterizaco ainda não está bem definida.

No presente experimento MCI de blastocistos bovinos foram cultivadas in vitro em presença de LIF e bFGF com o objetivo de isolar células semelhantes a CTE. Para comprovao das linhagens celulares, os embriões e as colônias em cultivos foram submetidos a marcaco imunocitoquimica com diversos marcadores de pluripotencia.

Os resultados demonstraram que a presença da LIF foi fundamental para o desenvolvimento das colônias de células semelhantes a CTE in vitro. O aspecto morfológico das colônias diferiu do descrito para camundongos, mas foi semelhante ao observado em colônias de células semelhantes a CTE de humanos e eqüinos (LI et al.,

2006). A LIF é uma glicoproteína solúvel, que atua na heterodimerização dos receptores LIFR, o que resulta na ativação das vias de sinalização intracelular JAK-STAT e ERK2 as quais promovem a translocação nuclear e a ativação dos fatores de transcrição STAT3 e STAT1, responsáveis por manter a renovação nas células embrionárias mediando a ativação mitótica da proteína kinase (MAPK) (MATSUDA et al. 1999; DAVEY et al., 2007).

Estudos demonstraram que células da MCI de blastocistos bovinos apresentam receptores para LIF (KEEFER et al. 2007). No entanto, Vejlsted et al. (2005) demonstraram um efeito deletério da adição de LIF ao cultivo de CTE bovinas. Estes resultados não foram confirmados no presente estudo, onde as colônias de células semelhantes a CTE somente se desenvolveram em presença de LIF.

Em murinos o bFGF, EGF e IGFs suprimem a diferenciação de CTE, sendo que este efeito aparentemente não foi observado em humanos (PRELLE et al., 1994). O bFGF atua sinergicamente com a LIF na ativação da sinalização das kinases ERK1/2 (LIU *et al.*, 2007). Entretanto, no presente experimento não se observou alteração no padrão de crescimento, e ou morfologia das células cultivadas em presença ou ausência do bFGF. Cai *et al.*, 2006, visando detectar pequenas alterações de diferenciação em culturas de CTE humanas removeram bFGF por um período de três dias e, por imunocitoquímica para marcação de CTE, não detectando qualquer diferença em células tratadas com bFGF relacionadas às culturas em que o bFGF foi retirado.

O estudo da biologia molecular e celular do desenvolvimento embrionário inicial propõe desafios, tais como produzir células-tronco derivadas do embrião, mantê-las em estado indiferenciado ou mesmo dirigi-las para sofrer diferenciação em linhagens extra-embrionárias ou somáticas *in vitro*. As células-tronco embrionárias bovinas descritas aqui satisfazem alguns dos critérios utilizados para definir células-tronco embrionárias. Estes incluem a apresentação de marcadores conhecidos para identificar as CTE. No entanto existem diferenças entre as espécies quanto a expressão destes marcadores. Neste sentido, o presente estudo, tentou desvendar a expressão de um painel de pluripotência a partir de antígenos de superfície relacionados, que inclui os oligossacarídeos (SSEA-1), glicolipídeos (SSEA-3 e SSEA-4) e glicoproteínas (TRA-1-60 e TRA-1-81), Oct-4 e Nanog.

Em seres humanos e primatas, o SSEA-3 e SSEA -4 mas não SSEA-1 são expressos nas CTE (DRAPER *et al.*, 2002; WOLF *et al.*, 2004) e MCI mas não no

trofocotoderma e mórulas e (HENDERSON *et al.*, 2002). Este padrão contrasta com o observado no camundongo, onde o SSEA-1 é expresso mas não o SSEA-3 e 4 SSEA em CTE e MCI (HENDERSON *et al.*, 2002). Embora SSEA-3 e SSEA-4 sejam expressos em oócitos não fertilizados e embriões de clivagem iniciais, sua expressão desaparece durante o desenvolvimento embrionário.

Já em embriões equinos ocorre a expressão do SSEA-1, SSEA-3 e SSEA-4 tanto na MCIs como no trofoblasto. No entanto, as CTE expressaram somente o SSEA-1 e o SSEA-4 (GUEST AND ALLEN *et al.*, 2007). Sritanaudomchai *et al.* (2007) relatou uma forte expressão do SSEA-4, fraca do SSEA-1 assim como ausência de expressão do SSEA-3 em CTE de embriões bubalinos produzidos partenogeneticamente. Por outro lado, Huang *et al.* (2010) relatou uma expressão dos três marcadores SSEA em embriões PIV de búfalo.

Em ovinos, todos os três marcadores, SSEA-1, SSEA-3 e SSEA-4 têm sido relatada em CTE (ZHAO *et al.*, 2011), e em búfalos, Anand *et al.*, 2011 não encontraram expressão de SSEA-1 e SSEA-3 mas sim uma forte expressão de SSEA-4 em células-tronco embrionárias. Todos estes resultados diferem dos encontrados no presente experimento, onde foi observada a expressão do SSEA-3 e do TRA-1-81 tanto em blastocistos como em CTE bovinas, mas não do TRA-1-60 e do SSEA-1 e do SSEA-4.

A rede de transcrição Oct4 e Nanog regula a pluripotência em células-tronco embrionárias de camundongo. Segundo Loh *et al.* (2006), tais pesquisadores avaliaram a cascata de regulação desses dois genes durante o cultivo *in vitro* das CTE, e encontraram grande expressão destes fatores em embriões nas primeiras semanas de vida. O Oct4 e o Nanog são fatores de transcrição necessários para manter a pluripotência e auto-renovação das células-tronco embrionárias em geral. A expressão de Oct-4 é considerada um marco fundamental para a identificação de células pluripotentes do rato. O Oct-4 é expresso em células pluripotentes durante as clivagens, na massa celular interna, no epiblasto no início da fase pós-implantação do embrião, e em células-tronco embrionárias em cultivo (PESCE e SCHOLER, 2001; YEOM *et al.*, 1991; PALMIERI *et al.*, 1994).

