

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

ESTABELECIMENTO DA TÉCNICA DE INDUÇÃO DA DIFERENCIAÇÃO
CELULAR *IN VITRO* DE CÉLULAS TRONCO EMBRIONÁRIAS DE
CAMUNDONGOS EM CÉLULAS CARDÍACAS E CÉLULAS NERVOSAS.

ANA HELENA DA ROSA PAZ

Porto Alegre, fevereiro de 2005.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

ESTABELECIMENTO DA TÉCNICA DE INDUÇÃO DA DIFERENCIAÇÃO
CELULAR *IN VITRO* DE CÉLULAS TRONCO EMBRIONÁRIAS DE
CAMUNDONGOS EM CÉLULAS CARDÍACAS E CÉLULAS NERVOSAS.

Ana Helena da Rosa Paz

Dissertação apresentada como requisito
parcial para obtenção do grau de mestre
em Ciências Veterinárias na área de
Biotécnicas da Reprodução
Orientador: Prof. Dra. Elizabeth Cirne Lima

Porto Alegre, fevereiro de 2005.

Ana Helena da Rosa Paz

ESTABELECIMENTO DA TÉCNICA DE INDUÇÃO DA DIFERENCIAÇÃO
CELULAR *IN VITRO* DE CÉLULAS TRONCO EMBRIONÁRIAS DE
CAMUNDONGOS EM CÉLULAS CARDÍACAS E CÉLULAS NERVOSAS

APROVADO POR:

Prof. Dra. Elizabeth Obino Cirne Lima
Orientadora e Presidente da Comissão

Prof. Dr. Eduardo Pandolfi Passos
Membro da Comissão

Prof. Dra. Nadine Oliveira Clausell
Membro da Comissão

Prof. Dr. José Luiz Rodrigues
Membro da Comissão

Ao meu tio João Carlos Olímpio Giudice (*in memoriam*)
que estudou nesta faculdade e despertou em
mim o interesse pela ciência, dedico esta conquista.

AGRADECIMENTOS:

Expresso meus sinceros agradecimentos a Prof. Dra. Elizabeth Obino Cirne Lima, pela orientação acadêmica permanente, pelo apoio decisivo - desde a graduação- e pela oportunidade da realização deste trabalho. Também pela amizade construída em todos estes anos de trabalho conjunto.

A todos os colegas e amigos do laboratório de Pesquisa e Desenvolvimento em Reprodução e Centro de Terapia Gênica HCPA/UFRGS pelo apoio durante a realização deste trabalho. Em especial Ana Ayala, Paula Terraciano, Ludmila Miquelit, Andréia Taffarel e Guilherme Baldo pelo estímulo e ajuda com os detalhes da dissertação.

As pesquisadoras alemãs Katja Prella, Regine Schoenfeld e Steffani Rief. Pelos valorosos ensinamentos a respeito das técnicas empregadas neste trabalho.

A Dra. Ursula Matte e Dra Themis Reverbel da Silveira pela acolhida em seus laboratórios, bem como à Administração do Centro de Pesquisas do HCPA e o GPPG do Hospital de Clínicas de Porto Alegre pela oportunidade de trabalho em laboratórios de excelente infra-estrutura e pesquisa de qualidade.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos em nível de mestrado, e pela oportunidade extraordinária de convênio com pesquisadores da Maximilian Ludwig Universitat de Munique através do PROBRAL I.

Aos colegas, professores e funcionários do Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Aos amigos, que sempre estiveram torcendo por mim em todos os momentos.

A minha família, em especial, ao meu irmão Hugo Filho, meus pais Hugo Eduardo e Silvia Helena Paz, por sua disposição eterna, apoio, estímulo, incentivo e amor, que foram imprescindíveis durante todas as etapas da minha formação. Esta conquista não seria possível sem vocês.

“Aprender é a única coisa que a mente
nunca se cansa, nunca tem medo
e nunca se arrepende”

Leonardo da Vinci

RESUMO

Células tronco são células que possuem a capacidade de originar diferentes tipos celulares maduros. Podem ser classificadas como *células tronco embrionárias* (células ES), quando isoladas de embriões em estágios iniciais do desenvolvimento; ou como *células tronco adultas*, quando isoladas de diferentes tecidos de indivíduos adultos. Por outro lado, as células tronco podem ser classificadas conforme o seu potencial de diferenciação celular. Assim, podem ser denominadas como *totipotentes*, isoladas do embrião, quando este possui até oito células. Células tronco totipotentes possuem a capacidade de gerar todos os tipos celulares oriundos dos três folhetos embrionários, e também podem dar origem aos tecidos formadores dos anexos embrionários. Somente as células totipotentes possuem esta capacidade, e por isso, somente estas, podem gerar um novo indivíduo completo. As células tronco *pluripotentes*, isoladas de blastocistos ou de carcinomas embrionários, possuem a capacidade de se diferenciar em todos os cerca de 200 tipos de tecidos especializados, que compõem o indivíduo adulto. Contudo, vale ressaltar que as células tronco pluripotentes jamais poderão originar um novo indivíduo. Por fim, existe ainda a classificação de células tronco *multipotentes*, que possuem a característica de gerar alguns tipos celulares e apresentam uma menor capacidade de multiplicação *in vitro*, quando comparadas com os outros tipos de células tronco. Estas células podem ser encontradas em diferentes órgãos de indivíduos adultos, como por exemplo, medula óssea, sangue de cordão umbilical, cérebro, fígado e outros.

No presente trabalho, visamos o estabelecimento da rotina de manutenção de células tronco embrionárias de camundongo *in vitro*. Sob a forma indiferenciada e no sistema de indução de diferenciação celular. Para tanto, utilizamos a linhagem de células tronco embrionárias de camundongos, denominada R1. Seguindo protocolos específicos, direcionamos o processo de diferenciação celular para a geração majoritária de células cardíacas e nervosas. Os resultados da diferenciação celular das células tronco embrionárias de camundongos foram analisados a partir da morfologia celular e através da utilização de técnicas de biologia molecular.

A obtenção de culturas de células tronco embrionárias enriquecidas em células cardíacas e nervosas comprovou, através do presente trabalho, que os objetivos propostos foram atingidos. Tendo sido estabelecidas, como rotina, em nossa Universidade, as técnicas de cultivo de células ES em estado indiferenciado, e através do método de indução de diferenciação celular *in vitro* para células cardíacas e nervosas. Os resultados obtidos confirmam os dados descritos na literatura, o que indica que a técnica foi implantada de forma adequada. Assim, adquirimos o domínio das técnicas necessárias para a utilização das ES *in vitro* como uma nova ferramenta de trabalho podendo ser utilizada em diferentes projetos de pesquisa.

ABSTRACT

Stem cells are able to originate different cell types. Stem cells can be classified as *embryonic stem cells* (ES cells) which can be isolated from pre-implantation embryos; or as *adult stem cells* which can be obtained from different adult tissues. On the other hand, stem cells can be classified considering their ability to differentiate into different cell types. Firstly, stem cells can be named as *totipotent* when isolated from 8 cell stage embryos. Totipotent stem cells are capable to differentiate into all cell types from the three germ layers. Additionally, the totipotent cells can generate the embryonic accessories. This characteristic promotes this cell type as the only cell group able to generate an entire individual. *Pluripotent stem cells*, isolated from the blastocyst or from embryonic carcinoma (EC), presents the capacity to generate all the 200 cell types that compound the adult individual. It is important to note that the pluripotent stem cells cannot generate a new complete individual. Finally, there is the *multipotent stem cells*, which can generate some cell types and presents a reduced ability to replicate *in vitro* when compared with another stem cell types. Multipotent stem cells can be isolated from different adults tissues and organs, for example, bone marrow, umbilical blood cord, brain, liver and others.

In the present experiment, we established the routine of *in vitro* mice embryonic cell culture techniques. On the undifferentiated and into differentiation system. For that we worked with R1 mice stem cell line. Based on described protocols for induction of differentiation system direct to cardiogenesis and neurogenesis. The obtained results from the induction of differentiation were detected by morphological and molecular analyses.

The goals of the present study can be verified by the establishment of the ES cell culture system and with the obtained ES culture cells enriched with cardiac and neuronal cells. In this way, we can notice the establishment of the ES cells described techniques by our research group in our University. Our results confirm the described literature data ensuring the well establishment of the ES cell culture system. With this work we acquire the ability to perform *in vitro* experiments with mice embryonic stem cells, so our group can use these cells as a new research tool which can be applied in different science projects.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AR	Ácido Retinóico
ES	Células Tronco Embrionárias (<i>Embryonic Stem</i>)
EB	Corpúsculos Embrionários (<i>Embryoid Bodie</i>)
EMFI	Fibroblastos Embrionários de Camundongos (<i>Embryonic Mouse Fibroblast</i>)
NEURO 68	Proteína de neurofilamento de 68 kilodaltons de peso molecular
NEAA	Aminoácidos não essenciais (<i>Non Essential Aminoacids</i>)
α -MHC	proteína de cadeia pesada da miosina (<i>myosin heavy chain</i>)
μ g	micrograma(s)
μ l	microlítro(s)
SFB	Soro Fetal Bovino
AB	Antibiótico
NEAA	Aminoácidos não essenciais (<i>Non Essential Aminoacids</i>)
LIF	(<i>Leukaemia inhibitory factor</i>) Fator inibitório de leucemia
PBS	Solução Salina de Fosfato Tamponada (<i>Phosphate Buffer Saline</i>)
P(3)	Passagem no qual a cultura celular se encontra.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
1.1 Células Tronco Embrionárias	11
1.2 Células Tronco Adultas	12
1.3 Células Tronco Totipontes	14
1.4 Células Tronco Pluripotentes.....	15
1.5 Células Tronco Multipotentes.....	17
1.6 Propriedades das Células Tronco Embrionárias	18
1.7 Capacidade de Desenvolvimento in vitro das Células Tronco Embrionárias de Camundongos.....	20
1.8 Indução de diferenciação <i>in vitro</i>	21
1.9 Cardiogênese <i>in vitro</i>	22
1.10 Neurogênese <i>in vitro</i>	23
1.11 Métodos de Análise de diferenciação celular	24
1.12 Terapia Celular.....	26
2. MATERIAL E MÉTODOS	29
2.1 Materiais	29
2.1.1 Células.....	29
2.1.2 Reagentes para cultura de células	29
2.1.3 Reagentes para análise molecular.....	34
2.1.4 Equipamentos	38
2.1.5 Material de consumo.....	39

2.1.6 Animais.....	39
2.2 Métodos	40
2.2.1 Extração de fibroblastos embrionários.....	40
2.2.2 Manutenção dos fibroblastos embrionários.....	41
2.2.3 Cultura indiferenciada das células tronco embrionárias	42
2.2.4 Protocolos para indução de diferenciação de ES.....	42
2.2.5 Indução de cardiogênese.....	42
2.2.6 Indução de Neurogênese.....	44
2.2.7 Procedimento para análise morfológica	46
2.2.8 Análise molecular.....	46
2.2.8.2 Preparação das células para as análises molecular	46
2.2.8.2 Extração do RNA total das células.....	47
2.2.8.3 Extração de RNA total dos tecidos.....	48
2.2.8.4 Reação com a Transcriptase Reversa.....	49
2.2.8.5 Reação da Polimerase em Cadeia (PCR).....	49
2.2.8.6 Eletroforese.....	50
3. RESULTADOS	51
3.1 Obtenção de Fibroblastos Embrionários	51
3.2 Estabelecimento da rotina de manutenção de ES indiferenciadas	52
3.3 Análise morfológica da diferenciação de ES à cardíacas.....	53
3.4 Análise morfológica da diferenciação de células ES à nervosas.....	54
3.5 RNA total obtido das diferentes amostras.....	55
3.6 Integridade do RNA obtido das diferentes amostras.....	57

3.7 Comprovação da eficiência da técnica de RT-PCR.....	58
3.8 Comprovação molecular da diferenciação de céls ES em céls cardíacas	59
3.9 Comprovação molecular da diferenciação de céls ES em céls nervosas.....	61
4. DISCUSSÃO	63
5. CONCLUSÕES	67
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	70

1. INTRODUÇÃO

Um indivíduo adulto possui cerca de 75 trilhões de células, que se distribuem em aproximadamente 220 tipos de tecidos diferentes, cada um destes tecidos possui características e funções distintas. Contudo, imediatamente após a fecundação, o embrião não passa de um conglomerado de células indiferenciadas. Somente após alguns dias, aproximadamente uma semana, estas células iniciam o processo de diferenciação, e assim, assumem diferentes aspectos não só na morfologia, mas também, e principalmente em sua fisiologia. Desta forma, algumas diferenciam-se em células sanguíneas, outras em ósseas, hepáticas, renais, cardíacas, nervosas e assim por diante. De acordo com o local de onde são encontradas as células tronco podem ser classificadas conforme descrito abaixo.

1.1 Células Tronco Embrionárias

As células tronco embrionárias são células que podem ser obtidas da massa central interna do blastocisto. Estas células possuem alta plasticidade podendo gerar todos os tipos de tecidos de um indivíduo; porém, nunca um indivíduo completo, devido a sua incapacidade de gerar os anexos embrionários. Células tronco embrionárias podem ainda, ser mantidas em estado indiferenciado e propagadas *in vitro* inúmeras vezes.

1.2 Células Tronco Adultas

Estudos sugerem que algumas células tronco embrionárias permanecem indiferenciadas no indivíduo adulto. Estas células, aparentemente, possuem a capacidade de dar origem a células diferenciadas do tecido em que residem, quando adequadamente estimuladas. E podem ser ativadas durante o desenvolvimento do indivíduo, ou em caso de dano a algum tecido ou órgão. As células tronco adultas são encontradas em regiões específicas do organismo como na medula, cérebro, fígado e até mesmo na pele (LAVKER, SUN 2000; UCHIDA et al., 2000). Inicialmente, acreditava-se que estas células possuíam algum tipo de comprometimento com a regeneração do tecido no qual residem, dando origem assim somente a um número bastante limitado de tecidos, mais recentemente cientistas tem comprovado que as células tronco adultas apresentam uma plasticidade bem maior do que se acreditava (BLAU et al., 2001; MORRINSON 2001; PROCKOP et al., 2003).

Esta divisão baseada na fonte de origem das células tronco pode ser considerada bastante superficial, uma vez que células de órgãos específicos, células tronco provenientes do cordão umbilical e até mesmo da medula, apesar de receberem a classificação de “células tronco adultas” apresentam diferentes características e capacidades. Assim, foi desenvolvido um sistema de classificação, de acordo com a habilidade das células tronco de multiplicação *in vitro* e sua plasticidade, que é a capacidade de diferenciação em diferentes tecidos especializados de outras camadas germinativas *in vitro*. A Fig 1, mostra a classificação das células tronco no corpo humano, tomando como exemplo as células tronco adultas encontradas no sistema hematopoético.

