

Caracterização de uma linhagem de células-tronco embrionárias humanas para estudos futuros em terapia celular

Pedro C. Calderaro^{1,2}, Patricia Pranke^{1,2,3}

¹ Laboratório de Células-tronco, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, ² Laboratório de Hematologia e Células-tronco, Faculdade de Farmácia, ³ Instituto de Pesquisa com Células-tronco; Porto Alegre, RS, Brasil.

email: pedroccalderaro@gmail.com



CS - Ciências da Saúde

INTRODUÇÃO

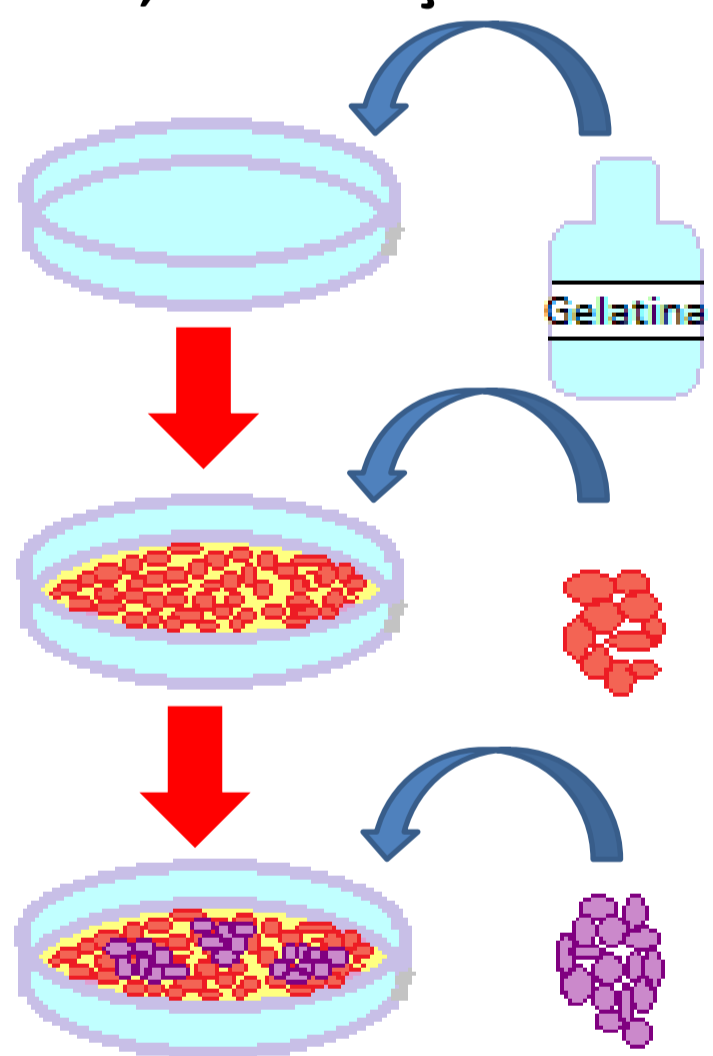
As células-tronco embrionárias (CTE) são derivadas da massa celular interna de embriões no estágio de blastocisto. A fonte para a derivação de CTE humanas são embriões obtidos de clínicas de reprodução assistida, através de doação para a pesquisa. Essas células possuem capacidade ilimitada de auto-renovação e são pluripotentes. O cultivo de CTE é um procedimento bastante laborioso que envolve trocas diárias do meio de cultura e a remoção de colônias que sofrem diferenciação espontânea. Após a derivação das CTE é necessário realizar a caracterização dessas células. O objetivo do presente trabalho foi caracterizar uma linhagem de CTE humanas previamente estabelecida para posterior utilização em experimentos com biomateriais produzidos por nanotecnologia. Entre os testes comumente realizados para caracterizar as CTE podemos citar: morfologia, avaliação da expressão de genes de pluripotência bem como a presença das respectivas proteínas, a capacidade de diferenciação em células dos três folhetos embrionários através da formação de corpos embrioides, bem como a contagem cromossômica.

MATERIAIS & MÉTODOS

Aquisição da Linhagem: Linhagem de CTE humana H9 fornecida pelo Laboratório Nacional de Pesquisa com Células-tronco Embrionárias do Instituto de Ciências Biomédicas da UFRJ.