Por meio da imunohistoquímica, a expressão do OCT4 foi estudada em blastocistos produzidos *in vitro* e *in vivo* nas espécies murina, suína e bovina. Em camundongos, a expressão do OCT 4 foi restrita à MCI, enquanto em suínos (7 dias

após a fertilização) e bovinos (8 dias após a fertilização) sua expressão foi observada tanto na MCI quanto no trofotoderma, não havendo diferenças entre embriões produzidos *in vitro* e *in vivo* (KIRCHHOF et al., 2000). Esses dados corroboram com os encontrados por He et al. (2006), segundo os quais houve expressão de OCT4 na MCI e trofotoderma de blastocistos caprinos produzidos *in vivo*. O mesmo foi observado no presente experimento onde tanto o OCT4 quanto o NANOG foram observados na MCI e no trofoblasto dos embriões bovinos produzidos *in vitro*, além de serem expressos também pelas colônias de células semelhantes a células tronco embrionárias.

Quando retirou-se a LIF do cultivo *in vitro* das colônias de células semelhantes a CTE bovinas observou-se a expressão de vimentina, α -fetoproteína e citoqueratina. O trofotoderma é específico de blastômeros pluripotentes em algum momento anterior à formação do blastocisto. Recentemente, as células-tronco embrionárias humanas têm sido empregadas para estudar esses eventos da formação do trofotoderma, e logo dos anexos embrionários em uma situação *in vitro* (SCHULZ et al, 2008). No presente experimento a imunomarcagem por citoqueratina que marca a presença de células do trofotoderma foi obtida também em colônias primárias e tal resultado é totalmente explicável, pois ao remover-se a massa celular interna do blastocisto, algumas células do trofotoderma são também extraídas e cultivadas junto com as CTE, resultados semelhantes foram encontrados por Adachi et al. (2010).

Dubois-Dauphin et al. (2010) propuseram a engenharia tecidual de nervos. Células progenitoras neurais derivadas de CTE de camundongo foram geradas por indução de células estromais, a linhagem expressou astrócitos neuronais maduros, marcadores de mielina e citoqueratina. Os neurônios eram de linhagens glutabérgica e gabaérgica. Este tecido nervoso espacialmente foi organizado em camadas específicas parecida com o tecido nervoso do cérebro sub-ependimial e foi mantido *in vitro* para pelo menos 3,5 meses com grande estabilidade.

Cai et al. (2007) encontraram a presença de α -fetoproteína em células derivadas de células-tronco embrionárias humanas após diferenciação para hepatócitos, demonstrando que as células-tronco possuem a potencialidade para se tornarem células da camada mesodérmica. No presente experimento, a indução da diferenciação celular ocorreu de forma natural, devido à manipulação acentuada *in vitro* dos blastocistos e CTE. Porém, as células mantiveram seu potencial de diferenciação.

CONCLUSÃO

As colônias de CTE bovinas obtidas no presente experimento são dependentes da LIF mas não do bFGF para proliferarem. Os marcadores de pluripotência utilizados não se mostraram específicos para células-tronco embrionárias, pois se apresentaram expressos tanto pelas células do trofoblasto como da MCI dos embriões.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADACH, K.; SUEMORI, H.; YASUDA, S.; NAKATSUJI, N.; KAWASE, E. Role of SOX2 in maintaining pluripotency of human embryonic stem cells. **Genes Cells**, v.15, p.455-470, 2010.

ANAND, T.; KUMAR, D.; SINGH, M.K.; SHAH, R.A.; CHAUHAN, M.S.; MANIK, R.S.; SINGLA, S.K.; PALTA, P. Buffalo (*Bubalus bubalis*) embryonic stem cell-like cells and preimplantation embryos exhibit comparable expression of pluripotency-related antigens. **Reprod. Domest. Anim.**, v.46, p.50-58, 2011.

BEHBOODI, E.; BONDAREVA1, A.; BEGIN, I.; RAO, K.; NEVEU, N.; PIERSON, J.T.; WYLIE, C.; PIERO, F.D.; HUANG, Y.J.; ZENG, W.; TANCO1, V.; BALDASSARRE, H.; KARATZAS, C.N.; DOBRINSKI, I. Establishment of goat embryonic stem cells from in vivo produced blastocyst-stage embryos. **Mol. Reprod. Dev.**, v.78, p.202-211, 2011.

CAI, J.; CHEN, J.; LIU, Y.; MIURA, T.; LUO, Y.; LORING, J.F.; FREED, W.J.; RAO, M.S.; ZENG, X. Assessing self-renewal and differentiation in hESC lines. **Stem Cells**, v.24, s.3, p.516–530, 2006.

CAI, J.; ZHAO, Y.; LIU, Y.; YE, F.; SONG, Z.; QIN, H.; MENG, S.; CHEN, Y.; ZHOU, R.; SONG, X.; GUO, Y.; DING, M.; DENG, H. Directed differentiation of human embryonic stem cells into functional hepatic cells. **Hepatology**, v.45, p.1229-1239, 2007.

DAVEY, M. G.; JAMES, J.; PATON, I. R.; BURT, D. W.; TICKLE, C. Analysis of *talpid3* and wild-type chicken embryos reveals roles for Hedgehog signaling in development of the limb bud vasculature. **Dev Biol**, v. 301, p.155-165, 2007.

