

Palavras-chave: Embrião, Potência celular, Cultura celular, Vaca, Massa celular

INTRODUÇÃO

Células tronco embrionárias (ES) são obtidas da massa celular interna (ICM) de embriões no estágio de blastocisto. São células pluripotentes, que podem ser mantidas em cultura indefinidamente como células indiferenciadas (Thomson et al., 1998). Métodos para a obtenção *in vitro* de células ES de embriões murinos são bem estabelecidos (Bryja et al., 2006). Porém, é importante que células ES sejam isoladas de outros animais, como bovinos, contribuindo assim para um melhor entendimento da biologia dessas células. Uma vantagem para o uso de embriões bovinos consiste na sua fácil obtenção. Portanto, o objetivo do presente estudo foi obter células ES da ICM de blastocistos bovinos e caracterizar a sua pluripotência.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram doados para o estudo 17 embriões no estágio de blastocisto expandido (BL1) e 14 no estágio de blastocisto eclodido (BL2) pela empresa In Vitro do Brasil Ltda (Fig. 1A-B). Todos os 31 blastocistos frescos foram imediatamente seccionados para a remoção mecânica da ICM (Fig. 1C-F).

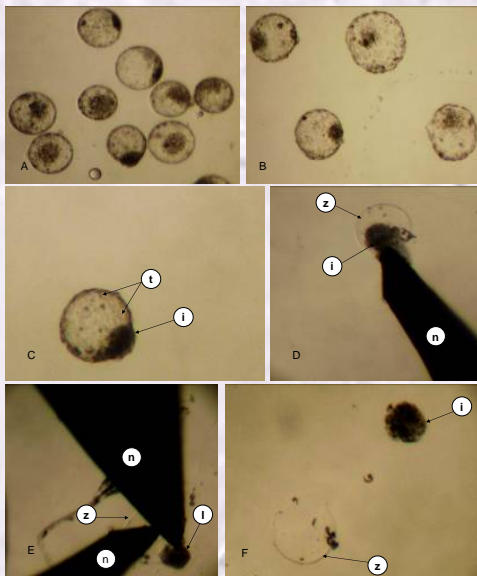


Figura 1. ICM bovina isolada mecanicamente. (A) Blastocistos expandidos. (B) Blastocistos eclodidos. (C) Blastocisto expandido mostrando a ICM (i) e as células do trofoblasto (t). (D) Uma agulha (n) foi utilizada para prender o blastocisto e (E) outra para fazer um corte na zona pelúcida (z) e abrir o blastocisto para (F) remover a ICM da zona pelúcida e trofoblasto.

As ICMs isoladas foram imediatamente transferidas para uma placa de cultura, contendo uma monocamada de fibroblastos embrionários murinos (MEF) mitoticamente inativados e mantidas na presença de meio α -MEM (Invitrogen, USA) com 1000 U/ml de fator inibitório de leucemia humano (LIF; Esgró, USA), 15 % (v/v) soro fetal bovino (Hyclone; Logan, USA), 0,1 mM de 2-mercaptoetanol (Invitrogen, USA), 50 U/ml de penicilina, a 37°C com 5% de CO₂. Após cinco dias, o meio foi trocado, sendo que as trocas subsequentes foram realizadas de dois em dois dias até alcançar o décimo dia, onde foi realizada a dissociação mecânica das colônias. As células foram caracterizadas quanto a expressão de transcritos de indiferenciação (Oct-4 e STAT-3) e transcritos de diferenciação (Flk-1 e GATA-4) por RT-PCR e o produto analisado em gel de agarose 1,5%.

Fonte de Financiamento: MS/CNPq nº 552593/2005-2

Agradecimentos: In Vitro do Brasil Ltda



RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após o quinto dia de cultivo, 18 das 31 ICMs haviam aderido (Fig. 2B), sendo que, seis tiveram a ICM expandida, formando colônias, as quais no décimo dia foram dissociadas mecanicamente e transferidas para uma nova monocamada de MEF (Fig. 2 A-F). Dessas seis ICMs, uma deu origem a uma linhagem de células com morfologia semelhante a células ES bovinas como descrito por Mitalipova et al. (2001) (Fig. 2 H-J).

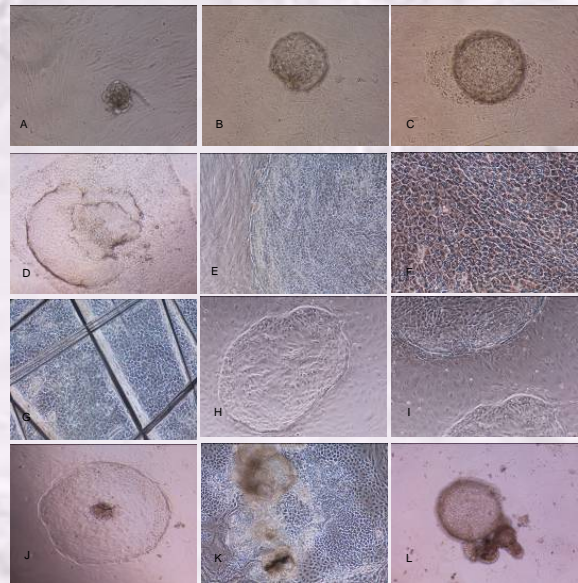


Figura 2. Fotomicrografia das células ES bovinas. (A) ICM bovina (200x). (B) ICM bovina expandida e aderida (200x). (C) Crescimento da ICM bovina aderida (200x). (D) Colônia primária de células ES bovinas com a forma de um *donut* (100x). (E, F) Colônias de células ES bovinas na primeira passagem (100x e 200x, respectivamente). (G) Dissociação mecânica de células ES bovinas (100x). (H-J) Colônias planas de células ES bovinas (100x). (K) Colônia de células ES bovinas em processo de diferenciação espontânea (100x). (L) Formação de corpo-embrião a partir da células ES bovinas diferenciadas (100x).

Observou-se que essa linhagem se manteve no estado indiferenciado por aproximadamente 60 dias, suportando seis subcultivos. Verificou-se por RT-PCR apenas a expressão dos transcritos de indiferenciação (Oct-4 e STAT-3) (Fig. 3), confirmando os resultados sobre a morfologia dessas células.

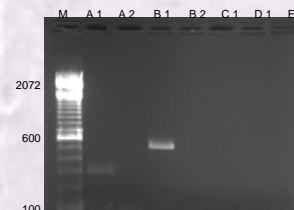


Figura 3- RT-PCR para análise da expressão dos transcritos de indiferenciação e diferenciação em células ES bovinas. (A) Oct-4 (314 pb), (B) STAT-3 (531 pb), (C) GATA-4 (510 pb) e (D) Flk-1 (197 pb). Linha 1: Células ES bovinas. Linha 2: Células ES bovinas sem o processo de transcrição reversa (controle negativo). (M) 100 pb DNA Ladder. (E) RT-PCR sem cDNA (controle negativo).

Os resultados obtidos contribuem para os estudos de proliferação *in vitro* de ES bovinas. Experimentos futuros serão realizados com esse modelo animal, com o objetivo de otimizar a técnica de derivação, para estender o tempo de cultivo das células ES bovinas. Esses estudos podem contribuir futuramente para a aplicação de células tronco embrionárias em terapia celular.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bryja V, Bonilla S, Arenas E. Derivation of mouse embryonic stem cells. Nat Protoc, 1:2082-7, 2006.
- Mitalipova M, Beyhan Z, First NL. Pluripotency of bovine embryonic cell line derived from precompacting embryos. Cloning, 3:59-67, 2001.
- Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. Science, 282:1145-1147, 1998.