

MARCELO DEMARCHI GOISSIS

Uso de matriz extracelular (Matrigel®) para estabelecimento de cultivo de células-tronco embrionárias de suínos e caracterização da expressão de moléculas associadas à pluripotência

São Paulo

2008

MARCELO DEMARCHI GOISSIS

Uso de matriz extracelular (Matrigel®) para estabelecimento de cultivo de células-tronco embrionárias de suínos e caracterização da expressão de moléculas associadas à pluripotência

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

Departamento:

Reprodução Animal

Área de Concentração:

Reprodução Animal

Orientador:

Prof. Dr. José Antônio Visintin

São Paulo

2008

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.1974
FMVZ

Goissis, Marcelo Demarchi

Uso de matriz extracelular (Matrigel[®]) para estabelecimento de cultivo de células-tronco embrionárias de suínos e caracterização da expressão de moléculas associadas à pluripotência / Marcelo Demarchi Goissis. – São Paulo : M. D. Goissis, 2008.

68 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, 2008.

Programa de Pós-Graduação: Reprodução Animal.
Área de concentração: Reprodução Animal.

Orientador: Prof. Dr. José Antônio Visintin.

1. Células-tronco embrionárias. 2. Marcadores de pluripotência.
3. Matrigel. 4. Blastocisto. 5. Suínos. I. Título.



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia


Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Estabelecimento e caracterização de células embrionárias pluripotentes em suínos", protocolo nº802/2005, utilizando 03 (três) suínos e 02 (dois) fêmeas murinas (camundongos), sob a responsabilidade do Prof. Dr. José Antonio Visintin, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado "ad referendum".

(We certify that the Research "Establishment and characterization of pluripotent embryonic cells in swine", protocol number 802/2005, under the responsibility of Prof. Dr. José Antonio Visintin, utilizing 03 (three) swine and 02 (two) mice, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the Faculty of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved "ad referendum", meeting).

São Paulo, 06 de dezembro de 2005


Prof.ª Dr.ª Julia Maria Matera
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: GOISSIS, Marcelo Demarchi

Título: Uso de matriz extracelular (Matrigel[®]) para estabelecimento de cultivo de células-tronco embrionárias de suínos e caracterização da expressão de moléculas associadas à pluripotência

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

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

**A meus pais, que se pudessem,
entrariam no laboratório
para me ajudar**

**À minha família,
por sempre ter me incentivado**

Agradecimentos

Gostaria de agradecer ao **Prof.Dr. José Antônio Visintin**, que confiou no meu potencial neste projeto pioneiro, por prover todas as condições para a adequada execução laboratorial e por sempre acreditar no sucesso deste projeto. Sempre permitiu o máximo aprendizado em atividades diversas, especialmente nas participações em aulas da graduação e pós-graduação e é exemplo de perseverança e ética dentro de nossa faculdade.

À **Profa. Dra. Mayra Elena Ortiz D'Ávila Assumpção**, por estar ativamente presente na execução deste projeto, pelo apoio constante e sempre se dispor a ajudar a todos; por ensinamentos durante aulas e pela excelente convivência.

Ao **Prof. Dr. Carlos Henrique Cabral Viana**, por compartilhar seus conhecimentos e por sua irrestrita disposição em nos ajudar nas colheitas de embriões suínos, as quais foram trabalhosas, porém extremamente divertidas.

À **Profa. Dra. Irina Kerkis**, pelos valiosos ensinamentos durante a realização deste projeto e doação de células-tronco embrionárias murinas.

À **Profa. Dra. Camila Infantsi Vannucchi**, pelo apoio, ensinamentos e conversas irreverentes.

À **Flavia Regina Oliveira de Barros**, que dividiu boa parte do trabalho, angústias e risadas também. Por acreditar no sucesso de nosso projeto e se esforçar para conseguirmos os melhores resultados.