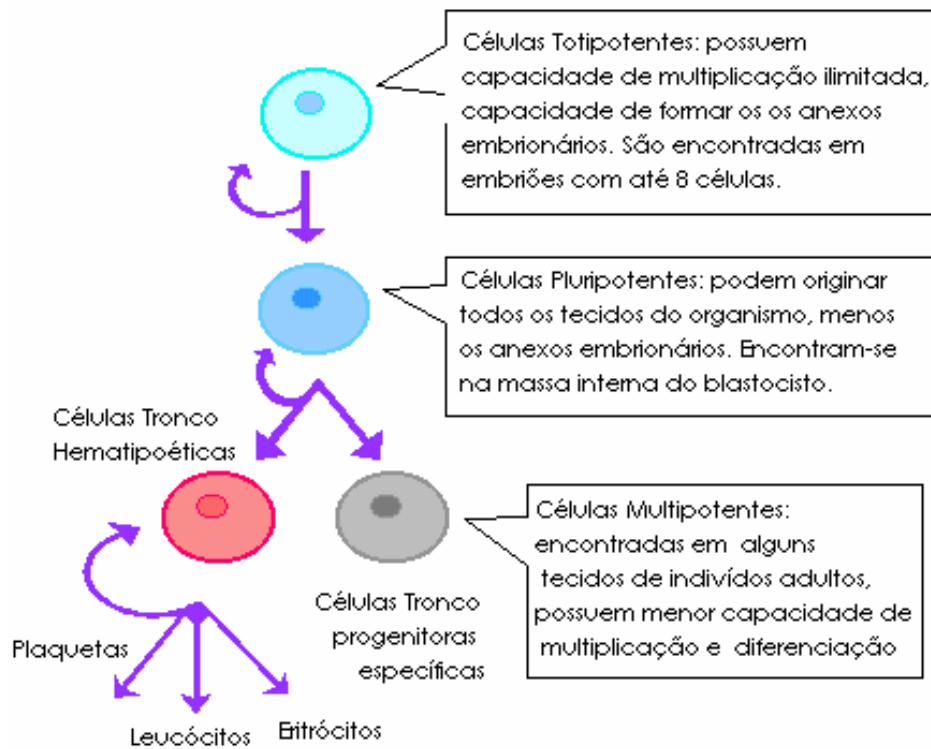


Figura 1. Ilustra os diferentes tipos de células tronco e seus respectivos potenciais de desenvolvimento, exemplificando as células tronco encontradas no sistema hematopoiético.

Levando em consideração a plasticidade das células tronco, estas podem ser classificadas da seguinte maneira:

1.3 Células Tronco Totipotentes

São as células encontradas no oócito fecundado nos blastômeros do embrião no estágio de 2, 4, até 8 células (WOBUS, 2001). São denominadas células totipotentes porque, quando colocadas em um útero em condições de gestação, dão origem a um novo indivíduo completo. A denominação “totipotente” está relacionada com a capacidade de gerar um novo organismo, inclusive os anexos embrionários, tais como placenta, corion, que são necessários para o desenvolvimento do indivíduo. Somente estas células podem gerar um novo ser completo. As células tronco totipotentes apresentam enorme capacidade de diferenciação e plasticidade. Devido a sua capacidade em gerar um novo indivíduo completo, estas células não são muito utilizadas em pesquisa, já que as implicações éticas deste feito são enormes; uma vez que a possibilidade da produção de embriões humanos idênticos a partir de células totipotentes, não representa uma ação ética, nem responsável.

Além das questões éticas que impedem a utilização das células tronco totipotentes, existe ainda o fato de que as células pluripotentes (que serão abordadas a seguir) possuem praticamente a mesma capacidade de diferenciação, excluindo unicamente o poder de formar os anexos embrionários, portanto tornando-se assim, mais indicadas para a utilização em pesquisa.

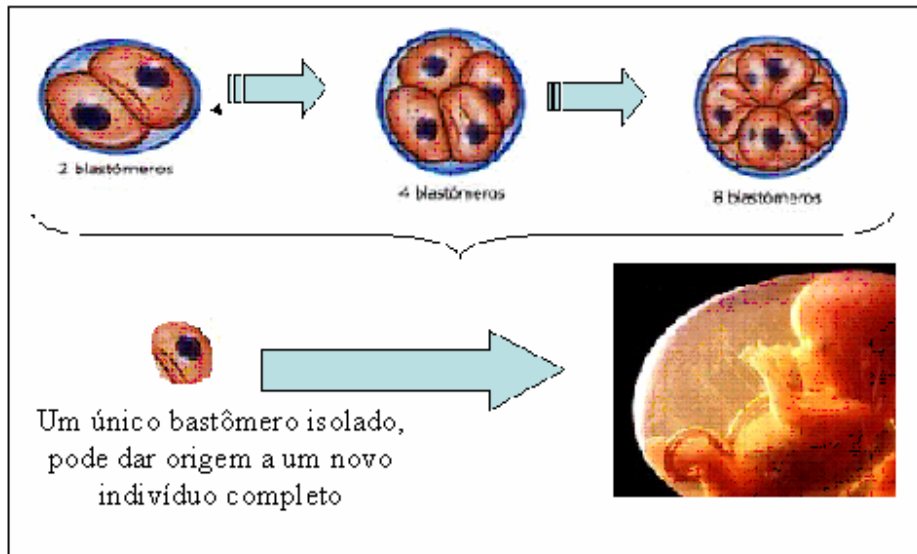


Figura 2: Fontes de obtenção das células totipotentes, embrião até o estágio de 8 células, e a possibilidade destas em gerar um novo indivíduo completo, inclusive os anexos embrionários.

1.4 Células Tronco Pluripotentes

Células tronco pluripotentes são derivadas de embriões, e podem se diferenciar em tecidos de todas as camadas germinativas, tanto *in vivo*, quanto *in vitro* apresentando assim alta plasticidade. Fig 3. Podem ainda ser expandidas quase que infinitamente em laboratório, e preservar seu cariótipo estável.

As primeiras células pluripotentes foram isoladas de teratocarcinomas de camundongos (tumores complexos contendo uma mistura de células diferenciadas de todas as camadas germinativas). Estas células foram denominadas células carcinoma embrionárias devido a sua semelhança com as células de embriões em estágio inicial de desenvolvimento (MARTIN, EVANS 1975). Já em 1981, Martin; Evans e Kaufman estabeleceram a primeira linhagem de células murinas provenientes da massa central interna do embrião

em estágio de blastocisto, denominadas células tronco embrionárias. Estas células puderam ser comprovadas como pluripotentes, na medida em que, quando injetadas em animais receptores, em estado indiferenciado, promoveram a formação de teratocarcinomas (PRELLE et al., 2001). Além da capacidade de ser pluripotente, outra característica que deve ser destacada nas células tronco embrionárias é a capacidade que estas possuem em, se reintegrar a um embrião em desenvolvimento, dando origem a todos os tipos celulares, inclusive às células germinativas (BRADLEY et al., 1984). Este fenômeno pode ocorrer mesmo depois das células tronco terem sofrido extensa manipulação *in vitro*, como por exemplo com modificações genéticas. Este fato possibilitou o desenvolvimento de uma série de animais “knock out” utilizados em pesquisa científica como modelos de doenças genéticas.

O surgimento de teratocarcinomas espontâneos em testículos, fez com que se estudasse extensivamente a possibilidade de existir ali, uma terceira classe de células pluripotentes, e em 1996 Tam e Zhou, encontraram a presença destas células no epiblasto de embriões de camundongos e, as denominaram células primordiais germinativas. Dentre as três classes de células pluripotentes, a que apresenta maiores benefícios no que tange a plasticidade e a capacidade de propagação *in vitro*, é a classe das células tronco embrionárias (PRELLE et al., 2001). Estas foram as células utilizadas neste trabalho, e serão descritas mais detalhadamente a seguir.

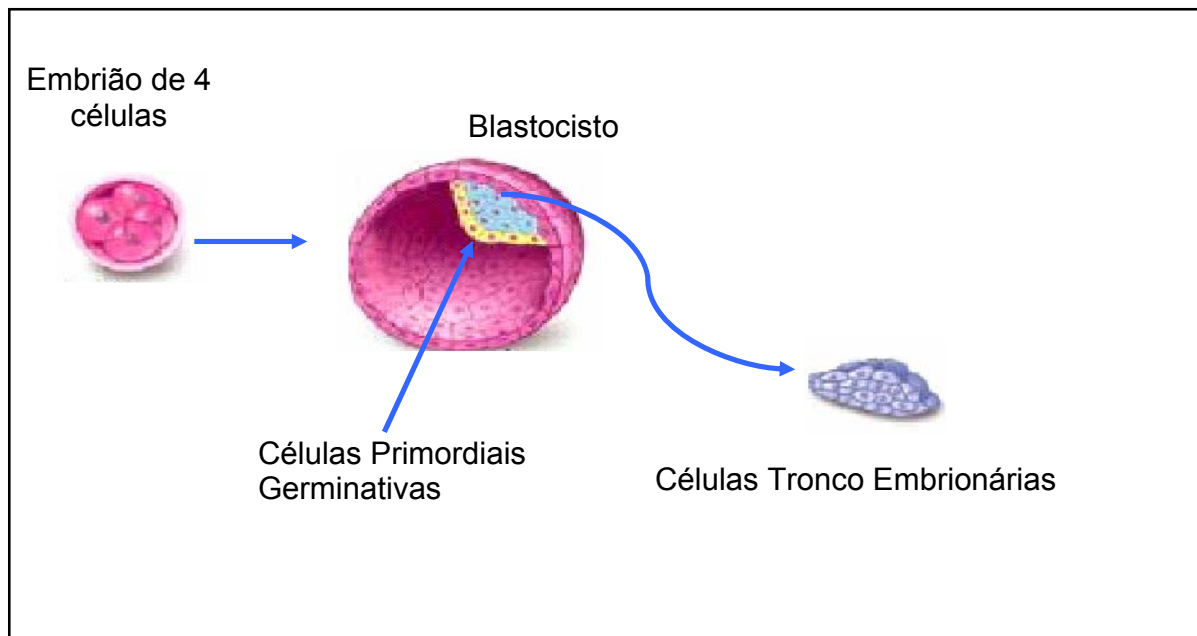


Figura 3: Fonte de obtenção das células tronco embrionárias e células primordiais germinativas.

1.5 Células Tronco Multipotentes

Células tronco multipotentes podem ser encontradas nos indivíduos enquanto adultos. Acredita-se que são células tronco derivadas do embrião que permaneceram indiferenciadas em alguns órgãos do organismo adulto. Podem ser denominadas de células tronco quiescentes, ou células progenitoras comprometidas com o órgão no qual residem. Poderiam ser a única fonte de renovação para os tecidos onde se encontram; porém, os estímulos necessários para a sua ativação são raros, e o número de células tronco quiescentes presentes nos organismos adultos é bem reduzido. O maior exemplo de células tronco encontradas em adultos são as células da medula óssea, que dão origem a todos os tipos celulares presentes na linhagem hematopoiética; e que, na presença de determinadas

citocinas e fatores de crescimento específicos, podem se diferenciar em células especializadas de diferentes tecidos. Contudo, existem cerca de $5-10 \times 10^{11}$ células na medula óssea, destas células cerca de 1% são células progenitoras comprometidas com o sistema hematopoiético, e somente 0,001% são as células tronco (GAGE, 1998). As células presentes no cordão umbilical apresentam características bastante semelhantes às células da medula óssea; porém, apresentam maior plasticidade (CHAO et al., 2004).

Além da medula óssea e do cordão umbilical, outros tecidos adultos, como sangue circulante, cérebro, medula espinhal, músculo esquelético, epiderme, sistema digestório, pâncreas também apresentam células tronco (PRELLE et al., 2001).

1.6 Propriedades das células tronco embrionárias

O sucesso do cultivo de células da massa celular do blastocisto, e do estabelecimento de linhagens celulares de células tronco embrionárias (EVANS, KAUFMAN, 1981; MARTIN, 1981) foram um grande salto para a biologia do desenvolvimento e biologia celular já no início dos anos oitenta. Em 1984, Bradley e colaboradores implantaram células tronco embrionárias em embriões jovens de camundongos. Este experimento demonstrou que as células tronco embrionárias apresentavam a capacidade de dar origem a todos os tecidos do animal, inclusive às células germinativas (LABOSKY et al., 1994). Devido a esta descoberta, foi possível a geração de centenas de animais “knock out”, e que se estudasse a fundo a base da modulação gênica *in vivo*. Contudo, além da capacidade de diferenciação em sistemas *in vivo*, foi demonstrado que as células tronco embrionárias podiam não só se diferenciar em organismos vivos, mas

também em sistemas *in vitro*. Desta forma, as células tronco embrionárias cultivadas *in vitro* originaram linhagens de tecidos da endoderme,

mesoderme e ectoderme, quando cultivadas em formas tridimensionais de agregados celulares denominados corpúsculos embrionários (EBs) (WOBUS, 1991).

Células tronco embrionárias indiferenciadas caracterizam-se por duas principais propriedades: (a) a quase ilimitada capacidade de multiplicação e (b) a capacidade de diferenciação em células somáticas diferenciadas (WOBUS et al., 2001). Outras propriedades das células tronco embrionárias são: (c) a alta atividade da fosfatase alcalina; (d) a expressão de antígenos embrionários específicos como SSEA-1; (e) alta razão núcleo citoplasma; (f) alta atividade da telomerase; (g) regulação da própria multiplicação mediada por citocinas da família IL-6 (interleucina 6) (NIWA et al., 1998; PRELLE et al., 1999; VASSILIEVA et al., 2000). As células tronco embrionárias não só apresentam a vantagem de possuir maior plasticidade em comparação com as células tronco adultas, mas também apresentam vantagens quando comparadas a outras células pluripotentes embrionárias, já que são as únicas que podem dar origem a células germinativas, quando transplantadas a blastocistos de animais receptores.

Devido às intensas atividades de pesquisa e ao progressivo ganho de conhecimento tecnológico e fisiológico, grandes avanços tem sido alcançados quanto a obtenção de linhagens de células tronco embrionárias de diferentes animais. Existem hoje, linhagens, comercialmente disponíveis de células tronco embrionárias de roedores (EVANS, KAUFMAN 1981; MARTIN, 1981; DOESTSCHMAN et al., 1985; NAGY et al., 1993), coelhos (GRAVES, MOREADITH 1993), porcos (ROPETER-SCHARFESTEIN et al., 1996; LI et al. 2003), primatas (THOMSON et al. 1995, 1996) e um significativo, e

crescente, número de linhagens de células tronco humanas (THOMSON et al., 1998; AMIT et al., 2000; REUBINOFF et al., 2000; RICHARDS et al., 2002; HOVATTA et al., 2003; MITALIPOVA et al., 2003).

1.7 Capacidade de desenvolvimento *in vitro* das células tronco embrionárias de camundongos

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 realizarem diferenciação celular. Para mantê-las em estado indiferenciado, duas técnicas são empregadas: a co-cultura das células tronco embrionárias com fibroblastos embrionários (que secretam fatores inibitórios para a diferenciação celular) e adicionalmente, realizar a cultura em presença de LIF (WILLIAMS et al., 1988; Smith et al., 1988), esta citocina é capaz de manter as células indiferenciadas mesmo na ausência de co-cultura com fibroblastos. Outras citocinas que atuam na via do sinal de transdução gp130 incluindo a interleucina 6 e a oncostatina M também foram relatadas como preservadoras do estágio indiferenciado das células tronco de camundongos.