Aspectos Éticos: CONEP 15812.

Cultivo, Manutenção e Caracterização:



1º: Placas tratadas com 0,1% de gelatina por 20 min.

2º: Semeadura da monocamada de fibroblastos embrionários murinos tratados com 10 µg/mL de mitomicina C.

3º: Semeadura das CTE humanas. Manutenção com meio DMEM F-12 suplementado com 20% KSR, 4 ng/mL de bFGF, 0,1 mM aminoácidos não-essenciais e 10 µM β-mercaptoetanol.

Morfologia e avaliação da atividade da fosfatase alcalina.

Contagem cromossômica.

Ensaio de imunofluorescência para os marcadores de pluripotência OCT4, SOX-2 e TRA-1-81.

RT-PCR dos genes de pluripotência *OCT4*, *NANOG*, *SOX2* e *REX1*, e β-*ACTINA* como controle endógeno.

Diferenciação espontânea através da formação de corpos embrioides (ectoderme e endoderme) ou na presença de MEFs (mesoderme).

Ensaio de imunofluorescência para os marcadores de diferenciação em ectoderme (Nestina e β-III tubulina), endoderme (Sox17) e coloração de adipócitos com Oil Red O.

RESULTADOS

Os resultados dos experimentos estão apresentados nas figuras abaixo.

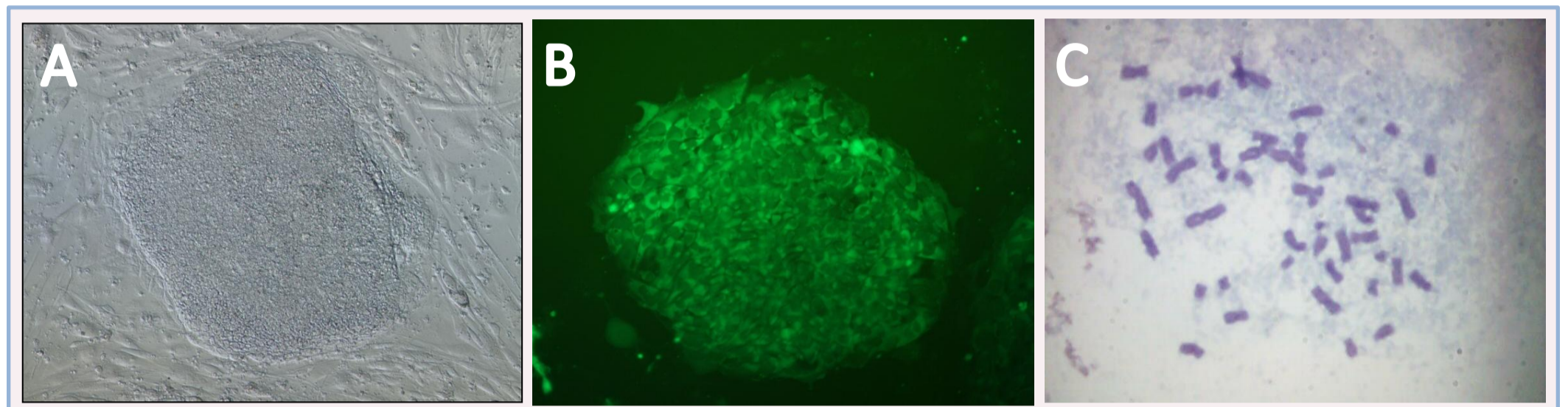
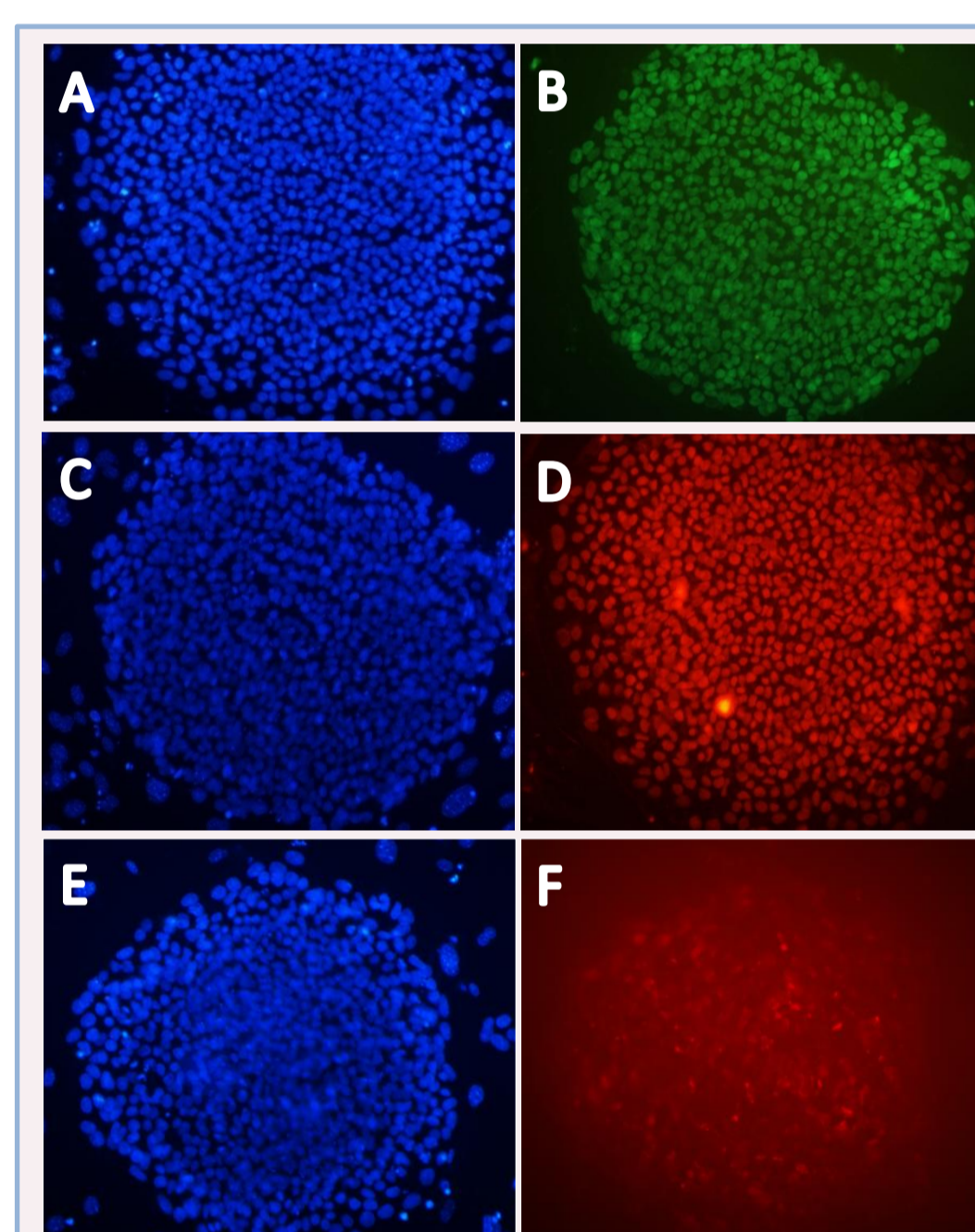