À **Mariana Groke Marques**, pelos ensinamentos de fecundação *in vitro*, pelo auxílio na produção de embriões, pelas divertidas conversas quase filosóficas ou bate-papo de hospício.

À **Marcella Pecora Milazzotto**, pelos ensinamentos em biologia molecular, pelas discussões científicas que perduram desde a iniciação científica e por outras discussões não tão sérias assim.

À **Camilla Mota Mendes**, pelo auxílio no cultivo de células-tronco murinas, pelo auxílio com o seqüenciador e pela ótima convivência desde a graduação.

Aos demais membros dos Laboratórios de Fecundação *in vitro*, Clonagem e Transgenia Animal pela excelente convivência e colaborações: **Renata** (e as dancinhas!), **Alê** (sem mais corda no pescoço!), **Aníbal** (sempre seguindo as tendências, porém sempre “vai Parmera!”), **Zeca** (piadista incorrigível, mais um grande amigo palmeirense), **Maran** (a tranquilidade em pessoa, *quase* sempre), **Alê Brandão** (risada inconfundível), **Weber** (ex-colega de republica e especialista em *e-mails* abertos), **Viviane** (não ria do meu penteado!), **Nani** (mais canadense do que nunca), **Heloísa** (a primeira professora dentro do lab.), **Fabiola** (Paula-Lopes, 2002, conselheira de todos), **Creysson** (o potencial milionário deste grupo), **Paulo** (vai Superman!), **Mariana Giassetti**, **Fernanda**, **Giana** (as ICs, têm a responsabilidade de manter o alto nível deste laboratório).

À **Comissão de Churrascos do VRA**, da qual orgulhosamente fui tesoureiro e vice-presidente, tendo a honra de ter compartilhado grandes momentos com todos os colegas de pós-graduação, inclusive de Pirassununga. Agradeço ao presidente **Marcílio**, ao secretário **Henderson**, as Promotoras de eventos **Profa. Camila**, **Profa. Mayra e Profa. Maza** e as técnicas do vinagrete **Camilla**, **Alessandra** e auxiliares!

Aos demais docentes do Departamento pelos ensinamentos doados durante esses 6 anos de VRA.

A todos os funcionários do VRA pela convivência e ajuda dispensada em todo este período, a qual foi fundamental para a minha formação. Além dos bons momentos em churrascos!

Aos alunos de iniciação científica, **João Paulo, Juliana e João** do Prof. Cabral da PUC Poços de Caldas, funcionários da **Fazenda Sertãozinho Ltda.**, em Botelhos, pela ajuda na colheita de embriões suínos e ao **Frigorífico Nossa Senhora da Saúde**, em Poços de Caldas.

À **Intervet** que gentilmente cedeu as doses de hormônios para superovulação das marrãs.

Ao colega de turma e grande amigo **Mauro Leonelli** por auxílio nos testes de imunocitoquímica. Aos demais amigos da faculdade e colegas de república que sempre me apoiaram e ajudaram.

À **Regina** do Biotério do ICB-II pela doação dos camundongos para obtenção dos fibroblastos murinos e a **Célia** do ICB-IV pela irradiação dessas células.

À **Ana Lucia** e **Alex**, pelo auxílio na microscopia confocal. À **Profa. Elizabeth Martins** do Instituto Butantan por permitir o uso do seqüenciador de ácidos nucléicos.

À **Luciana** da Eppendorf do Brasil pelo auxílio técnico com o PCR quantitativo.

Ào **CNPq** pelo auxílio financeiro durante os primeiros 6 meses deste mestrado.

À **FAPESP**, pelo auxílio financeiro durante 18 meses.

À **Carol**, pela paciência, compreensão e incentivos dedicados durante toda execução deste projeto. Obrigado por acreditar sempre no meu sucesso!