1.8 Indução de diferenciação *in vitro*

Um dos aspectos mais interessantes das células tronco embrionárias é a habilidade que estas possuem em se diferenciar em todos os tipos celulares *in vitro*, quando o estímulo necessário é aplicado. O método mais frequentemente utilizado para a indução de diferenciação celular *in vitro* é a formação de estruturas tridimensionais em cultura. A estas estruturas dá-se o nome de corpúsculos embrionários devido a enorme semelhança que estes apresentam com embriões em estágio inicial do desenvolvimento. Os corpúsculos embrionários apresentam estruturas derivadas de todos os folhetos embrionários (ABE et al., 1996) e sua formação é um pré-requisito para qualquer protocolo de diferenciação *in vitro* de células ES. Contudo, é preciso reafirmar que a diferenciação dos corpúsculos embrionários não segue os parâmetros do desenvolvimento embrionário padrão, não apresentando assim polaridade ou plano de corpo. Além do que, como já foi citado anteriormente, células ES não podem formar um novo indivíduo completo tendo em vista a sua incapacidade de originar os anexos embrionários.

Pode-se obter a formação de corpúsculos embrionários a partir de células ES pré-cultivadas na presença de fatores inibitórios de diferenciação celular, da seguinte forma: cultura de suspensão com alta densidade celular denominada técnica denominada “mass culture” (KELLER, 1995); utilizando um meio com metil celulose (WILES, KELLER 1991), ou ainda através do método de gotas suspensas (utilizado neste trabalho), que permite um maior controle na geração dos corpúsculos embrionários (WOBUS et al., 1991). Após a formação dos corpúsculos embrionários, estes são mantidos, por períodos de tempo determinados, em cultura de suspensão (dependendo do tipo celular que se pretende obter). A diferenciação dos corpúsculos embrionários *in vitro* segue o mesmo ritmo da diferenciação dos embriões *in vivo*. Desta forma, precursores da mesoderme e ectoderme

são alcançados em poucos dias, enquanto alguns tipos celulares da endoderme são obtidos com um período de cultura maior (superior a 10 dias), estágio onde a maioria dos corpúsculos embrionários assume forma cística (ABE et al., 1996).

Seguindo a formação dos corpúsculos embrionários, e os seus respectivos períodos em cultura de suspensão, os EBs devem retornar para a cultura celular de adesão onde se desenvolvem em tipos celulares específicos.

1.9 Cardiogênese *in vitro*

Células contráteis formam-se espontaneamente durante o desenvolvimento das ES *in vitro* e promovem assim, um exemplo do potencial de diferenciação das células tronco embrionárias em células cardíacas (WOBUS, 1991; CHEN e KOSCO 1993).

Células tronco, diferenciadas *in vitro* em células cardíacas expressam marcadores moleculares de tecidos específicos, apresentam proteínas estruturais, receptores cardíacos e fatores de transcrição (sumarizado em BOHELER 2002). Além da expressão de genes marcadores, foram identificadas funções eletrofisiológicas iguais as cardíacas nas células diferenciadas *in vitro* (WOBUS, 2001). Dados preliminares de transplantes de células ES diferenciadas em cardiomiócitos indicam que, estas células são capazes de se integrar ao tecido endógeno do coração, se vascularizando e continuando a se diferenciar *in vivo* (JOHKURA et al. 2003).

Hoje, as células tronco embrionárias humanas já estão sendo usadas para gerar células cardíacas a partir de protocolos desenvolvidos em modelos animais (MUMMERY et al., 2003).

1.10 Neurogênese *in vitro*

A diferenciação das ES em células nervosas também é amplamente aplicada, e grandes quantidades de neurônios, astrócitos e oligodendrócitos são obtidos com protocolos diferentes (STAVRIDIS e SMITH 2003). Protocolos, utilizando altas concentrações de ácido retinóico, durante a cultura de suspensão, foram estabelecidos para a obtenção de células nervosas. O ácido retinóico (AR) é a forma biológica da vitamina A e, estudos mostraram que quando o AR é empregado em críticos estágios do desenvolvimento de embriões de animais de laboratório, este se torna teratogênico (LAMMER et al., 1985). O mecanismo exato que a ação do ácido retinóico apresenta sobre a modulação da diferenciação celular ainda não está bem esclarecido, contudo, foi comprovado que a adição de altas quantidades de AR durante o período da cultura de suspensão dos corpúsculos embrionários, resulta em uma inibição do desenvolvimento da cardiogênese e um aumento da neurogênese (WOBUS, 1994).

Resultados preliminares de implantação das células diferenciadas em cérebros de camundongos indicam que estas células são funcionalmente ativas, formam sinapses e podem gerar potenciais de ação; as ES diferenciadas em células nervosas de integraram totalmente com ao tecido nervoso, e, em pelo menos um caso, corrigiram o fenótipo de uma doença neurodegenerativa (BARBERI et al., 2003; CHIBA et al., 2003).

1.11 Métodos de análise de diferenciação celular

Existem três principais métodos de análise da indução de diferenciação celular *in vitro*. A mais simples, consiste na avaliação morfológica das células. Para esta análise, os corpúsculos embrionários são plaqueados em uma razão de um corpúsculo embrionário por poço em placas de 24 poços. Desta forma, a cada dia de cultura de adesão, os poços são exaustivamente observados ao microscópio óptico, e cada célula com morfologia diferenciada é fotografada. Nesta fase, pode-se também quantificar as células diferenciadas e não diferenciadas obtendo assim o resultado da eficiência da diferenciação. Outro método utilizado para a análise da diferenciação, é, através de técnicas de biologia molecular, realizar a busca da expressão de genes caracteristicamente expressos em tecidos específicos. Isto é realizado através da técnica RT-PCR, uma vez que a produção das proteínas é feita a partir do RNA mensageiro. Nesta análise se busca evidenciar, quais são as seqüências de RNA mensageiro que estão sendo produzidas pelas células em um dado momento. O RNAm codifica para as proteínas a serem formadas. Assim, pode-se averiguar a produção da mensagem para a produção de proteínas específicas primariamente. Neste trabalho buscamos a expressão de genes característicos das células diferenciadas como por exemplo, o gene que codifica para a proteína Neuro 68. A Neuro 68 é uma proteína do citoesqueleto que compõe os filamentos intermediários de células nervosas, especificamente neurofilamentos. Esta proteína encontra-se presente em axônios e neurônios de vertebrados, e não está presente em células tronco indiferenciadas. Assim, é um excelente marcador para a diferenciação de células tronco embrionárias em células nervosas. Adicionalmente analisamos a expressão do o gene codificante para a proteína

Sinaptofisina, encontrada em células nervosas, e necessária para a realização de sinapses, outro excelente marcador, que nos indica, que as células diferenciadas apresentam atividades funcionais típicas, isto é, que podem realizar sinapses. Para análise da diferenciação das células ES em células cardíacas busca-se a expressão do gene que codifica para a proteína para cadeia pesada da miosina (α -MHC ou *α myosin heavy chain*). A miosina é uma proteína motora responsável pela geração de força de contração muscular, é então necessária para a realização dos movimentos característicos da musculatura cardíaca. Desta forma, a expressão deste gene, também indica uma provável funcionalidade da células diferenciadas.

Além dos métodos citados anteriormente, existe uma terceira forma muito utilizada para a análise da diferenciação celular. Esta toma por base a síntese das proteínas marcadoras dos tipos celulares específicos, e é denominada imunofluorescência. Nesta técnica as células que sofreram diferenciação são colocadas em lamínulas especiais, e depois, colocadas em contato com anticorpos específicos para as proteínas marcadoras. Estes anticorpos são conjugados com substâncias fluorescentes, que permitem a visualização do local específico onde a proteína encontra-se presente sob análise ao microscópio de fluorescência.

1.12 Terapia celular

Um dos principais objetivos da pesquisa em células tronco é a utilização destas como fonte de células para terapia celular. A terapia celular vem se consolidando como uma alternativa para reparar, ou contribuir para a melhor função biológica de tecidos ou órgãos danificados. Pode ser realizada através de transplantes das células isoladas diretamente no órgão alvo, ou através do transplante de grande número de células na circulação sanguínea. O sucesso desta terapia, em nível clínico, requer a participação de uma equipe multidisciplinar, incluindo forte conhecimento específico de biologia celular, biologia molecular, imunologia, engenharia de tecidos, biologia de transplantes, além de um enorme conhecimento da clínica e técnicas cirúrgicas relacionadas com a patologia em questão.

O transplante celular pode ser autólogo, quando as células utilizadas para o transplante são retiradas do próprio indivíduo, e podem ser: células diferenciadas (não as células tronco), como por exemplo: queratinócitos para reparar lesões de epiderme; condrócitos, que podem reparar cartilagens, ou ainda células tronco adultas. Apesar dos exemplos citados apresentarem a vantagem de poder ser retiradas do próprio indivíduo que irá recebê-las em outro local, sem ocasionar assim problemas imunológicos, estas fontes celulares apresentam resultados mais dispendiosos e com menor sucesso, uma vez que nem sempre as células a serem transplantadas são de fácil obtenção e freqüentemente possuem baixa taxa de multiplicação *in vitro*. Além do fato de que, dependendo da gravidade da lesão, não existe disponibilidade de tempo para que as células sejam retiradas do indivíduo, expandidas em cultura e então, transplantadas, antes que este vá a óbito.

O transplante celular heterogênico “não com células tronco”, que utiliza, por exemplo: células retiradas de cadáveres, de outros doadores, ou até mesmo linhagens celulares, apresenta como vantagem a possibilidade das células serem coletadas dos doadores, caracterizadas, expandidas e criopreservadas em laboratório antes mesmo do paciente apresentar a necessidade do transplante. Assim, o tratamento é bem mais rápido. Porém como desvantagem existe o problema da alta imunogenicidade das células provenientes de outros indivíduos adultos, e a grande chance que as células imortalizadas possuem de apresentar mutações oncogênicas (Gage, 1998).

As características das células tronco embrionárias, principalmente sua capacidade de proliferação *in vitro*, fazem delas uma boa alternativa para transplantes celulares, já que, uma vez isoladas, e recebendo as citocinas e fatores de crescimento necessários, podem modular sua diferenciação em determinada via metabólica dando origem a uma população rica em células especializadas de todos os tipos de tecidos.

No transplante heterólogo se faz necessário o uso de drogas imunossupressoras para evitar a rejeição das células transplantadas. Contudo, o uso das células tronco embrionárias para terapia celular (transplante heterólogo), parece ser menos imunogênico para o organismo receptor, já está comprovado que, em camundongos, a expressão de proteínas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) em células embrionárias é bastante baixo, quando comparado com as células adultas (DRUKKER et al., 2002). Além desta vantagem, devido a enorme capacidade de proliferação *in vitro*, a fácil obtenção das células tronco embrionárias (não levando em conta, neste momento, considerações éticas), e ainda a surpreendente plasticidade característica destas, podemos concluir que as células ES são excelentes fontes para transplante celular. Porém, outro fato deve ser levado em conta; células ES quando transplantadas para indivíduos, na forma

indiferenciada, podem originar teratocarcinomas (STEVENS, 1983), e embora a indução de diferenciação celular *in vitro* a partir de células tronco embrionárias, seja facilmente atingida, nenhum estudo apresentou uma diferenciação completamente pura em determinado tipo celular (RIPPON e BISHOP, 2004). Contudo, está provado que células ES diferenciadas *in vitro*, purificadas em laboratório e transplantadas para indivíduos apresentam um excelente resultado, na recuperação de tecidos e órgãos sem apresentar a formação de teratocarcinomas (WOBUS, 2001).

Assim, ainda faz-se necessário para o futuro, mais estudos sobre antígenos de membrana específicos dos tecidos diferenciados para que se possa fazer a seleção e purificação da população celular, e assim utilizar as células tronco embrionárias, com toda a certeza de sucesso para terapia celular.

Na realidade ainda existe muito a ser estudado antes que se possa utilizar as células tronco embrionárias como para transplantes celulares. Estabelecer a técnica de cultivo *in vitro*, primeiramente sobre a forma indiferenciada, e em seqüência efetuar a indução de diferenciação (com protocolos pré-estabelecidos) são os primeiros passos para grupos de pesquisa que pretendem fazer trabalhar com esta linhagem celular. O desenvolvimento de protocolos alternativos de diferenciação *in vitro*, buscando uma maior eficácia na obtenção de populações puras em células indiferenciadas, será o próximo passo a ser seguido por nosso grupo.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Materiais

2.1.1 Células

A linhagem de células tronco embrionárias de camundongos R1 (NAGY et al. 1993) foi utilizada como fonte de células para os experimentos

Fibroblastos embrionários retirados de fetos de camundongos isogênicos BALB/c fêmeas prenhas com período de gestação entre o 12º e 15º dia.

2.1.2 Reagentes para cultura de células

Solução Salina Fosfatada (PBS) (DULBECCO e VOGT, 1954)

NaCl 10g/L, KCl 0,25g/L, Na₂HPO₄ 1,44 g/L e KH₂PO₄ x 2H₂O 0,25 g/L, diluídos em água Milli-Q e volume acertado para 1 litro.

Solução de Gelatina: 1%

Para 100 mL, foi adicionado 1 g de gelatina (Fluka) e o volume ajustado, em proveta com água bidestilada. A solução foi ainda autoclavada e diluída 1:10 em PBS no momento do uso.

Solução de Tripsina EDTA: 0,2%

1:250 tripsina, 0,02% EDTA. (Gibco)

Solução Estoque de Mitomicina C

Foram diluídos 2 gramas de mitomicina C (MC, Serva) em 10 mL de PBS. A solução foi esterilizada através de filtração em membrana de 0,22 µm. Para fazer a solução de trabalho da mitomicina, 300 µL da solução estoque de mitomicina eram adicionados a cada 6 mL de meio D-MEM completo para cultura, formando assim a solução de mitomicina C para entrar em contato com as células.

Aminoácidos Não Essenciais

Solução estoque 100 vezes concentrada, GIBCO, armazenado a 4°C.

Albumina Sérica Bovina

Solução estoque de albumina sérica bovina 7,5% GIBCO, armazenada a 4°C.

Soro Fetal Bovino

Soro Fetal Bovino (SFB) estéril e inativado (Cultilab)

Soro Fetal Bovino tratado com Dextram

O SFB inativado estéril, foi tratado com dextram T500 (Pharmacia) saturado com carvão ativo (SERVA; DCC), a fim de remover proteínas de alto peso molecular, e fatores de crescimento e indutores de diferenciação celular presentes no soro fetal bovino (WOBUS, 1999).

Ácido Retinóico

O ácido retinóico All-trans (Sigma) foi diluído, na ausência de luz, em álcool 96% para preparação de uma solução estoque 10^{-3} M.