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

DRAPER, J.S.; SMITH, K.; GOKHALE, P.; MOORE, H.D.; MALTBY, E.; JOHNSON, J.; MEISNER, L.; ZWAKA, T.P.; THOMSON, J.A.; ANDREWS, P.W. Recurrent gain of chromosomes 17q and 12 in cultured human embryonic stem cells. **Nat. Biotechnol.**, v.22, p.53-54, 2004.

DUBOIS-DAUPHINA, M.L.; TONIB, N.; JULIENA, S.D.; CHARVETD, I.; SUNDSTROMC, L.E.; STOPPINID, L. The long-term survival of in vitro engineered nervous tissue derived from the specific neural differentiation of mouse embryonicstemcells. **Biomaterials**, v.31, n.2, p.7032-7042, 2010.

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

GJORRET, J.O.; MADDOX-HYTTEL, P. Attempts towards derivation and establishment of bovine embryonic stem cell like cultures. **Reprod. Fertil. Dev.**, v.17, p.113-124, 2005.

GUEST, D.J.; ALLEN, W.R. Expression of cell-surface antigens and embryonic stem cell lines from the proliferation of inner cell mass cells. **Stem Cells Dev.**, v.16, p.789-796, 2007.

HE, S.; PANT, D.; SCHIFFMACHER, A.; BISCHOFF, S.; MELICAN, D.; GAVIN, W.; KEEFER, C. Developmental expression of pluripotency determining factors in caprine embryos: novel pattern of NANOG protein localization in the nucleolus. **Mol. Reprod. Dev.**, v.73, p.1512-1522, 2006.

HENDERSON, J.K.; DRAPER, J.S.; BAILLIE, H.S.; FISHEL, S.; THOMSON, J.A.; MOORE, H.; ANDREWS, P.W. Preimplantation human embryos and embryonic stem cells show comparable expression of stage-specific embryonic antigens. **Stem Cells**, v.20, p.329-337, 2002.

HUANG, B.; LI, T.; WANG, X-L.;1, XIE1, T-S.; LU, Y-Q.; DA SILVA, F.M.; SHI, D-S. Generation and Characterization of Embryonic Stem-Like Cell Lines Derived from In Vitro Fertilization Buffalo (*Bubalus bubalis*) Embryos. *Reprod Dom Anim*, v.45, s.1, p.122–128, 2010.

HWANG, W.S.; RYU, Y.J.; PARK, J.H.; PARK, E.S.; LEE, E.G.; KOO, J.M.; JEON, H.Y.; LEE, B.C.; KANG, S.K.; KIM, S.J.; AHN, C.; HWANG, J.H.; PARK, K.Y.; CIBELLI, I.B.; MOON, S.Y. Evidence of a pluripotent human embryonic stem cell line derived from a cloned blastocyst. **Science**, v.303, n.5664, p.1669-1674, 2004.

KEEFER, C.L.; PANT, D.; BLOMBERG, N.C.; TALBOT, N.C. Challenges and prospects for the establishment of embryonic stem cell lines of domesticated ungulates. **Anim Reprod Sci**, v. 98, p. 147-168, 2007.

KIRCHOFF, N.; CARNWATH, J. W.; LEMME, E.; anastassiadis, k.; scholer, h.; niemann, h. Expression patern of Oct-4 in preimplantation embryos of different species. **Biol Reprod**, v. 63, p. 1698-1705, 2000.

LEE, K.W.; MA, L.; YAN, X.; LIU, B.; ZHANG, X.K.; COHEN, P. Rapid apoptosis induction by IGFBP-3 involves an insulin-like growth factor-independent nucleomitochondrial translocation of RXRalpha/Nur77. **J. Biol. Chem.**, v.280, p.16942-16948, 2005.

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

LIU, X.; WU, X.; CAI, L.; SUN, S.; LIU, F. bFGF-induced angiogenesis in ischemic myocardium is associated with calreticulin downregulation **J. Mol Cell Cardio**, v.42, s.1, p.S222, 2007.

LOH, Y.H.; WU, Q.; CHEW, J-L.; VEGA, V.B.; ZHANG, W.; CHEN, X.;1, 2, BOURQUE, G.; GEORGE, J.; LEONG, B.; LIU, J.; WONG, K.Y.; SUNG, K.W.; LEE, C.W.; ZHAO, X.D.; CHIU, K.P.; LIPOVICH, L.; KUZNETSOV, V.A.; ROBSON, P.; STANTON, L.W.; WEI, C.L.; RUAN, Y.; LIM, B.; NG, H.H. The Oct4 and Nanog transcription network regulates pluripotency in mouse embryonic stem cells. **Nat. Genet.**, v.38, p.431-440, 2006.

MATSUDA, T.; NAKAMURA, T.; NAKAO, K.; ARAI, T.; KATSUKI, M.; HEIKE, T.; YOKOTA, T. STAT 3 activation is sufficient to maintain an undifferentiated state of mouse embryonic stem cells. **Euro Mol Biol Org J**, v. 18, p. 4261-4269, 1999.

PALMIERI, S.L.; PETER, W.; HESS, H.; SHOLER, H.R. Oct4 transcription factor is differently expressed in the mouse embryo during establishment of the first two extraembryonic cell lineages involved in implantation. **Dev Biol**, v. 166, p. 259-267, 1994.

PASHAIASL, M.; KHODADADI, K.; HOLLAND, M.K.; VERMA, P.J. The efficient generation of cell lines from bovine parthenotes. **Cell Reprog.**, v.12, p.571-579, 2010.

PESCE, M.; SCHOLER, H.R. Oct-4: gatekeeper in the beginnings of mammalian development. **Stem Cells**, v.19, p. 271-278, 2001.

PRELLE, K.; WOBUS, A.M.; WOLF, E.; NEUBERT, N.; HOLTZ, W. Effects of growth factors on the in vitro development of porcine inner cell masses isolated by calcium ionophore. **J. Reprod. Fertil.**, v.13, p.41, 1994.