*“...há certas coisas que só começaremos
a perceber quando nos dispusermos
a remontar às fontes.”*

José Saramago

GOISSIS, M.D. **Uso de matriz extracelular (Matrigel®) para estabelecimento de cultivo de células-tronco embrionárias de suínos e caracterização da expressão de moléculas associadas à pluripotência.** [Use of extracellular matrix (Matrigel®) for establishment of porcine embryonic stem cells and expression characterization of pluripotency related molecules]. 2008. 68 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

O estabelecimento de cultivo de células-tronco embrionárias (ESC) ainda não foi realizado com sucesso. Verificação de marcadores de pluripotência e diferenciação nos três folhetos germinativos são necessárias para validação de uma linhagem celular pluripotente. O objetivo deste estudo foi estabelecer e caracterizar o cultivo de ESC suínas usando Matrigel e comparar a expressão dos marcadores de pluripotência Oct-4, CD9 e α_6 -integrina em embriões. Blastocistos *in vitro* ou *in vivo* foram submetidos à imunocirurgia para cultura da massa celular interna, fixados para imunocitoquímica ou extração de RNA total para RT-PCR. Nenhuma colônia de ESC foi obtida usando co-cultivo em fibroblastos embrionários murinos (MEF) ou em Matrigel. Expressão de Oct-4, CD9 e α_6 -integrina foi detectada por PCR. Os produtos de PCR de CD9 e α_6 -integrina tiveram suas sequências nucleotídicas determinadas e comparadas com bases de dados públicas. O produto de CD9 foi idêntico à seqüência do CD9 suíno e o produto de α_6 integrina foi similar à humana e eqüina. Reação de Imunocitoquímica revelou a presença de Oct-4 no citoplasma de células da massa celular interna e do trofoblasto. CD9 e α_6 -integrina foram observados preferencialmente em células do trofoblasto. Não foi possível comparar a expressão dos marcadores de pluripotência entre ESC e embriões em suínos. Porém, este estudo descreve pela primeira vez a expressão de CD9 e α_6 -integrina em blastocistos suínos, os quais podem não estar relacionados com células pluripotentes embrionárias suínas.

Palavras-chave: Células-tronco embrionárias. Marcadores de pluripotência. Matrigel. Blastocisto. Suínos.

GOISSIS, M.D. **Use of extracellular matrix (Matrigel®) for establishment of porcine embryonic stem cells and expression characterization of pluripotency related molecules.** [Uso de matriz extracelular (Matrigel®) para estabelecimento de cultivo de células-tronco embrionárias de suínos e caracterização da expressão de moléculas associadas à pluripotência]. 2008. 68 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

Establishment of embryonic stem cell (ESC) culture in pigs has not been achieved. Verification of pluripotency markers and differentiation in the three embryonic layers are necessary for validation of a pluripotent cell line. The objective of this study was to establish and characterize porcine ESC culture using Matrigel and compare the expression of pluripotency markers Oct-4, CD9 and α_6 -integrin with embryos. *In vitro* or *in vivo* porcine blastocysts were submitted to immunosurgery for culture of inner cell mass, fixation for immunocytochemistry or total RNA extraction for RT-PCR. No ESC colonies were obtained using co-culture on mouse embryonic fibroblasts (MEF) or on Matrigel. Expression of Oct-4, CD9 and α_6 -integrin was detected by PCR. CD9 and α_6 -integrin PCR products had their nucleotide sequence assessed and compared with public nucleotide database. CD9 product was identical to CD9 porcine sequences and α_6 -integrin product was similar to human and equine α_6 -integrin. Immunocytochemistry revealed Oct-4 expression in cytoplasm of the inner cell mass and trophoblast cells. CD9 and α_6 -integrin were observed preferentially on trophoblast cells. It was not possible to compare expression of pluripotency markers between porcine ESC and embryos. However, this study describes for the first time expression of CD9 and α_6 -integrin in porcine blastocysts, which may not be related to pluripotent porcine embryonic cells.