Solução de Antibiótico

A solução antibiótica penicilina/estreptomicina 100x (Gibco) foi utilizada como solução estoque, e aplicada nas células na concentração 1x.

LIF

Leukemia Inhibitory factor (LIF).

Dimetilsulfóxido

Solução de Dimetilsulfóxido (DMSO) fornecida pela SIGMA.

Betamercaptoetanol

Solução estoque 7 μ l de (β -ME) SIGMA em 10 mL de PBS

Monotioglicerol

Solução de Monotioglicerol utilizada no meio para gotas suspensas. Concentração final 450 μM

NEAA

Solução de aminoácidos não essenciais (Gibco) 100 vezes concentrada estéril.

Meio de Cultivo DMEM

Dulbecco's Modified Eagle Medium (Gibco). Adquirido em envelopes para 1 litro.

Assim, o meio era dissolvido em água milli-Q, o volume ajustado em provera graduada, e o meio filtrado em membrana de 0,22 μm .

Meio de cultivo ISCOVES

Iscove's Modified DMEM (Gibco) Adquirido em envelopes para 1 litro. Assim, o meio era dissolvido em água milli-Q, o volume ajustado em provera graduada, e o meio filtrado em membrana de 0,22 μm .

Meio de Cultivo para Fibroblastos Embrionários I

Utilizado no momento da extração dos fibroblastos embrionários. Para 100 mL de meio, foram adicionados 15 mL de soro fetal bovino inativado estéril, 1 mL de solução antibiótica 100 X e 84 mL de meio de cultura D-MEM (Gibco).

Meio de Cultivo para Fibroblastos II

Formulação utilizada para a manutenção dos fibroblastos obtidos. Para 100 mL de meio, foram adicionados, 10 mL de soro fetal bovino inativado estéril, 1 mL de solução antibiótica 100 x , e 89 mL de meio de cultura D-MEM (Gibco).

Meio de Cultivo para as Células Tronco Embrionárias em Estágio

Indiferenciado

Para 100 mL de meio, foram adicionados 15 mL de SFB inativado, tratado com carvão ativo, 1 mL LIF 100X, 1 mL de NEAA 100X e 83 mL de meio de cultura D-MEM.

Meio de cultivo para as gotas suspensas

Em condições estéreis, adicionar 150 µl de SFB, 100 µl de NEAA e 30 µl de monoglicérol, completar o volume com meio ISCOVE até 10 mL.

Meio de para a cultura de suspensão

Para 100 mL de meio de cultura, foram adicionados 15 mL de Soro Fetal Bovino, 1 mL NEAA, 1 µl β-ME, 1 mL de BSA 7,5% e 1 mL de NEAA. O volume foi ajustado para 100 mL com meio de cultura ISCOVE.

2.1.3 Reagentes para a Análise Molecular

Primers: para o RT-PCR foram utilizados primers (Boehringer Biotech) de genes específicos. Apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 – Relação dos primers utilizados para a análise molecular da Indução de diferenciação celular *in vitro*.

Nome	Sequências (5'---3')	Tamanho pb
β- tubulina	GGAACATAGCCGTAAACTGC	317 pb
	TCACTGTGCCTGAACTTACC	
α-MHC	CTGCTGGAGAGGTTATTCCTCG	301pb
	GGAAGAGTGAGCGGCATCAAGG	
Sinaptofisina	GCC TGT CTC CTT GAA CAC GAA C	312 pb
	TAC CGA GAG AAC AAC AAA GGGC	
Neuro 68	GTT GGG AAT AGG GCT CAA TCT	340 pb
	CCA GGA AGA GCA GAC AGA GGT	

Água DEPC

Adicionar 1 mL de Dietilpirocarbonato (ÁGUA DEPC, Sigma) a 1 litro de água destilada, deixar homogenizando por 12 horas a temperatura ambiente. Esta solução inativa as enzimas RNAses. Feito isto, a solução foi autoclavada por 20 minutos, a fim de promover a hidrólise, e conseqüente destruição da água DEPC.

Solução de 250 mM Citrato de Sódio

Foram dissolvidos 7,35 g de Citrato trissódico desidratado em água 0,1% água DEPC, o pH foi ajustado para 7,0 e o volume acertado para o total de 100 mL. A solução foi autoclavada por 15 minutos.

Solução de Sarcosil 10%

Foram dissolvidos 10 g de sarcosil (Sigma) em 0,1% água DEPC para o volume final de 100 mL. A solução foi autoclavada.

Solução de Lise

Para uma concentração final 4 M, Tiocianato de Guanidina 25 mM Citrato de Sódio pH 7,0 ; 0,5% sarcosil, 1% β -ME Foram adicionados 23,6 g de tiocianato de guanidina a 5 mL de citrato de sódio 25 mM (pH 7,0), a seguir foram adicionados 2,5 mL de 10% sarcosil , o volume foi acertado com água DEPC até 49,5 mL e 0,5 mL de β -ME foram adicionados antes do uso.

Acetato de sódio 2 M (pH 4,0)

Foram dissolvidos 27,2 g de acetato de sódio x 3 H₂O em 0.1 % água DEPC. O pH foi ajustado para 4,0 com ácido acético, e o volume ajustado para 100 mL com 0.1% água DEPC. A solução foi autoclavada.

Fenol acídico

O fenol foi saturado com água DEPC.

Clorofórmio: Álcool Isoamílico

24 partes de clorofórmio foram misturadas a uma parte de álcool isoamílico

Isopropanol

Reagente adquirido da marca SIGMA.

Etanol 75%

O etanol 75% para 100 mL de volume total, foram adicionados 75 mL de etanol e o volume final acertado para 100 mL em proveta com água DEPC.

25 mM MgCl₂

Este produto foi fornecido pronto para o uso pela Invitrogen

10 x buffer II

100 mM Tris-HCl, pH 8.3, 500 mM KCl - Invitrogen

Inibidor de RNase

20 U/μL (Invitrogen)

Oligo d(T)₁₆

50 μ M m 10 mM Tris-HCl pH 8.3 (Invitrogen)

MuLV transcriptase reversa

50 U/ μ L Invitrogen

Taq polimerase (Invitrogen)**25 mM dNTP**

Foram diluídos 100 μ L de cada dNTP 250 mM (dGTP, dATP, dCTP, dTTP; Pharmacia) em 250 μ L de água DEPC

2,5 mM dNTP

Foram diluídos 10 μ L de 25 mM dNTP em água autoclavada no volume total de 100 μ L

Brometo de Etídio

Solução estoque 10 mg./mL Pharmacia Biotech

Gel de Agarose 2%

Dissolver 2 g de agarose em 100 mL de TBE 1 X

Tampão TBE 1x

Para 1 litro de tampão, foram adicionados 10,8 g de TRIS; 5,5 g de Ácido Bórico e 4 mL de EDTA 0,5 M. O volume foi acertado para 1 litro em proveta com água destilada. A solução foi autoclavada.

100kb DNA ladder (Gibco)

Utilizado como marcador de peso molecular para DNA em gel de agarose (Gibco).

2.1.4 Equipamentos

Centrífuga refrigerada de laboratório: Eppendorf 510R.

Incubadoras de cultura de células a 37°C com 5% CO₂: Thermo Forma 380.

Microscópio invertido: Nikon Eclipse TE 2000-U.

Calculadora GeneQuant RNA/DNA (Pharmacia LKB Biochrom, England).

Termociclador Eppendorf Mastercycle Personal

2.1.5 Material de consumo

Placas de cultura de células, e bacteriológicas: 35mm, 60mm, 100 mm (Nunc)

Placas de cultura de células de 24 poços (Falcon)

Pipetas Pasteur estéreis, e pipetas de vidro graduadas volumes de 2, 5, 10, 25 mL.

Tubos eppendorf de 0,5 e 1,5 mL; tubos tipo falcon 15 e 50 mL.

Vidrarias de laboratório.

2.1.6 Animais

Camundongos fêmeas BALB/c adultos jovens (4 a 8 semanas de vida) foram utilizados. Os animais foram adquiridos junto à FEPPS (Fundação Estadual de Proteção e Pesquisa em Saúde). Os fetos de seis fêmeas prenhas, entre os 12° e 15° dias de gestação, foram utilizados para a obtenção de fibroblastos embrionários. Outro camundongo fêmea foi utilizado para a obtenção de tecido cardíaco e nervoso. Estes tecidos foram processados para a extração de RNA total e, seu produto utilizado como controle positivo de expressão gênica na análise molecular da indução de diferenciação.

2.2 Métodos

2.2.1 Extração de Fibroblastos Embrionários

Seis camundongos fêmeas da linhagem BALB/c ,prenhas, com gestação entre 12 e 15 dias, foram utilizadas para o processo. Após o sacrifício das fêmeas, o útero foi removido, colocado em uma placa de Petry com solução salina tamponada, pH 7,2, aquecida a 37°C. Após este passo, rompeu-se a membrana uterina, com auxílio de material cirúrgico estéril, e retiram-se os fetos um a um. Os fetos foram colocados em uma nova placa, nas mesmas condições citadas acima, e deles foram retirados a placenta, as membranas fetais, a cabeça, o coração, o fígado, os membros inferiores e superiores. As carcaças foram colocadas em uma nova placa de Petry contendo solução de tripsina/EDTA 0,5%. Além da digestão enzimática, realizou-se, com auxílio de lâminas de bisturi, uma desagregação mecânica dos tecidos. A fim de promover condições ótimas para ação da enzima, as carcaças foram incubadas por 15 minutos a 37°C. Após o intervalo de incubação, a suspensão celular resultante foi transferida para placas de Petry apropriadas para cultura de células, contendo 10 mL de meio de cultura D-MEM enriquecido com 15% de SFB. A suspensão celular foi mantida em estufa com 5% CO₂ e 37°C por 24 horas. Ao final deste prazo, as células não aderentes e os fragmentos celulares foram descartados na ocasião da troca de meio. As células aderentes, resultantes do processamento dos fetos, são compostas majoritariamente por fibroblastos, posteriormente, esta cultura celular será mencionada como cultura de fibroblastos embrionários. Os fibroblastos embrionários foram co-cultivados com as células tronco embrionárias, quando o objetivo era manter as células tronco embrionárias

em estágio de não indução de diferenciação celular, uma vez que estes secretam fatores inibitórios para diferenciação celular (SMITH et al., 1988).

2.2.2 Manutenção dos Fibroblastos Embrionários

Após a primeira passagem, os fibroblastos embrionários (EMFI, “embryonic mouse fibroblasts”) são mantidos em meio de cultura D-MEM enriquecido com 10% de SFB, 1% solução contendo antibiótico (AB). Quando as EMFI apresentavam confluência de 85%, estas eram tripsinizadas, e a suspensão de células resultantes, era dividida em 3 novas placas. Após 48 horas, repetia-se este procedimento. As EMFI utilizadas como “feeder layer”, para as células tronco embrionárias, estavam na passagem de número 3, isto é, eram células que já haviam sido repicadas por três vezes, possuindo assim uma menor capacidade de divisão celular, e por sua vez, menor chance de competição por nutrientes com as células tronco embrionárias. Adicionalmente, as células utilizadas para “feeder layer” também foram incubadas com solução de mitomicina C (droga que impede a realização de mitoses). Os fibroblastos embrionários foram incubados com a solução de mitomicina C por um intervalo de 2-3 horas a 37°C. Posteriormente as células foram lavadas 3- 4 vezes com PBS para a completa remoção da droga.

2.2.3 Cultura Indiferenciada das Células Tronco Embrionárias

Os fibroblastos de passagem 3 (P3) e tratados com mitomicina, foram tripsinizados e colocados em placas de cultura de 35 mm. Após a adesão dos fibroblastos às placas de cultura, as células tronco embrionárias foram então descongeladas e plaqueadas sobre o “feeder layer” de EMFI. O meio de cultura utilizado para a manutenção das ES em estado indiferenciado foi D-MEM 15% SFB, 1% AB, 1% LIF, 1% NEAA. A cultura era sempre dividida em intervalos de 24-48 horas e nunca foi efetuada uma cultura de ES com mais de 48 horas sem que as células fossem divididas, para evitar a possível diferenciação celular indesejada. Para a tripsinização, as células eram antes lavadas com solução salina tamponada por 2 vezes. Em seguida, era adicionado 1mL de solução de tripsina EDTA 0,5% e as placas incubadas por 1 minuto a 37°C. Depois de feita a dissociação, adicionava-se 2 mL de meio de cultura a fim de interromper a ação da enzima. A cada tripsinização, as células eram divididas em uma razão de 1 para cada 3 placas novas.

2.2.4 Protocolos para Indução de Diferenciação de ES

O protocolo para a indução de diferenciação celular *in vitro* de células tronco embrionárias está ilustrado na Fig 5. Células pluripotentes foram cultivadas com o intuito de induzir a formação de corpúsculos embrionários (“*embryoid bodies*”- EB) através do método de gotas suspensas ou “Hanging Drop Method” (WOBUS et al., 1994, RUDNICK e MCBURNEY, 1987). Neste método, 800 células tronco embrionárias foram colocadas em 20 μ L de meio de cultura D-MEM para diferenciação. Este volume de 20 μ L foi colocado, sob a forma de gota suspensa em tampas de placas de Petry preenchidas com PBS (para manter a umidade

necessária para o seu desenvolvimento). Assim, foram mantidas por dois dias. Desta forma, as células começaram a formar o que chamamos de corpúsculos embrionários, que na verdade nada mais são do que agregados multicelulares, com morfologia bastante semelhante ao embrião em estágio inicial do desenvolvimento (por isso denominado de corpúsculos embrionários). Os corpúsculos embrionários foram então transferidos para placas de cultura bacteriológicas e mantidos em cultura de suspensão por 7 dias adicionais. Durante este período os EBs desenvolveram-se e passaram a apresentar características de células oriundas dos diferentes folhetos embrionários: endoderme, mesoderme e ectoderme. Ao fim deste processo as células foram plaqueadas em sistema de adesão celular para posterior análise.