SCHULZ, L.C.; EZASHI, T.; DAS, P.; WESTFALL, S.D.; LIVINGSTON, K.A.; ROBERTS, R.M. Human embryonic stem cells as models for trophoblast differentiation. **Placenta**, v.29A, p.S10-S16, 2008.

SRITANAUDOMCHAI, H.; PAVASUTHIPAISIT, K.; KITIYANANT, Y.; KUPRADINUN, P.; MITALIPOV, S.; KUSAMRAN, T. Characterization and multilineage differentiation of embryonic stem cells derived from a buffalo parthenogenetic embryo. **Mol. Reprod. Dev.**, v.74, p.1295-1302, 2007.

VEJLSTED, M.; AVERY, B.; SCHMIDT, M.; GREVE, T.; ALEXOPOULOS, N.; MADDOX-HYTTEL, P. Ultrastructural and immunohistochemical characterization of the bovine epiblast. **Biol. Reprod.**, v.72, p. 678-686, 2005.

VERMA, V.; GAUTAM, S.K.; SINGH, B.; MANIK, R.S.; PALTA, P.; SINGLA, S.K.; GOSWAMI, S.L.; CHAUHAN, M.S. Isolation and characterization of embryonic stem cell-like cells from in vitro produced buffalo (*Bubalus bubalis*) embryos. **Mol. Reprod. Dev.**, v.74, p.520-529, 2007.

WOLF, D.P.; KUO, H.C.; PAU, K.Y. Progress with nonhuman primate embryonic stem cells. **Biol. Reprod.**, v.71, p.1766-1771, 2004.

WONG, RC-B.; IBRAHIM, A.; FONG, H.; THOMPSON, N.; LOCK, L.F. L1TD1 Is a Marker for Undifferentiated Human Embryonic Stem Cells. **PLoS One**, v.6, p.e19355, 2011.

YADAV, P.S.; KUES, W.A.; HERRMANN, D.; CARNWATH, J.W.; NIEMANN, H. Bovine ICM derived cells express the Oct4 ortholog. **Mol. Reprod. Dev.**, v.72, p.182-190, 2005.

YEOM, Y.I.; HA, H.S.; BALLING, R.; SCHOLER, H.R.; ARTZT, K. Structure, expression, and chromosomal location of the Oct-4 gene. **Mech Dev**, v.35,p. 171-179, 1991.

ZHAO, Y.; LIN, J.; WANG, L.; CHEN, B.; ZHOU, C.; CHEN, T.; GUO, M.; HE, S.; ZHANG, N.; LIU, C.; LIU, M.; HUANG, J. Derivation and characterization of ovine embryonic stem-like cell lines in semi-defined medium without feeder cells. **J. Exp. Zool.**, v.315, p.639-648, 2011.

***REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA INTRODUÇÃO
GERAL***

- ABRANCHES, E.; BEKMAN, E.; HENRIQUE, D.; CABRAL, J.M.S. Expansion of mouse embryonic stem cells on microcarriers. **Biotechnol. Bioeng.**, v.96, p.1211-1222, 2007.
- ACQUISTAPACE, A.; BRU, T.; LESAULT, P.F.; FIGEAC, F.; COUDERT, A.E.; LE COZ, O.; CHRISTOV, C.; BAUDIN, X.; AUBER, F.; YIOU, R.; DUBOIS-RANDÉ, J.L.; RODRIGUEZ, A.M. Human mesenchymal stem cells reprogram adult cardiomyocytes toward a progenitor-like state through partial cell fusion and mitochondria transfer. **Stem Cell**, v.29, p.812-824, 2011.
- ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J.D. **Biologia molecular da célula**. 3.ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 2009. 1268p.
- ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Biologia molecular da célula**. 5.ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. p.1-194.
- ALVAREZ-BUYLLA, A.; SERI, B.; DOETSCH, F. Identification of neural stem cells in the adult vertebrate brain. **Brain Res. Bull**, v.57, p.751-758, 2002.
- AMIT, M.; ITSKOVITZ-ELDOR, J. Derivation and spontaneous differentiation of human embryonic stem cell. **J. Anat.**, v.200, p.225-232, 2002.
- BASTOS, C.V.; VASCONCELOS, M.M.C.; RIBEIRO, M.F.B.; PASSOS, L.M.F. In vitro maintenance of IDE8 cells using two types of bovine serum. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.59, p.543-546, 2007.
- BAUTCH, V.L.; STANFORD, W.L.; RAPOPORT, R.; RUSSELL, S.; BYRUM, R.S.; FUTCH, T.A. Blood island formation in attached cultures of murine embryonic stem cells. **Dev. Dyn.**, v.205, p.1-12, 1996.
- BJORNSON, C.R.; RIETZE, R.L.; REYNOLDS, B.A.; MAGLI, M.C.; VESCOVI, A.L. Turning brain into blood: a hematopoietic fate adopted by adult neural stem cells in vivo. **Science**, v.283, p.534-537, 1999.
- BONILLA, S.; SILVA, A.; VALDÉS, L.; GEIJO, E.; GARCÍA-VERDUGO, J.M.; MARTÍNEZ, S. Functional neural stem cells derived from adult bone marrow. **Neuroscience**, v.133, p.85-95, 2005.
- BOULANGER, L.M.; SHATZ, C.J. Immune signalling in neural development, synaptic plasticity and disease. **Nat. Neurosci.**, v.5, p.521-531, 2004.
- BRADLEY, A.; EVANS, M.; KAUFFMANN, M.; ROBERTSON, E. Formation of germ-like embryo-derived teratocarcinoma cell lines. **Nature**, v.309, p.255-256, 1984.
- BRUM, D.S.; LEIVAS, F.G.; BERNARDI, M.L.; MOZZAQUATRO, F.D.; SILVA, C.A.M.; RUBIN, M.I.B. Cultivo de embriões bovinos produzidos in vitro: efeito do número de embriões e da proporção de meio. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, v.43, p.145-151, 2006.
- BRYJA, V.; BONILLA, S.; ARENAS, E. Derivation of mouse embryonic stem cells. **Nat. Protoc.**, v.1, p.2082-2087, 2006.