Key words: Embryonic stem cells. Pluripotency markers. Matrigel. Blastocyst. Porcine.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1 Obtenção e cultivo de Células-tronco Embrionárias	17
2.2 Mecanismos de manutenção da pluripotência e diferenciação <i>in vitro</i>	19
2.3 Cultivo de ESC humanas na ausência de co-cultivo em monocamada	20
2.4 Interações celulares e da matriz extra-celular durante a diferenciação	21
3 HIPÓTESE E OBJETIVO	22
3.1 Hipótese	23
3.2 Objetivo	23
4 MATERIAL E MÉTODO	24
4.1 Produção <i>in vitro</i> de embriões suínos (PIV)	25
4.2 Colheita de embriões suínos.....	26
4.2.1 Animais.....	26
4.2.2 Abate e lavagem do útero	26
4.2.3 Armazenamento e transporte	27
4.3 Derivação e cultivo de células embrionárias suínas.....	27
4.3.1 Imunocirurgia e cultivo de blastocistos suínos	28
4.3.2 Preparo de placas com fibroblastos e Matrigel.....	28
4.3.3 Dissociação das MCI aderidas e passagem de colônias.....	29
4.4 Cultivo de células-tronco embrionárias murinas	29
4.5 Colheita de blastocistos murinos	29
4.6 PCR.....	30
4.7 Seqüenciamento de DNA.....	31
4.8 Imunocitoquímica.....	31
4.9 Delineamento Experimental	32
5 RESULTADOS	34

5.1 Produção in vitro de embriões suínos	35
5.2 Colheita de embriões suínos.....	35
5.3 Derivação e cultivo de células embrionárias suínas.....	35
5.4 Cultivo de células-tronco embrionárias murinas	35
5.5 PCR.....	39
5.6 Imunocitoquímica.....	43
6 DISCUSSÃO	47
7 CONCLUSÕES	52
REFERÊNCIAS.....	54
ANEXOS	64

1 INTRODUÇÃO

Células-tronco têm capacidade de proliferação e diferenciação em vários tipos celulares. Tecidos adultos possuem células-tronco especializadas que podem originar tipos celulares diferenciados específicos, porém apenas as células de embriões jovens possuem a pluripotência que permite originar qualquer tipo celular.

A obtenção do cultivo *in vitro* de células-tronco embrionárias (*embryonic stem cells* – ESC) permite o estudo dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento embrionário, da diferenciação em tecidos específicos, da produção de organismos geneticamente modificados e de programas para desenvolvimento de drogas. Essas células podem servir como fontes de diversos tipos celulares para realização de terapia celular e organogênese *in vitro*.

O uso de embriões humanos para a pesquisa com células-tronco é discutido do ponto de vista moral e ético por pesquisadores e leigos. Alguns são contrários ao uso de embriões, apoiando-se nos valores religiosos e morais da sociedade.

A utilização de um modelo animal para a pesquisa com células-tronco seria uma alternativa que evitaria essas discussões relacionadas à sociedade humana. O suíno (*Sus scrofa*) é um animal cujos parâmetros fisiológicos são similares aos humanos, por isso seria um bom modelo para estudos com células-tronco. Porém, o estabelecimento de cultivos de ESC de suínos tem encontrado alguns obstáculos para manutenção da pluripotência.

Há uma alteração na morfologia da colônia de células indiferenciadas durante o processo de obtenção das linhagens *in vitro*, podendo haver alterações nas interações célula-célula e célula-substrato. A identificação da expressão de moléculas de adesão relacionadas à manutenção da pluripotência em outras espécies pode auxiliar o desenvolvimento de estratégias para a obtenção de linhagens celulares pluripotentes em suínos.