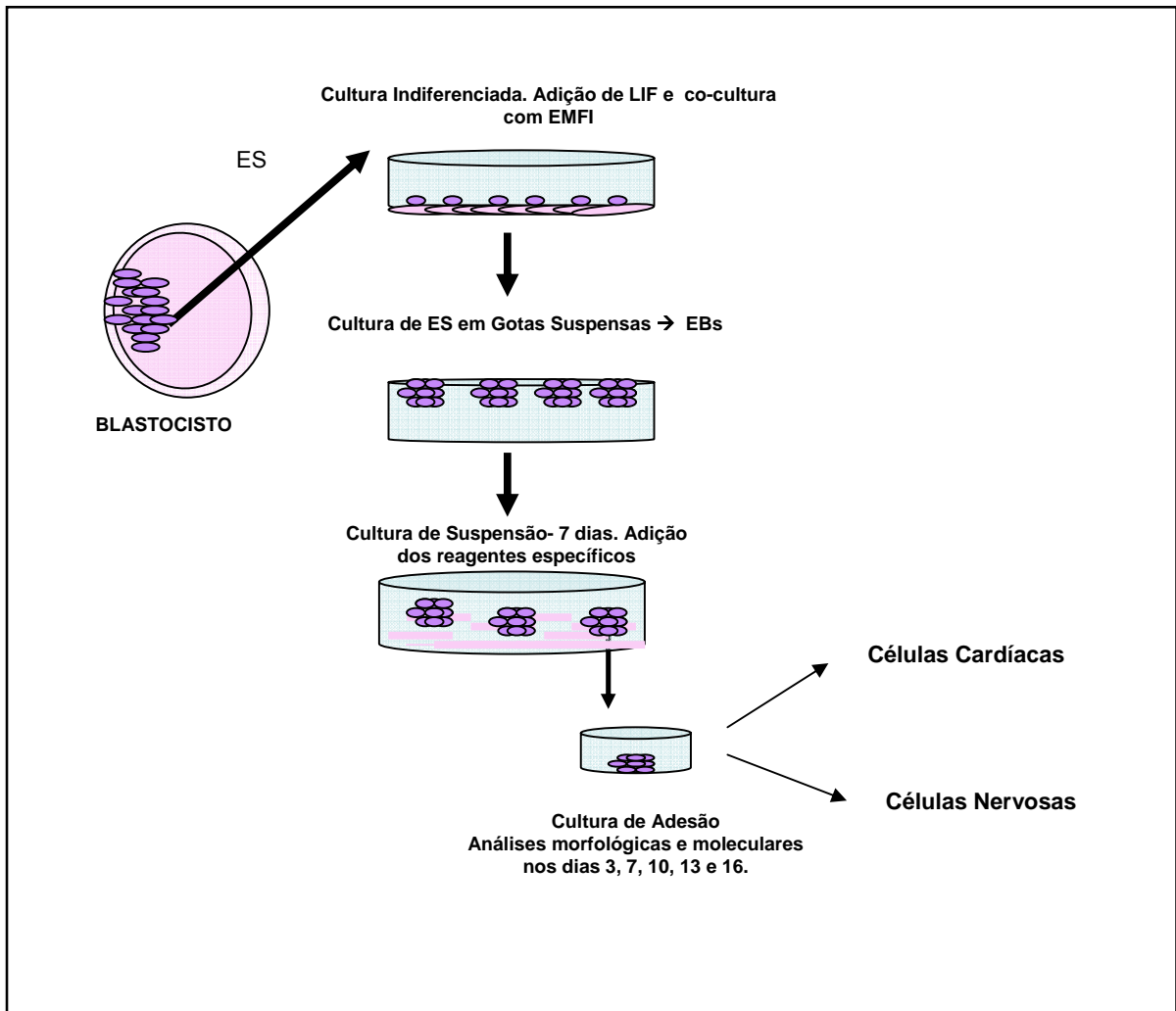


Figura 5 – Esquema do protocolo de indução de diferenciação celular através do método de Gotas Suspensas.

2.2.5 Indução de Cardiogênese

A fim de induzir o processo de diferenciação para celular das ES para majoritariamente em células cardíacas, foi utilizado meio de cultura ISCOVE. Nos dois primeiros dias da cultura de suspensão dos corpúsculos embrionários, o meio

foi enriquecido com 1% de Dimetilsulfóxido (DMSO). As células foram plaqueadas após 7 dias de cultura de suspensão.

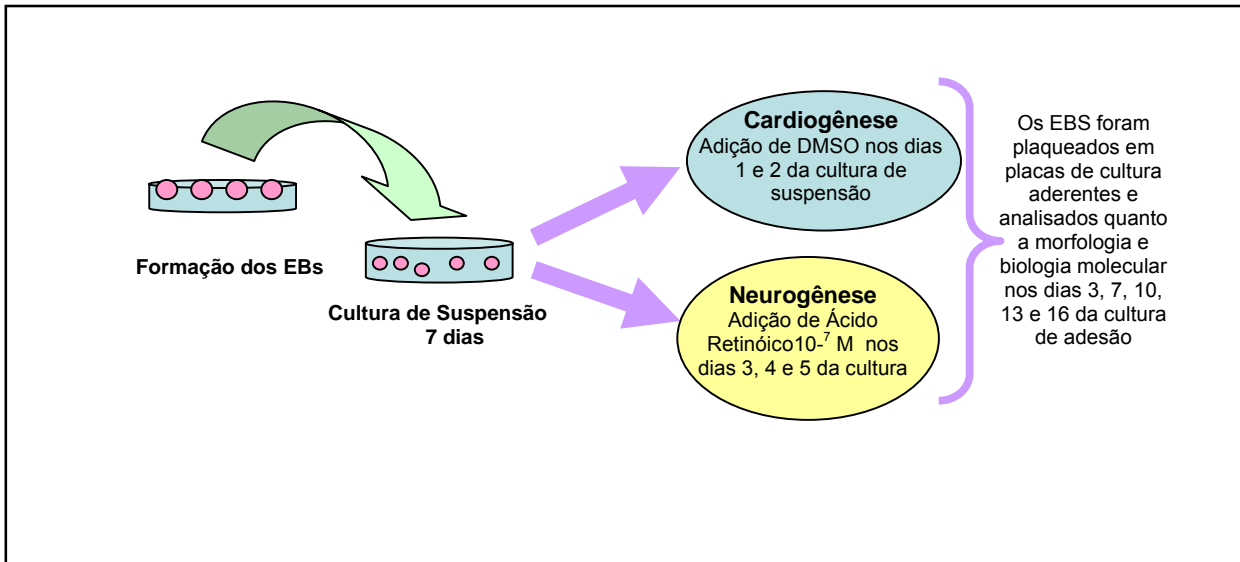


Figura 6: Esquema destacando as características específicas dos diferentes protocolos seguidos para a indução de diferenciação das ES em células cardíacas e nervosas.

2.2.6 Indução de Neurogênese

Para induzir as células ES a se diferenciarem preferencialmente em células nervosas, foi utilizado o meio de cultura ISCOVE adicionado de 10^{-7} M de Ácido Retinóico nos dias 3, 4 e 5 (período da cultura em suspensão dos EBS). As células foram plaqueadas, em sistema de adesão, no 7º dia da cultura de suspensão.

2.2.7 Procedimento para a Análise Morfológica

Uma placa de cultura de 24 poços foi previamente separada e filmada com solução estéril de 0,1% gelatina. Os corpúsculos foram plaqueados na razão de um EB por poço da placa. As placas foram incubadas a 37°C, 5%CO₂ e analisadas nos dias 3, 7, 10, 13 e 16. As células com características diferenciadas foram identificadas e fotografadas.

2.2.8 Análise Molecular

A detecção de genes, que são especificamente expressos durante o desenvolvimento de células tronco embrionárias, foi realizada através da técnica de RT-PCR com primers de tecidos específicos.

2.2.8.1 Preparação das células para as análises moleculares

Após os protocolos específicos para a indução de diferenciação celular, as células tronco embrionárias de camundongos foram coletados nos dias 3, 7, 10, 13 e 16 de cultura de adesão. As células foram lavadas em PBS e então congeladas em 400 µl de solução de lise. Todas as amostras foram mantidas a -80° C até serem processadas.

Como controle negativo, células tronco da linhagem R1 mantidas em cultura em estado indiferenciado também foram coletadas, lavadas e armazenadas da mesma forma. Como controle positivo, utilizamos RNA total extraído de coração e cérebro

de camundongos BALB/c, e posteriormente o RNA destes controles foi processado da mesma forma que o RNA das amostras oriundas das diferentes culturas celulares.

2.2.8.2 Extração do RNA Total das Células

O RNA total foi isolado através do método denominado “Single extraction method” (CHOMCZYNSKI, SACCHI, 1987). Este método baseia-se no uso de agentes caotrópicos (sal de guanidina) para a inativação de ribonucleases. As amostras que estavam até então congeladas em 400 µL de solução de lise foram descongeladas, transferidas para um novo tubo e cuidadosamente foram adicionados mais 200 µL de solução de lise. Foi adicionado então, 40 µL (1/10 volume) de acetato de sódio 2M a cada tubo e o volume resultante homogenizado. Em seguida, foi adicionado 400 µL de fenol ácido e 80 de µL clorofórmio: álcool-isoamílico (24:1). Todas as amostras foram então homogeneizadas com auxílio de vortex, e incubadas em gelo por 15 minutos. A fase orgânica e a fase aquosa foram separadas por centrifugação a 16.000 g por 10 minutos a temperatura ambiente. A fase aquosa foi cuidadosamente transferida para um novo tubo, e um igual volume de isopropanol foi adicionado, homogenizado e os tubos foram incubados por uma hora a -20°C. O pellet foi recuperado por centrifugação a 16.000 g por 10 minutos a temperatura ambiente e ressuspenso em 300 µL de solução de lise. Os pellets que apresentaram dificuldade para serem ressuspenso foram aquecidos por cerca de 10 minutos a 65°C. Um igual volume (300 µL) de isopropanol foi adicionado a cada tubo, homogeneizado e incubado a -20°C por 1 hora. O pellet de RNA foi mais uma vez recuperado por centrifugação a 16.000g por 10min a temperatura ambiente, lavado com 500 µL de etanol 75% (gelado) e

recentrifugado a 10.000g por 10 minutos. Os pellets de RNA foram deixados em capela de exaustão por 3-5 minutos para que o etanol evaporasse por completo. Finalmente, os pellets foram ressuspensos em 30 μ L de água DEPC e armazenados a -80°C . A concentração de RNA foi determinada por mensuração da densidade óptica em filtro de 260 nm (OD_{260}) utilizando a calculadora GeneQuant RNA/DNA. Foi diluído 1 μ L de RNA em 100 μ L de água DEPC a OD_{260} e a concentração de RNA foi mensurada. Todas as amostras foram ajustadas para a mesma concentração de RNA (0,2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) com água DEPC, e mensuradas novamente para garantir a precisão.

2.2.8.3 Extração de RNA total dos tecidos

Como controle positivo da expressão dos genes marcadores de cada tecido, utilizamos RNA total extraído de órgãos de camundongos adultos da linhagem BALB/c. O protocolo utilizado para a extração do RNA de tecidos apresenta uma pequena diferença com relação ao procedimento empregado para células em cultura, visto que tecidos são ricos em enzimas degradativas e, devem ser rapidamente congelados, para que não se perca o RNA. Desta forma, o animal foi sacrificado, o coração e o cérebro dissecados, e rapidamente armazenados em nitrogênio líquido. Posteriormente, os órgãos foram colocados em homogeneizador de tecido com solução de lise e macerados até se obter uma suspensão celular. A partir desta etapa, o procedimento seguiu a mesma seqüência empregada para a extração do RNA total das células em cultura.

2.2.8.4 Reação com a Transcriptase Reversa

O mRNA foi transcrito de forma reversa, utilizando-se um primer com cauda de poli T Oligo d(T)₁₆, gerando a fita de DNA complementar. Foram realizadas reações de 20 µL utilizando-se tubos eppendorf de 0,5mL. Cada tubo recebeu a mesma quantidade de RNA (1 µL em 5 µL de água DEPC) e 15 µL do RT-master mix. As reações foram mantidas por uma hora a 42°C, 5 minutos a 99°C, resfriados a 4°C e armazenados a -20°C até o uso.

2.2.8.5 Reação da Polimerase em Cadeia (PCR)

Reações com volume de 50 µL foram realizadas utilizando-se tubos eppendorf de 0,5 mL. PCR mastermix foi preparado e 3,0 µL da reação com a transcriptase reversa foram utilizados como DNA molde. Para a reação de PCR foram adicionados 47 µL do master mix e 3,0 µL de cada amostra. O número de ciclos variou de 35-40 dependendo do gene. As condições da reação variaram conforme os primers descritos na Tabela 2. De modo geral, as condições foram: desnaturação, a 95°C por 40 segundos; anelamento, a 60-64°C por 40 segundos; e extensão a 72°C por 50 segundos.

Tabela 2: Condições de PCR para os Primers dos Genes Específicos Testados

NOME	TEMPERATURA DE ANELAMENTO	NÚMERO DE CICLOS
β - TUBULINA	63° C	40 ciclos
α - MHC	64° C	35 ciclos
NEURO 68	63° C	40 ciclos
SINAPTOFISINA	60° C	40 ciclos

2.2.8.6 Eletroforese

De cada reação de PCR, um volume de 10 μ L foi eletroforeticamente separado em géis de agarose 2% em 1X TBE contendo 0,35 μ g/mL de brometo de etídio. As condições de corrida foram 70 V e aproximadamente 100 minutos. Após a corrida eletroforética, os géis foram submetidos à luz UV e a imagem foi digitalizada para posterior análise.

3. RESULTADOS

3.1 Obtenção de Fibroblastos Embrionários

A técnica foi empregada e resultou na obtenção de uma quantidade bastante satisfatória de fibroblastos embrionários. Células estas que foram suficientes para a realização das etapas de cultura de células ES sob a forma indiferenciada para os experimentos de indução de diferenciação in vitro células tronco embrionárias de camundongos. Ainda, o excedente foi armazenado em nitrogênio líquido para futuros experimentos. De forma que este passo não precisará ser repetido, em nosso laboratório, pelos próximos anos, devido a enorme quantidade de EMFI obtidas durante este procedimento. Além disso vale ressaltar que as co-cultura com as EMFIs obtidas por nós nesta etapa, resultaram na expansão de células ES, na forma indiferenciada, confirmando a capacidade das EMFI obtidas, de secretarem fatores inibidores de diferenciação celular.

3.2 Estabelecimento da Rotina de Manutenção de Células ES na Forma Indiferenciada

Foi realizada a cultura das células ES de camundongos sob a forma indiferenciada por aproximadamente duas semanas. O meio utilizado, descrito anteriormente, conforme bibliografia, e todas as condições de cultura foram respeitadas. Assim, todos os nutrientes e fatores de crescimento foram cuidadosamente aplicados. O tempo de cultura em estado indiferenciado também seguiu o indicado pela bibliografia, e foram evitadas as células tronco com mais de 48h de cultivo. Células ES em cultura por mais de 48 horas sem tripsinização, (mesmo na presença de fatores inibitórios e em co-cultura com fibroblastos) apresentam indícios de diferenciação celular. A cultura de células ES em estado indiferenciado obtida por nós, pode ser considerada ótima, na medida em que conseguimos expandi-las e mantê-las sob a forma indiferenciada, sem observamos qualquer indício de que estivesse ocorrendo diferenciação celular. Assim durante a análise morfológica das células ES em cultura indiferenciada, não se observou fenótipo anormal, isto é, as células mantiveram-se com as mesmas características que possuíam no início da cultura, indicando que, como o esperado, não houve diferenciação celular nesta etapa.

3.3 Análise Morfológica da Diferenciação de Células ES para Células Cardíacas

A partir do protocolo específico para indução de diferenciação celular das ES embrionárias em células cardíacas, os seguintes resultados foram obtidos: os primeiros indícios de diferenciação celular, apresentando morfologia de células cardíacas, apareceram com 2 dias de cultura de adesão. Além das diferenças morfológicas apresentadas pelas células, pode-se observar também, a contração espontânea de conjuntos de células, indicando que a diferenciação das células tronco embrionárias em células cardíacas não só se dá quanto ao aspecto morfológico, mas também, e principalmente quanto ao aspecto funcional.