- CAMPBELL, K.H.; MCWHIR, J.; RITCHI, W.A.; WILMUT, I. Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line. **Nature**, v.380, p.64-66, 1996.
- CAROLAN, C.; LONERGAN, P.; VAN LANGENONCKT, A.; MERMILLOD, P. Factors affecting bovine embryo development in synthetic oviduct fluid following oocyte maturation and fertilization in vitro. **Theriogenology**, v.43, p.1115-1128; 1995.
- 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.643-655, 2003.
- DISCHER, D.E.; MOONEY, D.J.; ZANDSTRA, P.W. Growth factors, matrices, and forces combine and control stem cells. **Science**, v.324, p.1673-1677, 2009.
- DOETSCHMAN, T.; WILLIAMS, P.; MAEDA, N. Establishment of hamster blastocyst-derived embryonic stem (ES) cells. **Dev. Biol.**, v.127, p.224-227, 1988.
- ERIKSSON, P.S.; PERFILIEVA, E.; BJORK-ERIKSSON, T.; ALBORN, A.M.; NORDBORG, C.; PETERSON, D.A.; GAGE, F.H. Neurogenesis in the adult human hippocampus. **Nat. Med.**, v.4, p.1313-1317, 1998.
- EVANS, M.J.; KAUFMAN, M.H. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. **Nature**, v.292, p.154-156, 1981.
- EVANS, M.J.; NOTARRIANI, E.; LAURIE, S.; MOOR, R.M. Derivation and preliminary characterization of pluripotent cell lines from porcine and bovine blastocysts. **Theriogenology**, v.33, p.125-128, 1990.
- FALLON, J.; REID, S.; KINYAMU, R.; OPOLE, I.; OPOLE, R.; BARATTA, J.; KORC, M.; ENDO, T.L.; DUONG, A.; NGUYEN, G.; KARKEHABADHI, M.; TWARDZIK, D.; LOUGHLIN, S. In vivo induction of massive proliferation, directed migration, and differentiation of neural cells in the adult mammalian brain. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.97, p.14686-14691, 2000.
- FERNANDES, A.M.; MARINHO, P.A.; SARTORE, R.C.; PAULSEN, B.S.; MARIANTE, R.M.; CASTILHO, L.R. Successful scale-up of human embryonic stem cell production in a stirred microcarrier culture system. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v.42, p.515-522, 2009.
- FERRARI, G.; CUSELLA-DEANGELIS, G.; COLETTA, M.; PAOLUCCI, E.; STORNAIUOLO, A.; COSSU, G.; MAVILIO, F. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic precursors. **Science**, v.279, p.1528-1530, 1998.
- FOK, E.Y.L.; ZANDSTRA, P.W. Shear-controlled single-step mouse embryonic stem cell expansion and embryoid body-based differentiation. **Stem Cells**, v.23, p.1333-1342, 2005.
- FRAICHARD, A.; CHASSANDE, O.; BILBAUT, G.; DEHAY, C.; SAVATIER, P.; SAMARUT, J. In vitro differentiation of embryonic stem cells into glial cells and functional neurons. **J. Cell Sci.**, v.108, p.3181-3188, 1995.

- FRESHNEY, R.I. **Culture of animal cells: a manual of basic technique and specialized applications**. 6.ed. New York: John Wiley & Sons, 2010. 768p.
- FUKUI, Y.; KIKUCHI, Y.; KONDO, H.; MIZUSHIMA, S. Fertilizability and developmental capacity of individually cultured bovine oocytes. **Theriogenology**, v.53, p.1553-1565, 2000.
- GARFIELD, A.S. Derivation of primary mouse embryonic fibroblast (PMEF) cultures. **Methods Mol. Biol.**, v.633, p.19-27, 2010.
- GEARHART, J. New potential for human embryonic stem cells. **Science**, v.6, p.1061-1062, 1998.
- GILBERT, S.F. **Developmental biology**. 6.ed. Sunderland (MA): Sinauer Associates, 2010. 711p.
- GONÇALVES, P.B.D.; BARRETA, M.H.; SIQUEIRA, L.C.; ANTONIAZZI, A.Q. Biotecnologias da reprodução animal produção in vitro de embriões bovinos. **Ciênc. Vet. Trop.**, v.11, p.135-138, 2008.
- GRAVES, K.H.; MOREADITH, R.W. Derivation and characterization of putative pluripotential embryonic stem cells from preimplantation rabbit embryos. **Mol. Reprod. Dev.**, v.36, p.424-433, 1993.
- GUTIÉRREZ-ADÁN, A.; LONERGAN, P.; RIZOS, D.; WARD, F.A.; BOLAND, M.P.; PINTADO, B.; DE LA FUENTE, J. Effect of the in vitro culture system on the kinetics of blastocyst development and sex ratio of bovine embryos. **Theriogenology**, v.55, p.1117-1126, 2001.
- HEARD, E.; MONGELARD, F.; ARNAUD, D.; CHUREAU, C.; VOURC'H, C.; AVNER, P. Human XIST yeast artificial chromosome transgenes show partial X inactivation center function in mouse embryonic stem cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.96, p.6841-6846, 1999.
- HOCHEDLINGER, K.; YAMADA, Y.; BEARD, C.; JAENISCH, R. Ectopic expression of Oct-4 blocks progenitor-cell differentiation and causes dysplasia in epithelial tissues. **Cell**, v.121, p.465-477, 2005.
- HOFFMAN, L.M.; CARPENTER, M.K. Characterization and culture of human embryonic stem cells. **Nat. Biotechnol.**, v.23, p.699-708, 2005.
- HU, Q.; FRIEDRICH, A.M.; JOHNSON, L.V.; CLEGG, D.O. Memory in induced pluripotent stem cells: reprogrammed human retinal-pigmented epithelial cells show tendency for spontaneous redifferentiation. **Stem Cells**, v.28, p.1981-1991, 2010.
- HUANG, B.; LI, T.; WANG, X.L.; XIE, T.S.; LU, Y.Q.; DA SILVA, F.M.; SHI, D.S. Generation and characterization of embryonic stem-like cell lines derived from in vitro fertilization Buffalo (*Bubalus bubalis*) embryos. **Reprod. Domest. Anim.**, v.45, p.122-128, 2010.
- HWANG, W.S.; RYU, Y.J.; PARK, J.H.; PARK, E.S.; LEE, E.G.; KOO, J.M.; JEON, H.Y.; LEE, B.C.; KANG, S.K.; KIM, S.J.; AHN, C.; HWANG, J.H.; PARK, K.Y.;