Figura 1: Morfologia característica de uma colônia indiferenciada de células-tronco embrionárias humanas (A); marcação positiva da atividade de fosfatase alcalina (B) e metáfase com 2n=46 (C). Aumento 100x (A), 200x (B) e 1000x (C).



Genes	+	-
<i>OCT4</i>		
<i>NANOG</i>		
<i>SOX2</i>		
<i>REX1</i>		
<i>ACTB</i>		

Figura 3: Análise da expressão de genes de pluripotência de células-tronco embrionárias humanas por RT-PCR.

Figura 2: Imunofluorescência de colônias de células-tronco embrionárias humanas utilizando anticorpos anti-OCT-4 (B), -SOX-2 (D) e -TRA-1-81 (F). Núcleos marcados com DAPI (A,C,E). Aumento 200x.

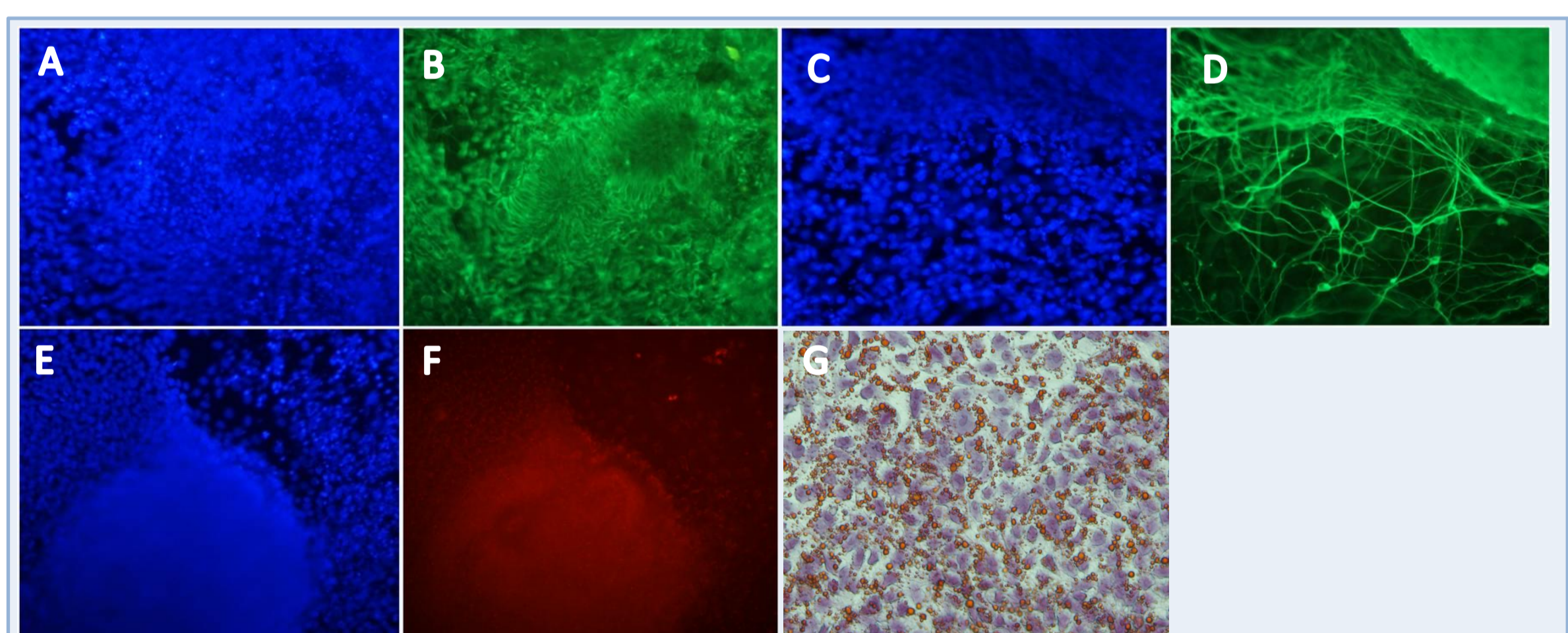


Figura 4: Avaliação da diferenciação em células das 3 linhagens germinativas em meio de cultivo sem bFGF. Foram utilizados anticorpos anti-nestina (B) e anti-β-III-tubulina (D), que marcam células derivadas da ectoderme e anticorpo anti-SOX-17 (F), marcador de endoderme. Os núcleos foram marcados com DAPI (A,C,E). A diferenciação em células de mesoderme foi realizada pela coloração com Oil Red O, mostrando vacúolos lipídicos encontrados em adipócitos (G), sem a formação de corpos embrioides. Aumento 200x.

Os resultados demonstram que as células cultivadas possuem morfologia característica de CTE humanas (Fig. 1A) e expressam os genes *OCT4*, *SOX2*, *NANOG* e *REX1* (Fig. 3). Além disso, foi detectada atividade de fosfatase alcalina (Fig. 1B) bem como a presença de *OCT4*, *SOX2* e *TRA-1-81* (Fig. 2). A diferenciação espontânea dessa linhagem na ausência de bFGF resultou em células das três linhagens germinativas (Fig. 4). Das 20 metáfases analisadas, 80% eram 2n=46 (Fig. 4C).

CONCLUSÃO

Todos os testes demonstraram que a linhagem de CTE humanas utilizada possui as características determinantes para sua classificação como tal. Essa foi a primeira linhagem de CTE humanas cultivadas com sucesso no estado do RS. A próxima etapa será a adaptação dessas células para o cultivo na ausência de MEFs, utilizando matrigel como substrato, além de estudos futuros de interação dessas células com biomateriais.