2 Revisão de Literatura

2.1 Obtenção e cultivo de Células-tronco Embrionárias

Para a obtenção de cultura das células-tronco embrionárias (ESC), Evans e Kaufman (1981) consideram que o sucesso depende de três fatores: o estágio exato das células existentes no embrião, a retirada de número suficiente de células e as condições de cultivo que conduzam mais à multiplicação do que à diferenciação. No mesmo trabalho, esses autores propuseram que células de embriões recém implantados seriam as melhores progenitoras de ESC em cultivo. Para obter essas células, foi necessário retardar a implantação, que foi alcançado pela ovariectomia de camundongas doadoras. Os embriões com implantação atrasada eclodem e permanecem livres no lúmen uterino. Os blastocistos são colocados em cultivo e as estruturas derivadas da massa celular interna (MCI) são retiradas e colocadas em co-cultivo com fibroblastos do tipo STO inativados com mitomicina C.

O cultivo pode ser realizado sobre fibroblastos embrionários de camundongos (MEF) oriundos de embriões com 14 a 16 dias de gestação e inativados com mitomicina C (SPECTOR et al., 1997). Chin-lin et al. (2003) demonstraram que o uso de IGF-I e IGFBP-I no cultivo de embriões aumenta o número de células embrionárias e conseqüentemente facilita a obtenção da cultura de ESC.

Bongso et al. (1994) relataram a obtenção de ESC em cultivo a partir de embriões humanos produzidos *in vitro*. Os embriões foram cultivados até o estágio de blastocisto expandido em meio com soro humano sobre camada de células epiteliais de oviduto humano. Após a eclosão e a adesão da MCI à camada de células, foi feita a separação com uma micropipeta. Reubinoff et al. (2000) obtiveram ESC pelo isolamento de MCI por imunocirurgia.

Em 1995, Talbot et al. mostraram o cultivo de epiblastos bovinos originados de embriões colhidos *in vivo* ou produzidos *in vitro*. A MCI foi obtida por imunocirurgia com anticorpos anti-esplenócitos ovinos e complemento de cobaia. Embriões colhidos *in vivo* produziram maior número de epiblastos, assim como embriões eclodidos no dia 8 pós-fecundação (D8) geraram mais células do que os eclodidos no D9. As células foram co-cultivadas com fibroblastos STO e não se mantiveram indiferenciadas nessas condições, gerando células epiteliais, fibroblastos, células nervosas, hepatócitos e macrófagos-símile.

Piedrahita et al. (1990) isolaram ESC-símbles a partir de blastocistos suínos cultivados em fibroblastos STO. Células epiteliais-símbles foram obtidas a partir de MCI isolada por imunocirurgia. As ESC-símbles apresentaram-se redondas, com núcleos grandes e um ou dois nucléolos evidentes. Nesse mesmo estudo mostrou-se que essas células não sobreviveram quando cultivadas em fibroblastos embrionários porcinos (PEF).

Notarianni et al. (1990) obtiveram de células epiteliais-símbles a partir de embriões intactos de 7-9 dias ou de MCI isolada por dissecação. Essas células foram mantidas por um ano sem alteração no fenótipo celular.

Wheeler (1994) relata a produção de quimeras a partir de ESC suínas (pESC – *porcine* ESC) cultivadas em fibroblastos STO. A verificação do quimerismo foi feita de acordo com padrões de pelagem, ganho diário de peso e polimorfismo da enzima colesterol 7 α -hidroxilase.

Chen et al. (1999) obtiveram pESC e epiteliais-símbles a partir de blastocistos recém eclodidos. Blastocistos expandidos e eclodidos há mais tempo não permitiram a obtenção de linhagens celulares. Utilizando MCI isolada de blastocistos eclodidos, obtiveram somente células epiteliais-símbles. As pESC apresentaram atividade de fosfatase alcalina (FA) e foram capazes de diferenciar-se em múltiplos tipos celulares. Essas células também foram capazes de produzir quimeras. As células epiteliais-símbles não apresentaram atividade de FA e diferenciaram-se apenas em tecido epitelial.