- CIBELLI, I.B.; MOON, S.Y. Evidence of a pluripotent human embryonic stem cell line derived from a cloned blastocyst. **Science**, v.303, n.5664, p.1669-1674, 2004.
- HWANG, Y.S.; KANG, Y.; MANTALARIS, A. Directing embryonic stem cell differentiation into osteogenic/chondrogenic lineage in vitro. **Biotechnol. Bioprocess Eng.**, v.12, p.15-21, 2007.
- IANNACCONI, P.M.; TABORN, G.U.; GARTON, R.L.; CAPLICE, M.D.; BRENIN, D.R. Pluripotent embryonic stem cells from rat are capable of producing chimeras. **Dev. Biol.**, v.163, p.288-292, 1994.
- ITO, A.; HAYASHIDA, M.; HONDA, H.; HATA, K.; KAGAMI, H.; UEDA, M.; KOBAYASHI, T. Construction and harvest of multilayered keratinocyte sheets using magnetite nanoparticles and magnetic force. **Tissue Eng.**, v.10, p.873-880, 2004.
- ITSKOVITZ-ELDOR, J.; SCHULDINER, M.; KARSENTI, D.; EDEN, A.; YANUKA, O.; AMIT, M.; SOREQ, H.; BENVENISTY, N. Differentiation of human embryonic stem cells into embryoid bodies compromising the three embryonic germ layers. **Mol. Med.**, v.6, p.88-95, 2000.
- JUNQUEIRA, L.C.U.; CARNEIRO, J. **Biologia celular e molecular**. 6.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005. 302p.
- KAWAHARA, Y.; MANABE, T.; MATSUMOTO, M.; KAJIUME, T.; MATSUMOTO, M. LIF-Free embryonic stem cell culture in simulated microgravity. **PLoS One**, v.4, p.e6343, 2009.
- KEEFER, C.L.; PANT, D.; BLOMBERG, N.C.; TALBOT, N.C. Challenges and prospects for the establishment of embryonic stem cell lines of domesticated ungulates. **Anim. Reprod. Sci.**, v.98, p.147-168, 2007.
- KELLER, G.M. In vitro differentiation of embryonic stem cells. **Curr. Opin. Cell Biol.**, v.7, p.862-869, 1995.
- KELLY, S.; BLISS, T.M.; SHAH, A.K.; SUN, G.H.; MA, M.; FOO, W.C.; MASEL, J.; YENAN, M.A.; WEISSMAN, I.L.; UCHIDA, N.; PALMER, T.; STEINBERG, G.K. Transplanted human fetal neural stem cells survive, migrate, and differentiate in ischemic rat cerebral cortex. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.101, p.11839-11844, 2004.
- KEMPERMAN, G.; WISKOTT, L.; GAGE, F.H. Functional significance of adult neurogenesis. **Curr. Opin. Neurobiol.**, v.14, p.186-191, 2004.
- KERR, D.A.; LIADO, J.; SHAMBLOTT, M.J.; MARAGAKIS, N.J.; IRANI, D.N.; CRAWFORD, T.O.; KRISHNAN, C.; DIKE, S.; GEARHART, J.D.; ROTHSTEIN, J.D. Human embryonic cell derivatives facilitate motor recovery of rats with diffuse motor neuron injury. **J. Neurosci.**, v.23, p.5131-5140, 2003.
- KRISHER, R.L.; LANE, M.; BAVISTER, B.D. Developmental competence and metabolism of bovine embryos cultured in semi-defined and defined culture media. **Biol. Reprod.**, v.60, p.1345-1352, 1999.

KUHN, N.Z.; TUAN, R.S. Regulation of stemness and stem cell niche of mesenchymal stem cells: implications in tumorigenesis and metastasis. **J. Cell Physiol.**, v.222, p.268-277, 2010.

LEE, H.S.; CRANE, G.G.; MEROK, J.R.; TUNSTEAD, J.R.; HATCH, N.L.; PANCHALINGAM, K.; POWERS, M.J.; GRIFFITH, L.G.; SHERLEY, J.L. Clonal expansion of adult rat hepatic stem cell lines by suppression of asymmetric cell kinetics (SACK). **Biotechnol. Bioeng.**, v.83, p.760-771, 2003.

LEE, K.W.; LIU, B.; MA, L.; LI, H.; BANG, P.; KOEFFLER, H.P.; COHEN, P. Cellular internalization of insulin-like growth factor binding protein-3: distinct endocytic pathways facilitate re-uptake and nuclear localization. **J. Biol. Chem.**, v.279, p.469-476, 2004.