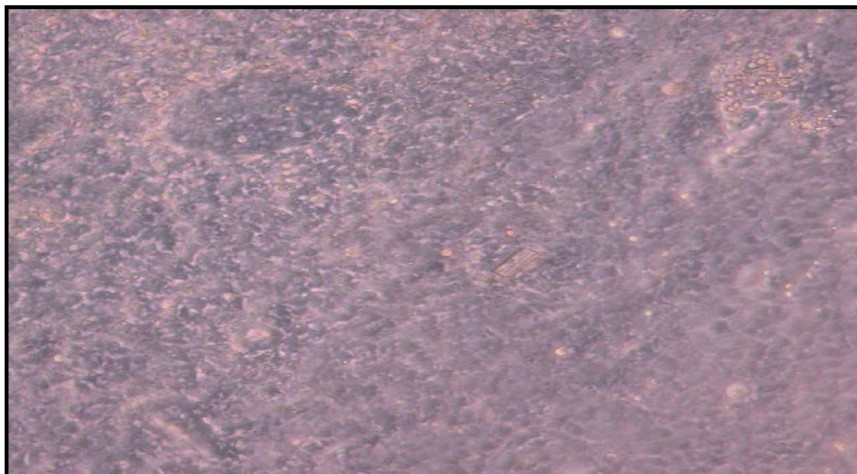


Figura 7- Fotografia de células ES diferenciadas em células cardíacas. Aumento de 400X , 7º dia em cultura.

3.4 Análise Morfológica da Diferenciação de Células ES para Células Nervosas

Após o protocolo específico de indução diferenciação de células tronco embrionárias de camundongos em células nervosas, foi possível observar a diferenciação celular a partir do 8º dia em cultura. A diferenciação inicialmente foi constatada através das características morfológicas das células. Puderam ser evidenciadas características como núcleo grande e arredondado, células estreladas apresentando uma extremidade prolongada indicando a morfologia de neurônios (Fig. 8). O processo de diferenciação celular se estendeu do oitavo dia em cultura até o 15º dia de cultura de adesão, apresentando um sensível aumento na quantidade de células diferenciadas com o passar do tempo.

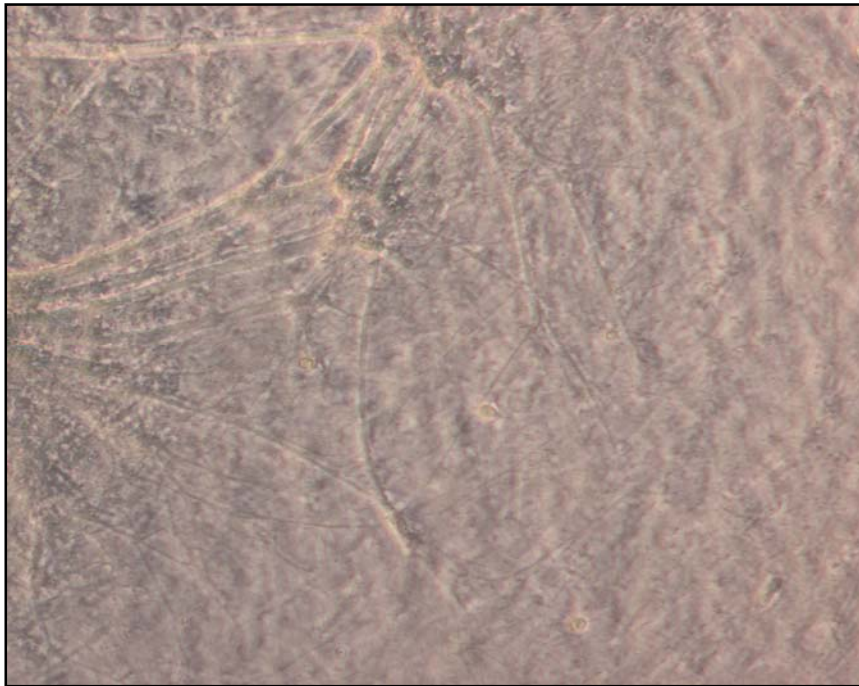


Figura. 8- Fotografia de células tronco diferenciadas em células nervosas. 13º dia de cultura de adesão, foto retirada com objetiva de 400X.

3.5 RNA Total Obtido das Diferentes Amostras

O “single step extraction method” se mostrou uma excelente alternativa para extração de RNA das células, e dos tecidos (utilizados como controles), já que apresenta baixo custo e produziu ótimos resultados não, só no que tange a quantidade do RNA obtido, mas também, e principalmente quanto a integridade de RNA obtido. A tabela a seguir demonstra os valores encontrados a partir da mensuração do RNA total na calculadora GeneQuant.

Tabela 3: Resultados da quantificação do RNA obtido.

Amotra	Quantificação de RNA em µg /mL
Células R1 sem diferenciação	205
R1 d3 diferenciação cardíaca	213
R1 d7 diferenciação cardíaca	230
R1 d10 diferenciação cardíaca	200
R1 d13 diferenciação cardíaca	198
R1 d16 diferenciação cardíaca	220
Tecido cardíaco (controle)	549
R1 d3 diferenciação nervosa	209
R1 d7 diferenciação nervosa	215
R1 d10 diferenciação nervosa	198
R1 d13 diferenciação nervosa	200
R1 d16 diferenciação nervosa	225
Tecido nervoso	480

Obs: dx = x dia após o processo de indução de diferenciação.

3.6 Integridade do RNA Obtido

A integridade do RNA obtido pode ser demonstrada através da imagem digitalizada de algumas amostras em gel de agarose, onde se pode evidenciar a presença de duas bandas, indicando as subunidades 28 e 18 S do RNA obtido.

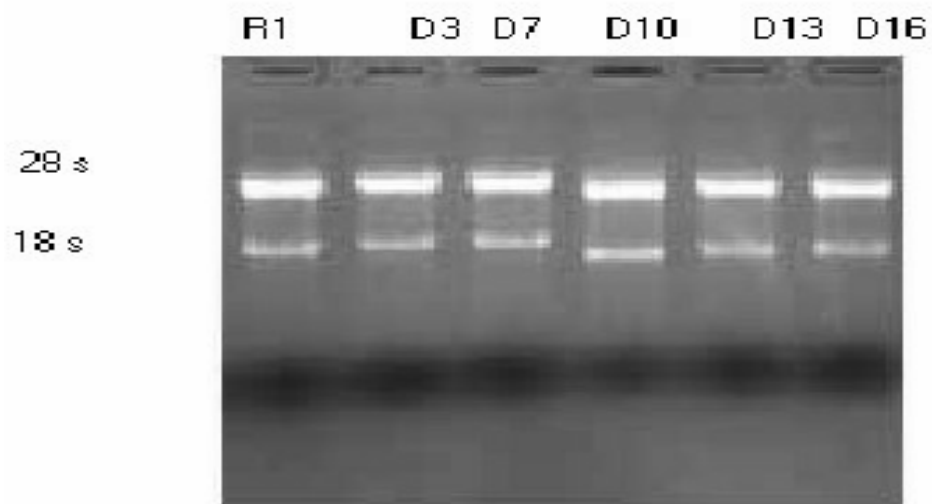


Figura 9- Demonstrando a presença de 2 bandas distintas em gel de agarose 1% indicando a presença das duas sub-unidades 28 e 18S comprovando a integridade do RNA extraído.

3.7 Comprovação da Eficiência da Técnica de RT-PCR

Depois da reação com a enzima transcriptase reversa e a conseqüente obtenção de cDNA das amostras, foi realizada a primeira reação da polimerase em cadeia para o gene da β -tubulina proteína do citoesqueleto celular, utilizada como controle positivo interno, confirmando a eficiência do processo de obtenção do cDNA. Na imagem digitalizada pode-se evidenciar a amplificação do gene de 317 pares de bases correspondente à seqüência da β -tubulina (Fig.10)

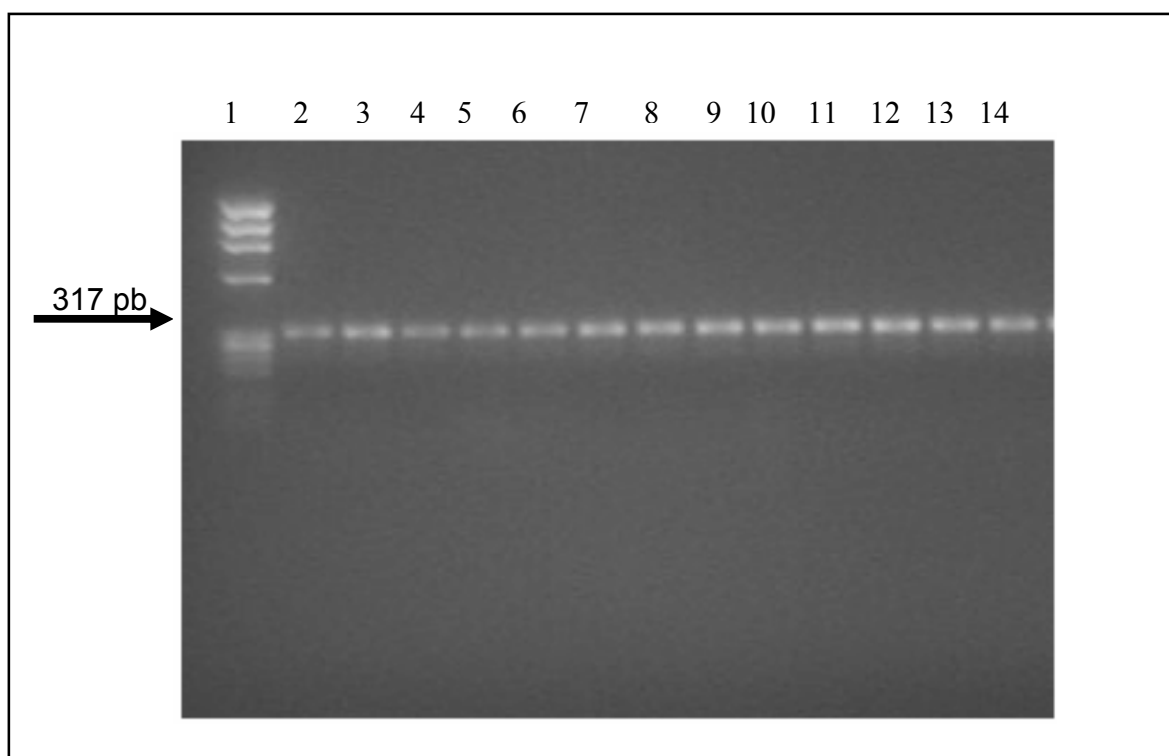


Figura 10- Imagem digitalizada de gel de agarose 2% com o resultado do PCR para o gene da betatubulina, proteína de citoesqueleto, utilizada como controle positivo para a integridade das amostras. Amostras 1- marcador de peso molecular de 100kb, 2 – 14 cDNA das amostras.

3.8 Comprovação Molecular da Diferenciação de Células ES para Células Cardíacas

A diferenciação das células tronco embrionárias em células cardíacas pode ser comprovada molecularmente através da detecção da expressão da seqüência correspondente ao gene α -MHC (α - miosin heavy chain) que possui 301 pb, e é expresso exclusivamente em tecidos cardíacos. Na Figura 11, pode ser observada: na primeira canaleta o marcador de peso molecular de 100 Kb; na segunda canaleta, aplicamos somente água, como controle negativo; na terceira canaleta, também com resultado negativo para a expressão do gene temos cDNA das células tronco R1 cultivadas sob o sistema de não indução de diferenciação celular. Nas canaletas seguintes colocamos cDNA das células que sofreram indução de diferenciação nos dias 3, 7, 10, 13 e 16. É interessante observar que a banda indicando a expressão do gene α -MHC é fraca no início da diferenciação e vai se tornando mais forte com o decorrer dos dias em cultura. Esta observação indica que, possivelmente, houve uma maior expressão do gene α -MHC típico de células cardíacas. Finalmente, na última canaleta a amostra é de cDNA extraído de órgão (coração) de camundongo adulto jovem como controle positivo para a expressão do gene.

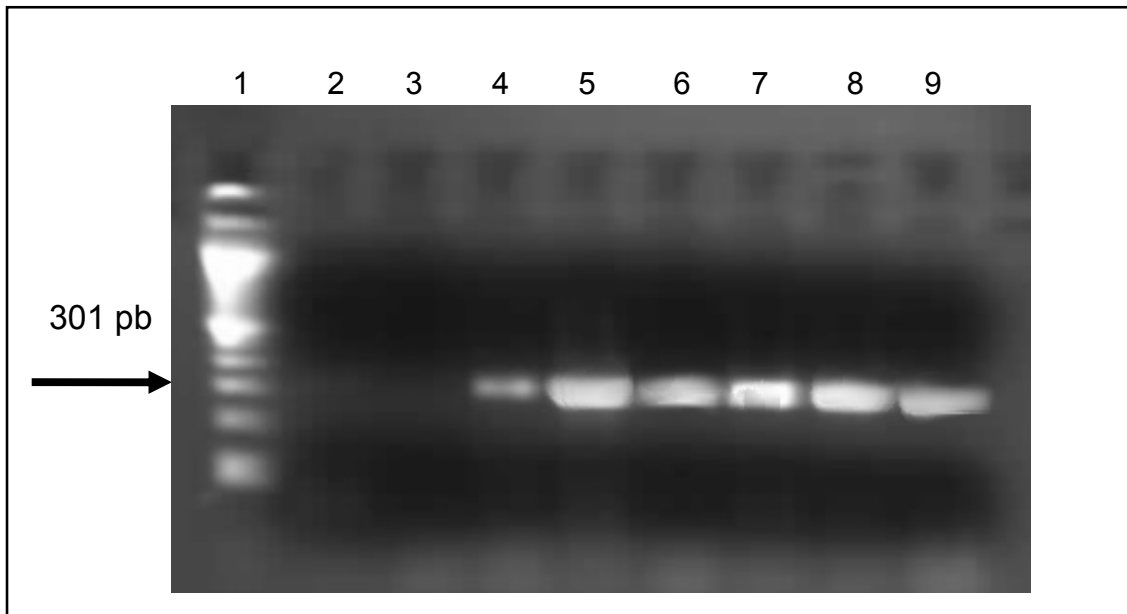


Figura 11. Imagem digitalizada do gel de agarose 2% onde foi aplicado o produto do PCR para o gene α -MHC.

3.9 Comprovação Molecular da Diferenciação de Células ES em Células Nervosas Através da Expressão do Gene Sinaptofisina.

Para a comprovação molecular da diferenciação das células tronco embrionárias em células nervosas, foram testadas a expressão de 2 genes específicos do tecido nervoso. O primeiro gene testado foi para a expressão do gene codificante para a Sinaptofisina, proteína necessária para a realização de sinapses entre os neurônios. Nossos resultados demonstraram claramente a expressão do gene, que codifica para esta proteína, nas células tronco que sofreram indução de diferenciação quando comparadas com os controle negativos (R1 indiferenciada). No controle positivo (cDNA de cérebro de camundongos), conforme esperado, foi evidenciada a expressão do referido gene (Fig 12).