Li et al. (2004b) relatam a obtenção de ESC a partir de embriões suínos produzidos *in vitro*. Blastocistos intactos foram co-cultivados com MEF e foi observada atividade de FA, porém apenas uma linhagem celular se manteve indiferenciada por três passagens. Li et al. (2004a) obtiveram ESC de suínos miniatura chineses a partir de MCI isolada, cultivando-as em MEF, PEF e STO, sendo que em MEF obteve-se maior número de passagens indiferenciadas.

Brevini et al. (2007) relataram a obtenção de pESC, porém após algumas passagens, as células pararam de expressar Oct-4. Apesar disto, a morfologia das colônias cultivadas não apresentaram alteração e mantiveram-se expressando Nanog.

2.2 Mecanismos de manutenção da pluripotência e diferenciação *in vitro*

ESC murinas e humanas são mantidas indiferenciadas *in vitro* no co-cultivo com fibroblastos STO ou fibroblasto embrionário murino (EVANS; KAUFMAN, 1981; REUBINOFF et al., 2000). A diferenciação das ESC de camundongos pode ser inibida pelo fator inibidor da leucemia (LIF – SMITH et al., 1988). Esse fator foi utilizado para a obtenção de novas linhagens de ESC sem co-cultivo em camadas celulares (NICHOLS et al., 1990).

O LIF atua em um receptor específico que ativa o transdutor de sinal gp130, o qual atua em duas vias de sinalização intracelular: JAK-STAT e Shp-Erk2 (revisado por NIWA, 2001). Minami et al. (1996) demonstraram que a ativação de STAT3 é suficiente para a manutenção da pluripotência em relação à via Shp-Erk2. A ativação de STAT3 é essencial para manutenção da pluripotência, mesmo sem a presença de LIF (Matsuda et al., 1999)

Contudo a ativação de JAK-STAT não é a única envolvida na manutenção da pluripotência. O gene *POU5f1* codifica o fator de transcrição Oct-4 (ou Oct-3/4), que é restrito a células totipotentes e pluripotentes (SCHOLER et al., 1990). A deficiência de Oct-4 impede o desenvolvimento porque as células da MCI perdem a pluripotência (NICHOLS et al., 1998).

Em uma série de estudos (TAKAHASHI; YAMANAKA, 2006; OKITA; ICHISAKA; YAMANAKA, 2007; WERNIG et al., 2007; TAKAHASHI et al., 2007; YU et al., 2007), na qual foram produzidas células-tronco pluripotentes induzidas por fatores de pluripotência em murinos e humanos, o Oct-4 mostrou-se essencial ao lado de Sox2. Nestes trabalhos foi observado que a expressão dos genes Oct-4 e Sox2 diminui significativamente quando as células diferenciam-se.

ESC humanas não são mantidas indiferenciadas pela ação do LIF e também pela retirada da camada celular do co-cultivo (REUBINOFF et al., 2000). Para o cultivo sem camada celular, Xu et al. (2001) demonstraram a necessidade da presença de laminina, que induz adesão, crescimento e migração celular devido à interação com moléculas de integrinas. Nesse estudo foi utilizado Matrigel como matriz extracelular e meio condicionado em MEF, indicando que outros fatores estão envolvidos na manutenção da pluripotência *in vitro* de ESC humanas.

Oka et al. (2002) relataram que moléculas de CD9 estão mais expressas em células indiferenciadas. A ativação de STAT3 induziu a expressão dessa proteína

transmembrânica e o seu bloqueio reduziu a formação de colônias celulares e a viabilidade do cultivo.

2.3 Cultivo de ESC humanas na ausência de co-cultivo em monocamada

Xu et al. (2001) foram os primeiros a obter o cultivo de ESC humanas sem realizar o co-cultivo em monocamada (*feeder-layer*), utilizando-se de Matrigel ou laminina e de meio condicionado em MEF. O matrigel é um composto comercial isolado de sarcoma murino, rico em proteínas de matriz extracelular. Contém laminina, colágeno IV, entactina, proteoglicanas e também fatores de crescimento como TGF β , bFGF, EGF e PDGF (VUKICEVIC et al., 2002), além de componentes ainda indefinidos.