LEE, K.W.; MA, L.; YAN, X.; LIU, B.; ZHANG, X.K.; CON, P. Rapid apoptosis induction by IGFBP-3 involves an insulin-like growth factor-independent nucleomitochondrial translocation of RXRalpha/Nur77. **J. Biol. Chem.**, v.280, p.16942-16948, 2005.

LI, L.; CLEVERS, H. Coexistence of quiescent and active adult stem cells in mammals. **Science**, v.327, p.542-545, 2010.

LIN, H. To be and not to be. **Nature**, v.425, p.353-355, 2003.

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

MANI, S.A.; GUO, W.; LIAO, M.J.; EATON, E.N.; AYYANAN, A.; ZHOU, A.Y.; BROOKS, M.; REINHARD, F.; ZHANG, C.C.; SHIPITSIN, M.; CAMPBELL, L.L.; POLYAK, K.; BRISKEN, C.; YANG, J.; WEINBERG, R.A. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. **Cell**, v.133, p.704-715, 2008.

MARTIN, G.R. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in médium conditioned by teratocarcinoma stem cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.78, p.7634-7638, 1981.

MCKIERNAN, S.H.; BAVISTER, B.D. Different lots of bovine serum albumin inhibit or stimulate in vitro development of hamster embryos. **In Vitro Cell Dev. Biol.**, v.28A, p.154-156, 1992.

MINGOTI, G.Z.; CASTRO, V.S.; MÉO, S.C.; SÁ BARRETTO, L.S.; GARCIA, J.M. The effects of macromolecular and serum supplements and oxygen tension during bovine in vitro procedures on kinetics of oocyte maturation and embryo development. **In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.**, v.47, p.361-367, 2011.

MINGUELL, J.J.; CONGET, P.; ERICES, A. Biology and clinical utilization of mesenchymal progenitor cells. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v.33, p.881-887, 2000.

MITSUI, K.; TOKUZAWA, Y.; ITOH, H.; SEGAWA, K.; MURAKAMI, M.; TAKAHASHI, K.; MARUYAMA, M.; MAEDA, M.; YAMANAKA, S. The

homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. **Cell**, v.113, p.631-642, 2003.

MUÑOZ, M.; DIEZ, C.; CAAMAÑO, J.N.; JOUNEAU, A.; HUE, I.; GÓMEZ, E. Embryonic stem cells in cattle. **Reprod. Domest. Anim.**, v.43, p.32-37, 2008b.

MUÑOZ-ELIAS, G.; MARCUS, A.J.; COYNE, T.M.; WOODBURY, D.; BLACK, I.B. Adult bone marrow stromal cells in the embryonic brain: engraftment, migration, differentiation, and long-term survival. **J. Neurosci.**, v.24, p.4585-4595, 2004.

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

NOTARIANNI, E.; GALLI, C.; LAURIE, S.; MOOR, R.M.; EVANS, M.J. Derivation of pluripotent, embryonic cell lines from the pig and sheep. **J. Reprod. Fertil.**, v.43, p.255-260, 1991.

NUSSBAUM, J.; MINAMI, E.; LAFLAMME, M.A.; VIRAG, J.A.I.; WARE, C.B.; MASINO, A.; MUSKHELI, V.; PABON, L.; REINECKE, H.; MURRY, C.E. Transplantation of undifferentiated murine embryonic stem cells in the heart: teratoma formation and immune response. **FASEB J.**, v.21, p.1345-1357, 2007.

ORLIC, D.; KAJSTURA, J.; CHIMENTI, S.; JAKONIUK, I.; ANDERSON, S.M.; LI, B.; PICKEL, J.; MCKAY, R.; NADAL-GINARD, B.; BODINE, D.M.; LERI, A.; ANVERSA, P. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. **Nature**, v.410, n.6829, p.701-705, 2001.

PARÉ, J.F.; SHERLEY, J.L. Culture environment-induced pluripotency of sack-expanded tissue stem cells. **J. Biomed. Biotechnol.**, p.1-12, 2011.

PETERSEN, B.E.; BOWEN, W.C.; PATRENE, K.D.; MARS, W.M.; SULLIVAN, A.K.; MURASE, N.; BOGGS, S.S.; GREENBERGER, J.S.; GOFF, J.P. Bone marrow as a source of hepatic oval cells. **Science**, v.284, n.5417, p.1168-1170, 1999.

PINYOPUMMINTR, T.; BAVISTER, B.D. In vitro-matured/in vitro-fertilized bovine oocytes can develop into morulae/blastocysts in chemically defined, protein-free culture media. **Biol. Reprod.**, v.45, p.736-742, 1991.

PROCKOP, D.J. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. **Science**, v.276, p.71-74, 1997.

REUBINOFF, B.E.; PERA, M.F.; FONG, C.; TROUNSON, A.; BONGSO, A. Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro. **Nat. Biotechnol.**, v.18, p.399-404, 2000.

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

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

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

SCHÖLER, H.P.; BALLING, R.; HATZOPOULOS, A.K.; SUZUKI, N.; GRUSS, P. A POU-domain transcription factor in early stem cells and germ cells of the mammalian embryo. **Embo J.**, v.8, p.2551-2557, 1984.

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

SCHWARTZ, R.E.; REYES, M.; KOODIE, L.; JIANG, Y.; BLACKSTAD, M.; LUND, T.; LENVIK, T.; JOHNSON, S.; HU, W.S.; VERFAILLIE, C.M. Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells. **J. Clin. Invest.**, v.109, p.1291-1302, 2002.

SCHWINDT, T.T. Polêmica, ética e células-tronco. **Saúde Paul.**, v.14, p.41, 2005.