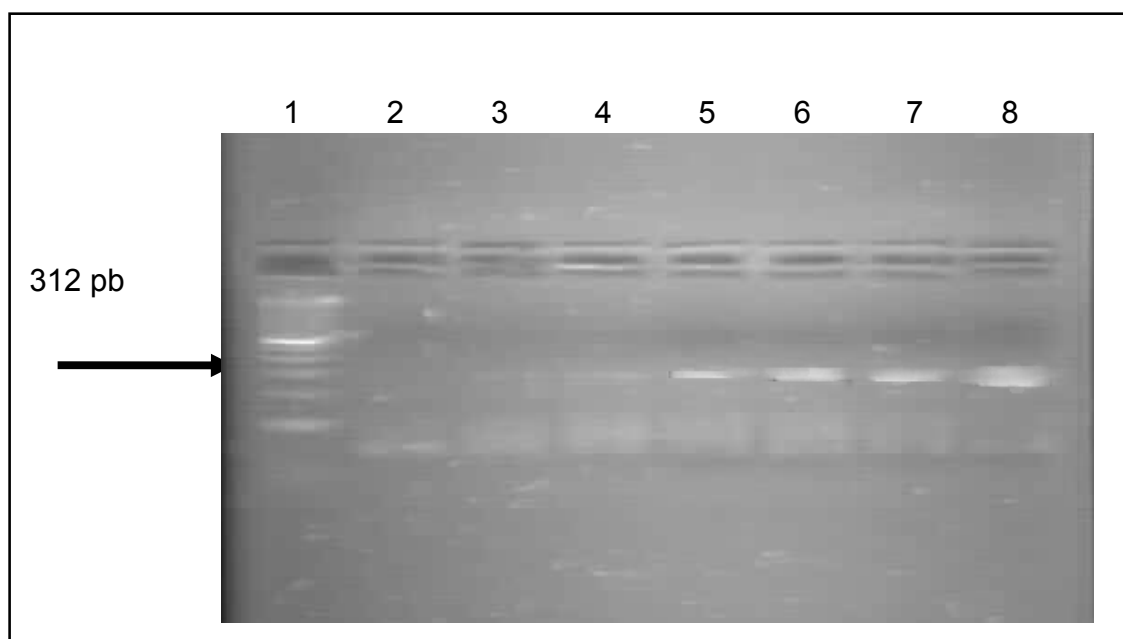


Figura 12: Gel de agarose 2% com os resultados do PCR para o gene da Sinaptofisina. Primeira canaleta: marcador de peso molecular de 100kb, segunda canaleta cDNA de células ES sem diferenciação, canaletas 3, 4, 5, 6 e 7 células diferenciadas respectivamente nos dias 3, 7, 10, 13 e 16. Na canaleta o controle positivo para a expressão do gene, cDNA de camundongo adulto jovem.

3.10 Comprovação Molecular da Diferenciação de Células ES em Células Nervosas Através da Expressão do Gene Neuro 68

A fim de comprovar a eficiência do processo de indução de diferenciação das células tronco embrionárias em células nervosas *in vitro*, foi testada ainda, ainda a expressão de outro gene característico de tecido nervoso. O Neuro 68 de 140 pb. Os resultados obtidos com esta análise foram bastante semelhantes com os resultados obtidos anteriormente (para o gene da sinaptofisina). Obtivemos a amplificação do gene Neuro 68 nas células que sofreram indução de diferenciação, bem como no controle positivo (cérebro). Nos controles negativos (água e células tronco R1 indiferenciadas) não se observa a formação da banda, indicando a não expressão do referido gene(Fig. 13).

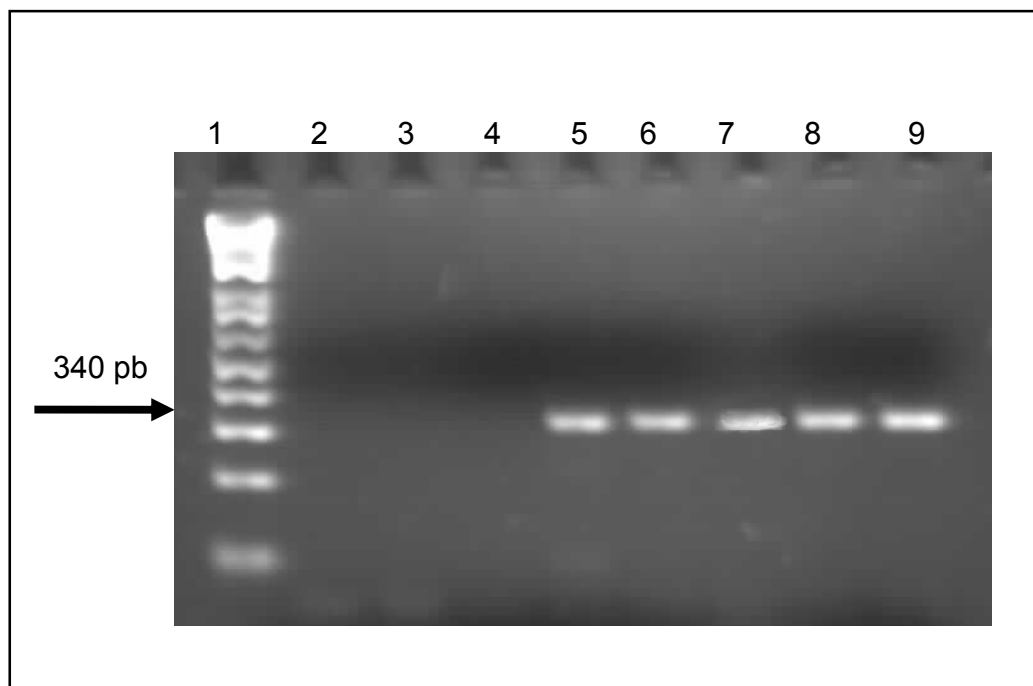


Figura 13: Gel de agarose 2% com o resultado da amplificação do gene codificante para a proteína de neurofilamento de 68 kilodaltons (Neuro 68). Na primeira canaleta está o marcador de peso molecular de 100 kb, segunda terceira canaletas, controles negativos para a expressão do gene (água e células ES R1 indiferenciadas). Canaletas 4, 5, 6,7, 8 células induzidas a diferenciação *in vitro* nos dias 3, 7, 10, 13 e 16. Canaleta 9 controle positivo, cDNA de cérebro de camundongo BALB/c adulto jovem.

4. DISCUSSÃO

Seguindo o objetivo do presente trabalho, e conforme demonstrado nos resultados obtidos, foi possível estabelecermos a rotina de cultura de células tronco embrionárias pela primeira vez na UFRGS. Esta rotina implica no estabelecimento da manutenção e expansão das células tronco embrionárias *in vitro* no sistema indiferenciado, ou seja, situação onde as células tronco embrionárias podem se multiplicar mantendo as características de células pluripotentes indiferenciadas. Para tanto, existem condições específicas necessárias para a multiplicação celular, sem que estas entrem em sistema de diferenciação. A co-cultura das células ES com fibroblastos embrionários e em presença de LIF permite que as células ES possam ser expandidas na condição de não indução de diferenciação. O estabelecimento desta etapa é fundamental a fim de possibilitar a expansão de linhagens de células ES já obtidas, oportunizando a utilização destas em diferentes experimentos. Desta forma, o estabelecimento da rotina de expansão de células ES, na forma indiferenciada, foi, não só, fundamental para a execução do presente trabalho, assim como é essencial para a realização de futuros projetos experimentais a serem desenvolvidos em nossa Universidade.

Vale ressaltar, que esta característica das células ES de poderem ser expandidas *in vitro* na forma indiferenciada, ou seja, mantendo suas características de pluripotencialidade, é típica das células tronco embrionárias. O que as torna ferramenta de trabalho fundamental para estudos de indução de diferenciação celular, uma vez que a partir de um pequeno número de células, obtidas de blastocistos, e diferentes espécies animais, pode-se obter quantidades quase infinitas de células (WOBUS, 2000) para experimentação. Esta é uma vantagem que as células tronco embrionárias possuem, quando comparadas com as células tronco adultas. Uma vez que, as células tronco adultas são encontradas em quantidades ínfimas em

diferentes tecidos e estas realizam pouquíssimos ciclos de divisão celular *in vitro*, quando adequadamente estimulada (GAGE, 1998). Conforme descrito por Devine et al., 2003, as células tronco adultas foram capazes de realizar entre 20 e 50 ciclos de divisão celular *in vitro*, sendo que a partir deste estágio, estas ainda mantinham sua capacidade de se diferenciar em alguns tipos celulares (revisado em Lakshmiathy e Verfaillie em 2005). Sem dúvida, este é um grande feito, para a pesquisa em células tronco adultas que, até então, tinham sido descritas, segundo revisão realizada por Weissman em 2000, como células incapazes de ser mantidas por longo tempo, em estado indiferenciado, sem que seu potencial de diferenciação fosse perdido. Contudo, nos cabe ressaltar aqui, mais uma vez, a vantagem de utilizar células tronco embrionárias, que podem ser expandidas infinitamente *in vitro*, mantendo seu cariótipo estável e sua enorme plasticidade, em contraste com as células tronco adultas, que não apresentam as mesmas características. Desta forma, a capacidade de desenvolver o cultivo das ES em estado indiferenciado, em nosso laboratório (adquirida durante o desenvolvimento do presente estudo), nos permite utilizar estas células, e suas já citadas características, como fonte para futuros projetos a serem desenvolvidos por nosso grupo de pesquisa.

Uma vez estabelecida a rotina de manutenção das células ES *in vitro* em sistema de não indução de diferenciação celular, procedemos experimentos visando a indução de diferenciação celular *in vitro* de células ES, a fim de produzir culturas de células enriquecidas em células cardíacas e nervosas. Para tanto, utilizamos o protocolo denominado de “Hanging drops” ou “gotas suspensas”, descrito por Wobus et al., 1984. Este protocolo tem como princípio induzir a agregação física de células ES na ausência de LIF e EMFI. A ausência de LIF e EMFI gera uma condição onde não estão presentes os fatores inibidores da diferenciação celular. Assim, as células ES, em gotas suspensas,

formam agregados celulares denominados “corpúsculos embrionários (“EBs”), que iniciam o processo de diferenciação celular. Desta forma, seguindo composições adequadas de condições de cultura (conforme descrito anteriormente), o processo de diferenciação celular é direcionado preferencialmente para a produção de tipos celulares específicos.

No presente trabalho, utilizamos formulações de meio de cultura pré-definidos, que visavam conduzir o processo de diferenciação celular para células cardíacas e nervosas, conforme descrito por Guan et al., em 1999a e 1999b. A fim de avaliar o processo de indução de diferenciação celular, uma avaliação morfológica das características das células em cultura foi realizada com o auxílio de microscópio invertido. Além disso, o sucesso do processo de indução de diferenciação celular das células ES em células cardíacas e nervosas, foi confirmado através da análise da expressão de seqüências de DNA, através da detecção de seqüências de RNA mensageiro, que uma vez transcritos codificariam proteínas específicas de tecido cardíaco e nervoso. Através de avaliações moleculares foi possível demonstrar a indução da diferenciação de células ES para, majoritariamente, células cardíacas e nervosas, através da amplificação dos genes que codificam as proteínas específicas de cada tipo celular (cardíaco e nervoso). Os resultados encontrados, Figs 11,12 e 13 (géis MHC, sinaptofisina e Neuro 68) confirmaram os dados da literatura (GUAN et al. 1999), demonstrando que o processo de cultura celular de células tronco embrionárias na forma indiferenciada foi realizado com sucesso, e que o processo de cultura destas com indução de diferenciação celular foi realizado de forma adequada. Além disso, vale ressaltar que a cinética de expressão gênica das seqüências, por nós analisadas, aumenta com o decorrer do tempo em cultura. Neste caso, supõem-se que um maior número de moléculas de RNAm foi encontrado nas células submetidas a diferenciação por um maior período de tempo. Este dado poderia ser comprovado, se fosse utilizada a técnica de “Real

Time PCR”, onde as moléculas de DNA cópia poderiam ser quantificadas. Considerando que a técnica de “Real Time PCR” não encontrava-se disponível, de forma rotineira, em nosso laboratório, esta não pôde ser empregada durante o desenvolvimento deste trabalho. Contudo, a técnica de “Real Time PCR” deverá ser utilizada nos próximos experimentos, de nosso grupo, para que, realmente, se possa determinar quantas células ES foram induzidas a se diferenciar em determinados tipos celulares durante os experimentos.

Considerando os objetivos deste trabalho e os resultados obtidos, podemos concluir que todos os objetivos propostos foram atingidos, uma vez que foram produzidas culturas de células ES enriquecidas em células cardíacas e nervosas. Conseqüentemente, encontra-se estabelecida em nosso laboratório, nesta Universidade, a técnica de manutenção de células tronco embrionárias de camundongos *in vitro* nas formas de indução, e não indução de diferenciação celular. Estas técnicas possibilitaram não só a obtenção das culturas enriquecidas em células cardíacas e nervosas, descritas no presente trabalho, assim como possibilitaram o desenvolvimento de novos projetos de pesquisa. Vale ressaltar, que em outubro último, nosso grupo obteve a aprovação de um novo projeto de colaboração internacional, com o grupo do Genzentrum da Ludwig Maximilian Universitat, de Munique, Alemanha, onde estão sendo realizados experimentos para estabelecer condições ótimas para a produção de culturas de células ES enriquecidas em células betapancreáticas. Paralelamente, outras colaborações têm sido estabelecidas visando a produção de culturas de células tronco embrionárias enriquecidas em diferentes tipos celulares, visando estudos futuros de terapia celular.

5. CONCLUSÕES

- I- A técnica de obtenção de fibroblastos embrionários de camundongos foi implementada com sucesso, uma vez que, altas concentrações de EMFI foram obtidas. Uma parcela destas foi utilizada no co-cultivo com as células ES, quando inibiram a diferenciação celular das células ES de forma eficaz. Vale ressaltar que, várias amostras suplementares destas células encontram-se criopreservadas em nosso laboratório.

- II- O cultivo das células tronco embrionárias, sob a forma indiferenciada, foi realizado de forma pioneira através do presente trabalho em nossa Universidade. E, hoje, esta é uma técnica realizada de forma rotineira em nossos laboratórios.

- III- A partir do estabelecimento das técnicas, descritas acima, e seguindo protocolos específicos, obtivemos sucesso no processo de indução de diferenciação *in vitro* de células tronco embrionárias de camundongos para células cardíacas e nervosas.

- IV- A análise molecular mostrou-se eficiente para evidenciar a expressão de genes típicos de células cardíacas e nervosas, comprovando o sucesso do procedimento de indução de diferenciação celular de células ES de camundongos em cultura.