Xu et al. (2005) relataram que o uso de bFGF no meio de cultivo é suficiente para o cultivo de células em Matrigel sem meio condicionado. Wang et al. (2005) demonstram que o cultivo de ESC com matrigel e bFGF permite a diferenciação em células hematopoéticas após uso de fatores de crescimento e diferenciação específicos.

Visando a aplicação médica de ESC sem a presença de possíveis xeno-patógenos, Stojkovic et al. (2005) utilizaram soro humano como matriz e meio condicionado em fibroblastos derivados de ESC diferenciadas para o cultivo de ESC indiferenciadas. Estas células foram capazes de se diferenciar em tecidos das três camadas germinativas.

2.4 Interações celulares e da matriz extra-celular durante a diferenciação

As adesões célula-célula e célula-substrato representam processos histológicos fundamentais para a formação de um organismo multicelular (ECKBLOM et al., 1986). Várias moléculas medeiam a adesão de células em diferenciação, dentre elas a laminina e seus receptores, incluindo CD9 e α_6 -integrina.

A laminina é uma glicoproteína de adesão para desenvolvimento epitelial e constitui a matriz extracelular como parte da membrana basal. A família das integrinas constitui os principais receptores da laminina (ECKBLOM et al., 1986). As integrinas são compostas por dois heterodímeros, α e β , sendo 14 subunidades α e 8 subunidades β com interações aparentemente restritas (HYNES, 1992)

Cooper et al. (1991) mostraram que o principal receptor para laminina em células-tronco murinas é a $\alpha_6\beta_1$ integrina e que existem duas versões da porção α_6 . Células indiferenciadas apresentam a isoforma α_{6B} que é substituída pela isoforma α_{6A} durante a diferenciação. Foi observado por RT-PCR que o cDNA de células indiferenciadas produziu 1 fragmento de 380 pares de base (BP), enquanto que a partir de células diferenciadas foram produzidos 2 fragmentos de 510 e 380 BP, respectivamente.

Oka et al. (2002) demonstraram que não há alteração na expressão de α_6 e β_1 integrinas em células murinas, porém observaram a diminuição de CD9, PECAM-1 e osteopontina no decorrer da diferenciação.

Utilizando microscopia laser confocal e imunofluorescência, Cui et al. (2004) mostraram a presença de CD9 nas regiões de contato celular e também mostram a diminuição da expressão dessa molécula durante a diferenciação.

3.1 Hipótese

O cultivo *in vitro* de células-tronco embrionárias suínas apresenta expressão de Oct-4, CD9 e α_6 -integrina similar à das células da MCI em suínos. As células diferenciadas deverão apresentar redução na expressão de Oct-4 e CD9, podendo apresentar alteração na expressão da isoforma de α_6 -integrina.

3.2 Objetivo

Estabelecer o cultivo de ESC, caracterizar a linhagem celular, identificando a expressão de moléculas de adesão e fatores de transcrição relacionados à manutenção da pluripotência, comparando a expressão dessas moléculas nos embriões.

4.1 Produção *in vitro* de embriões suínos (PIV)

Oócitos oriundos de ovários de matadouro foram selecionados em meio HbT (Anexo A) e maturados *in vitro* (MIV) por 44 horas, sendo nas primeiras 22 horas em meio TCM 199 (Gibco, Carlsbad, CA, EUA) enriquecido com 10UI de eCG, 10UI de hCG, 50UI de EGF e 90µl/ml de pFF (fluido folicular porcino) e nas demais 22 horas em TCM199 adicionado de 50UI de EGF e 90µl/ml de pFF.