SHERLEY, J.L. Asymmetric cell kinetics genes: the key to expansion of adult stem cells in culture. **Stem Cells**, v.20, p.561-572, 2002.

SNIPPERT, H.J.; VAN DER FLIER, L.G.; SATO, T.; VAN ES, J.H.; VAN DEN BORN, M.; KROON-VEENBOER, C.; BARKER, N.; KLEIN, A.M.; VAN RHEENEN, J.; SIMONS, B.D.; CLEVERS, H. Intestinal crypt homeostasis results from neutral competition between symmetrically dividing Lgr5 stem cells. **Cell**, v.143, p.134-144, 2010.

SOLTER, D.; KNOWLES, B.B. Monoclonal antibody defining a stage-specific mouse embryonic antigen (SSEA-1). **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.75, p.5565-5569, 1978.

SRITANAUDOMCHAI, H.; PAVASUTHIPAISIT, K.; KITIYANANT, Y.; KUPRADINUN, P.; MITALIPOV, S.; KUSAMRAN, T. Characterization and multilineage differentiation of embryonic stem cells derived from a buffalo parthenogenetic embryo. **Mol. Reprod. Dev.**, v.74, p.1295-1302, 2007.

STRELCHENKO, N. Bovine pluripotent stem cells. **Theriogenology**, v.45, p.131-140, 1996.

SVENDSEN, C.N.; LANGSTON, J.W. Stem cells for parkinson disease and ALS: replacement or protection? **Nat. Med.**, v.10, p.224-225, 2004.

TERADA, N.; NAMAZAKI, T.; OKA, M.; HOKI M, MASTALERZ DM, NAKANO Y, MEYER EM, MOREL L, PETERSEN BE, SCOTT EW. Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. **Nature**, v.416, n.6880, p.542-545, 2002.

- THOMPSON, J.G. In vitro culture and embryo metabolism of cattle and sheep embryos - a decade of achievement. **Anim. Reprod. Sci.**, v.60-61, p.263-275, 2000.
- THOMPSON, J.A.; KALISHMAN, J.; GOLOS, T.G.; DURNING, M.; HARRIS, C.P.; BECKER, R.A.; HEARN, J.P. Isolation of a primate embryonic stem cell line. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.92, p.7844-7848, 1995.
- THOMPSON, J.A.; ITSKOVITZ-ELDOR, J.; SHAPIRO, S.S.; WAKNITZ, M.A.; SWIERGIEL, J.J.; MARSHALL, V.S.; JONES, J.M. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. **Science**, v.282, n.5391, p.1145-1147, 1998.
- TISCORNIA, G.; BELMONTE, J.C.I. Micro RNAs in embryonic stem cell function and fate. **Genes Dev.**, v.24, p.2732-2741, 2010.
- ULLOA-MONTOYA, F.; VERFAILLIE, C.M. HU, W.S. Culture systems for pluripotent stem cells. **J. Biosci. Bioeng.**, v.100, p.12-27, 2005.
- VASSILIEVA, S.; GUAN, K.; PICH, U.; WOBUS, A.M. Establishment of SSEA-1- and Oct-4-Expressing rat embryonic stem-like cell lines and effects of cytokines of the IL-6 family on clonal growth. **Exp. Cell Res.**, v.258, p.361-373, 2000.
- VERFAILLIE, C.M. Adult stem cells: assessing the case for pluripotency. **Trends Cell Biol.**, v.12, p.502-508, 2002.
- VERMA, V.; GAUTAM, S.K.; SINGH, B.; MANIK, R.S.; PALTA, P.; SINGLA, S.K.; GOSWAMI, S.L.; CHAUHAN, M.S. Isolation and characterization of embryonic stem cell-like cells in vitro produced buffalo (*Bubalus bubalis*) embryos. **Mol. Reprod. Dev.**, v.74, p.520-529, 2007.
- VILLAMIL, P.R.; WEI, H.; MOREIRA, G.; CACCIA, M.; TARANCO, M.F.; BÓ, G.A. Fertilization rates and in vitro embryo production using sexed or non-sexed semen selected with a silane-coated silica colloid or Percoll. **Theriogenology**, 2012. Epub ahead of print.
- WAGERS, A.J.; WEISSMAN, I.L. Plasticity of adult stem cells. **Cell**, v.116, p.639-648, 2004.
- WEBSTER, H.L. Colloid osmotic pressure: theoretical aspects and background. **Clin. Perinatol.**, v.9, p.505-521; 1982.
- WHEELER, M.B. Development and validation of swine embryonic stem cells: a review. **Reprod. Fertil. Dev.**, v.6, p.563-568, 1994.
- WOBUS, A.M. Potencial of embryonic stem cells. **Mol. Asp. Med.**, v.22, p.149-164, 2001.
- WOBUS, A.M.; BOHELER, K.R. Embryonic stem cells: prospects for developmental biology and cell therapy. **Physiology**, v.85, p.635-678, 2005.
- WOBUS, A.M.; HOLZHAUSEN, H.; JÄKEL, P.; SCHÖNEICH, J. Characterization of a pluripotent stem cell line derived from a mouse embryo. **Exp. Cell Res.**, v.152, p.212-219, 1984.

WURMSER, A.E.; PALMER, T.D.; GAGE, F.H. Cellular interactions in the stem cell niche. **Science**, v.304, n.5675, p.1253-1255, 2004.

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

ZAGO, M.A.; COVAS, D.T. **Células-tronco: a nova fronteira da Medicina**. Rio de Janeiro: Atheneu, 2006. 263p.

ZUELKE, K.A.; BRACKETT, B.G. Luteinizing hormone-enhanced in vitro maturation of bovine oocytes with and without protein supplementation. **Biol. Reprod.**, v.43, p.784-787, 1990.