- V- Foi possível ainda evidenciar, através da técnica de RT-PCR, um aumento progressivo da expressão gênica dos marcadores cardíacos e nervosos com o decorrer da cultura das células ES.
- VI- Os resultados obtidos, em nossos experimentos, encontram-se em concordância com os dados descritos na literatura internacional, o que comprova a real aquisição do domínio da técnica de diferenciação *in vitro* de células ES. Incluindo assim, nossa Universidade no seleto grupo de Instituições de Ensino e Pesquisa, que possuem competência para lançar mão de tal ferramenta de trabalho para diferentes projetos de pesquisa.
- VII- A aquisição de conhecimento para interferir no processo de diferenciação celular de células tronco ES, abre novas perspectivas científicas. Um maior conhecimento e domínio do processo de indução de diferenciação celular são necessários, a fim de que futuras aplicações práticas possam ser realizadas com a utilização de determinados tipos celulares produzidos, como por exemplo, a produção de células *in vitro* para terapia celular.
- VIII- Além de contribuir para uma maior compreensão dos mecanismos de diferenciação celular, a maior compreensão sobre a biologia das células tronco embrionárias, viabilizará a aquisição de novos conhecimentos. Além disso, possibilitará a participação de nosso grupo de pesquisa em atividades paralelas, procurando desenvolver diferentes projetos abordando, não só os mecanismos de diferenciação das células ES, mas também estudos enfocando os processos

envolvidos no desenvolvimento de embriões. Ainda, os modelos de cultura de células ES podem ser utilizados como um sistema de testes *in vitro* para a realização de ensaios citotóxicos, assim como, para o desenvolvimento de novos procedimentos terapêuticos. Finalmente, novas linhagens de células ES de diferentes espécies animais deverão ser estabelecidas, a fim de possibilitar novas abordagens científicas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE, K., NIWA, H., IWASE, K., TAKIGUCHI, M. MORI, M., ABE, S.I., IMAMURA, K.I. Endoderme-specific gene expression in embryonic stem cells differentiated to embryoid bodies. **Experimental Cell Research**, **229- 27**. 1996.

AMIT, M., CARPENTER, M.K., INOKUMA, M.S., CHIU, C.P., HARRIS, C. P., WAKNITZ, M.A., ITSKOVITZ-ELDOR, J., AND THOMSON, J.A. Clonally derived human embryonic stem cell lines maintain pluripotency and proliferative potential for prolonged periods of culture. **Developmental Biology** **227**, **27127-27128**. 2000.

BARBERI, T., KLIVENY, P., CALINGASAN, N.Y., KAWAMATA, H., LOONAM, K. Neural subtype specification of fertilization and nuclear transfer embryonic stem cells and applications in parkinsoniam mice. **Nature Biotechnology** **21**, **1200**. 2003.

BLAU, H.M., BRAZELTON, T.R., WEIMANN J.M. The evolving concept of a stem cell: entity or function? **Cell** **105**, **829**. 2001.

BOHELER, K.R., CZYZ, J., TWEDDIE, D., YANG, H.T., ANISIMOV, S.V., WOBUS, A.M. Differentiation of pluripotent embryonic stem cell into cardiomyocytes. **Circulation Research** **91**, **189**. 2002.

BRADLEY,A., EVANS,M., KAUFMAN,M.H., AND ROBERTSON, E. Formation of germ line chimeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines. **Nature** **309**,**255-256**. 1984.

CHAO, N.J., EMERSON S.G, WEINBERG K.I. Stem cell transplantation (cord blood transplants). **Hematology (American Society Hematology Education Program)**, **354-371**. 2004.

CHEN, U., KOSCO, M. Differentiation of mouse embryonic stem cells in vitro: III. Morphological evaluation of tissues developed after implantation of differentiated mouse embryoid bodies. **Developmental Dynamics**, **Jul;197(3):217-26**. 1993.

CHIBA, S., IWASAKI, Y., SEKINO, H., SUZUKI, N. Transplantation of motoneuron-enriched neural cells derived from mouse embryonic stem cells improves motor function on hemiplegic mice. **Cell Transplantation** **12**, **457**. 2003.

CHOMCZYNSKI, P., SACCHI, N. Single step method for RNA isolation by guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. **Anal Biochemistry** **162**, **156-159**. 1987.

DEVINE, S.M., COBBS, C., JEMMINGS, M., BARTTHOLOMEW, A., HOFFMAN, R. Mesenchymal stem cells distribute to a wide range of tissues following systemic infusion into nonhuman primates. **Blood** **101**, **2999- 3001**. 2003.

DOETSCHMAN, T.C., EISTETTER, H.R., KATZ, M., SCHMIDT, W. AND KEMLER, R. The *in vitro* development of blastocyst-derived embryonic stem cell lines: formation of visceral yolk sac, blood islands and myocardium. **Journal of Embryology Experimental Morphology** **87**, **27-45**. 1985.

DRUKKER, M., KATZ, G., URBACH, A., SCHULDINER, M., MARKEL, G., ITSKOVITZ-ELDOR, J., REUBINOFF, B., MANDELBOIM, O., BENVENISTY, N. Characterization of the expression of MHC proteins in human embryonic stem cells. **Proceedings of the National Academic Science of the United States**. **99(15):9864-9**. 2002.

DULBECCO, R., VOGT, M. Plaque formation and isolation of pure lines with polyomelitis viruses. **Journal of Experimental Medicine**. **99**: **167-182**. 1954

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

GAGE, F.H. Cell therapy. **Nature** **392**, **18-24**. 1998.

GRAVES, K.H., AND MOREADITH, R.W. Derivation and characterization of putative pluripotential embryonic stem cells from pre-implantation rabbit embryos. **Molecular Reproduction Development** **36**,**424-433**. 1993.

GUAN, K., FÜRST, D.O., WOBUS, A.M. Modulation of sarcomere organization during embryonic stem cell-derived cardiomyocyte differentiation. **European Journal of Cell Biology** **78**, **813-823**. 1999a.

GUAN, K., ROHWEDEL, J., WOBUS, A.M. Embryonic stem cell differentiation model: cardiogenesis, myogenesis, neurogenesis, epithelial and vascular smooth muscle cell differentiation *in vitro*. **Cytotechnology** **30**, **211-226**. 1999b.

HOVATTA, O., MIKKOLA, M., GERTOW, K., STROMBERG, A.M., INZUNZA, J., HREINSSON, J., ROZELL, B., BLENNOW, E., ANDANG, M., AHRLUND-RICHTER L. A culture system using human foreskin fibroblasts as feeder cells allows production of human embryonic stem cells. **Human Reproduction**. Jul;18(7):1404-9, 2003.

JOHKURA, K., CUI, L., SUZUKI, A., TENG, R., KAMIYOSHI, A., OKAMURA, S., KUBOTA, S., ZHAO, X., ASANUMA, K., OKOUCHI, Y., OGIWARA, N., TAGAWA, Y., SASAKI, K. Survival and function of mouse embryonic stem cell-derived cardiomyocytes in ectopic transplants. **Cardiovascular Research**, **58** – 435. 2003.

KELLER, G.M. *In vitro* differentiation of embryonic stem cells. **Current Opinion on Cell Biology**, **7** – 862. 1995

LABOSKY, P.A., BARLOW, D.P., AND HOGAN, B.M.L. Mouse embryonic germ (EG) cell lines: transmission through the germ line and differences in the methylation imprint of insulin-like growth factor 2 receptor (*Igf2r*) gene compared with embryonic stem(ES) cell lines. **Development** **120**, 3197-3204. 1994.

LAKSHMIPATHY, U. AND VERFAILLIE, C. Stem cell plasticity. **Blood Reviews** **16**, 29-38. 2005.

LAMMER, E.J., CHEN, D.T., HOAR, R.M., AGNISH, N.D., BENKE, P.J., BRAUN, J.T., CURRY, C.J., FERNHOFF, P.M., GRIX, A.W. JR., LOTT, I.T., RICHARD, J.M., SUN, S.C. Retinoic Acid embryopathy. **New England Journal of Medicine** **313**, 897-841. 1985.

LAVKER, R.M. e SUN, T.T. Epidermal stem cells properties markers and location. **Proceedings of the national Academic Science USA** **5;97(25):13473-5**. 2000

MARTIN, G. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. **Proceedings of the National Academic of Sciences of the United States** **78**, 7634-7638. 1981.

MARTIN, G.R. AND EVANS, M.J. Differentiation of clonal lines of teratocarcinoma cells: formation of embryoid bodies *in vitro*. **Proceedings of the National Academic of Sciences of the United States** **72**, 1441-1445. 1975.

MITALIPOVA, M., CALHOUN, J., SHIN, S., WININGER, D., SCHULZ, T., NOGGLE, S., VENABLE, A., LYONS, I., ROBINS, A., STICE, S. Human embryonic stem cell lines derived from discarded embryos. **Stem Cells**, **21(5):521-6**. 2003.

MORRISON, S.J. Stem cell potential: can anything make anything? **Current Biology**, **Jan 9;11(1):R7-9**. 2001.

MUMMERY, C. OOSTWAARD, D.W., DOEVEDANS, P., SPISKER, R., VAN DEN BRINK, S., HASSINK, R., VAN DER HEYDEN, M., OPTHOF, T., DE LA RIVIERE, A.B., PASSIER, R., TERTOOLEN, L. Differentiation of human embryonic stem cells to cardiomyocytes: role of co-culture with visceral endoderm-like cells. **Circulation** **107**, 2733. 2003.

NAGY, A., ROSSANT, J., NAGY, R., ABRAMOW-NEWERLY, W. AND RODER, J.C. Derivation of completely cell culture-derived mice from early passage embryonic stem cells. **Proceedings of the National Academic of Sciences of the United States** **90**, 8424-8428. 1993.

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

PRELLE, K., VASSILIEV, I.M., VASSILIEVA, S.G., WOLF, E., WOBUS, A.M. Establishment of pluripotent cell lines from vertebrate species- present status and future prospects. **Cell Tissues Organs** **165**, 220-236. 1999.

PRELLE, K., WOBBUS, A.M., KREBS, O., BLUM, W.F. Overexpression of insulin-like growth factor-II in mouse embryonic stem cells promotes myogenic differentiation. **Biochemistry and Biophysics Research Communication**. **2**;277(3):631-8. 2001

PRELLE, K., ZINK, N., WOLF, E. Pluripotent stem cells- model or embryonic development, tool for gene targeting, ad basis of cell therapy. **Anatomy Histology Embryology** **31**, 169-186. 2002.

RIPPON, H.J., BISHOP, A.E. Embryonic stem cells. **Cell Proliferation**, **37**; 23-24. 2004.

PROCKOP, D.J., GREGORY, C.A., SPEES, J.J. One strategy for cell and gene therapy: harnessing the power of adult stem cells to repair tissues. **Proceedings of National Academic Science USA** **100**, 11917. 2003.

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

RICHARDS, M., FONG, C.Y., CHAN, W.K., WONG, P.C., BONGSO, A. Human feeders support prolonged undifferentiated growth of human inner cell masses and embryonic stem cells. **Nature Biotechnology** **20**, 933. 2002.

ROPETER-SCHARFENSTEIN, M., NEUBERT, N., PRELLE, K., AND HOLTZ, W. Identification, isolation, and culture of pluripotent cells from the porcine inner cell mass. **Journal of Animal Breeding and Genetics** **113**, 427-436. 1996.

RUDNICKI, M.A., MCBURNEY, M.W. Cell culture methods and induction of differentiation of embryonal carcinoma cell lines. In: **Teratocarcinomas and embryonic stem cells**. IRL Press, Oxford Washington, 19-49. 1987.

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** **336**, 688-690. 1988.

STEVENS, L.C. The origin and development of testicular, ovarian and embryo-derived teratomas. *Teratocarcinoma Stem Cells. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, p. 23-36.* 1983.

STRAVRIDIS, M., SMITH, A.G. Neural differentiation of mouse embryonic stem cells. *Biochemical Society Trans* **31, 45.** 2003.

TAM, P.P. AND ZHOU, S.X. The allocation of epiblast cells to ectodermal and germ-line lineages is influenced by the position of the cells in the gastrulating mouse embryo. *Developmental Biology* **178, 124-132.** 1996.

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

THOMSON, A.W., LU, L., WAN, Y., WAN, Y., QUIAN, S., LARSEN, C.P., STARZL, T.E. Identification of donor-derived dendritic cell progenitors in bone marrow of spontaneously tolerant liver allograft recipients. *Transplantation. Dec 27;60(12):1555-9.* 1995

THOMSON, J.A., KALISHMAN, J., GOLOS, T.G., DURNING, M., HARRIS, C.P., HEARN, J.P. Pluripotent cell lines derived from common marmoset (*Callithrix jacchus*) blastocysts. *Biology of Reproduction*, Aug;55(2):254-9. 1996.

UCHIDA, N., BUCK, D.W., HE, D., REITSMA, M.J., MASEK, M., PHAN, T.V., TSUKAMOTO, A.S., GAGE, F.H., WEISSMAN, I.L. Direct isolation of human central nervous system stem cells. *Proceedings of National Academic Science USA* **97, 14720.** 2000.

VASSILIEVA, S., GUAN, K., PICH, U., WOBUS, A.M. The establishment of SSEA-1 and Oct-4 expressing rat ES cell lines and effects of cytokines of the IL-6 family on clonal growth. *Experimental Cell Research* **285, 361-373.** 2000.

WEISSMAN, I.L., ANDERSON, D.J., GAGE, F. Stem and progenitor cells: origins, phenotypes, lineage commitments, and transdifferentiations. *Annual Review Cell Developmental Biology.* **17:387-403.** 2001.

WILES, M.V, KELLER, G. Multiple hematopoietic lineages develop from embryonic stem (ES) cells in culture. *Development* **111, 259.** 1991.

WILLIAMS, R.L., HILTON, D.J., PEASE, S., WILSON, T.A., STEWART, C.I., GEARING, D.P., WAGNER, E.F., METCALF, D., NICOLA, N.A., GOUGH, N.M. Myeloid leukaemia inhibiting factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells. *Nature* **336, 684-687.** 1988.

WOBUS, A.M. Potential of embryonic stem cells. **Molecular aspects of medicine** **22**, **149**. 2001.

WOBUS, A.M., ROHWEDEL, J., MALTSEV, V., AND HESCHELER, J. *In vitro* differentiation of embryonic stem cells into cardiomyocytes or skeletal muscle cells is specifically modulated by retinoic acid. **Roux's Archives of Developmental Biology** **204**, **36-45**. 1994.

WOBUS, A.M., WALLUKAT, G., HESCHELER, J. Pluripotent embryonic stem cells are able to differentiate into cardiomyocytes express chronotropic responses to adrenergic and cholinergic agents and Ca²⁺ channel blockers. **Differentiation** **48**, **173**. 1991

WOBUS, A.M., BOHELER, K.R. Embryonic Stem Cells as Developmental Model in vitro. **Cells Tissues Organs** ;**165(3-4):129-30**. 1999.

WOBUS, A.M., WOLF, E., BEIER, H.M. Embryonic stem cells and nuclear transfer strategies. Present state and future prospects. **Cells Tissues Organs** ;**166(1):1-5**. 2000