Após a maturação, os oócitos foram transferidos para o meio mTBM (Anexo B) e fecundados com dose inseminante de 3×10^5 espermatozóides/ml, sendo mantidos em estufa a 38,5°C; 5% de CO₂ em ar e alta umidade. Os espermatozóides vivos foram selecionados por gradiente de Percoll (Sigma, Saint Louis, MO, EUA – Anexo C) e capacitados durante o período de fecundação *in vitro* (FIV), empregando 2µM de cafeína/ml.

Depois de 30 minutos, os oócitos foram lavados em meio mTBM para remoção do excesso de espermatozóides e transferidos para outra placa com meio mTBM. Após 6h, os embriões foram lavados 3 vezes em meio PZM3 (Anexo D) e cultivados em gotas de 90µl deste meio sob óleo mineral em estufa a 38,5°C; 5% de CO₂ e 5% de O₂ em ar e alta umidade por 7 dias. Foram adicionados 45µl de meio PZM3 (*feeding*) nos dias 2 e 5. No dia 7, estes embriões foram submetidos a imunocirurgia, fixados em paraformaldeído 4% ou congelados a -80°C para posterior extração de RNA.

4.2 Colheita de embriões suínos

A seguir serão detalhadas as etapas para a colheita de embriões suínos.

4.2.1 Animais

Os animais previamente selecionados para abate foram provenientes da Fazenda Sertãozinho Ltda. (Botelhos, MG). As 36 fêmeas pré-púberes foram divididas em 2 grupos de 3 animais e 6 grupos de 5 animais para colheitas em diferentes datas. Os animais foram superovulados com injeção intramuscular de 1000UI de eCG (FOLLIGON[®], Intervet, Boxmeer, Holanda). Após 96h, os 2 grupos de 3 animais receberam injeção intramuscular de 750UI de gonadotrofina coriônica humana (hCG - CHORULON[®], Intervet). Os demais grupos receberam injeção intramuscular de 5mg de LH (LUTROPIN-V[®], Bioniche, Belleville, ON, Canadá) após 72h. Os animais foram inseminados após 12h da aplicação do indutor da ovulação (hCG ou LH). O momento da ovulação foi considerado 40h após o hCG ou LH. As marrãs foram destinadas ao abate aproximadamente 120h após a ovulação.

4.2.2 Abate e lavagem do útero

Pipetas de inseminação artificial do tipo *Golden Pig* (IMV, L'Aigle, França) foram vedadas com silicone para impedir a entrada de líquido no útero durante a escalda. As pipetas foram introduzidas na vagina das marrãs, antes do procedimento normal do Frigorífico Nossa Senhora da Saúde (Poços de Caldas, MG).

Os úteros foram acondicionados em recipientes térmicos e transportados ao Laboratório de Reprodução Animal da PUC Poços de Caldas. Os úteros foram dissecados com o objetivo de isolar o oviduto. Os ovários foram retirados e os cornos uterinos separados por um corte no corpo do útero e suspensos para a lavagem.

Com o auxílio de uma sonda, 40ml de solução de PBS com 1% de soro fetal bovino (SFB – Nutricell, Campinas, SP, Brasil) foi injetada pelo infundíbulo do oviduto. O refluxo de líquido para o oviduto foi impedido com pinça hemostática e em seguida realizou-se a secção do oviduto. Segurando as pinças, foi realizado um movimento vertical alternado que permite lavar a porção do corno próxima ao oviduto. O líquido foi colhido em uma placa de petri de 100mm e observado em estereomicroscópio para localização dos embriões. A taxa de recuperação foi determinada pela razão entre o número de estruturas recuperadas e o número total de corpos lúteos observados.

4.2.3 Armazenamento e transporte

Os embriões foram colocados em placas contendo meio TCM HEPES (Nutricell) suplementado com 50µg/ml de gentamicina (Sigma) e 3mg/ml de albumina sérica bovina (BSA – Sigma), selecionados e envasados em palhetas de 0,5ml com meio TCM HEPES. A palheta foi lacrada com álcool polivinílico (PVA) e transportada em recipiente térmico a aproximadamente 38°C. O deslocamento de Poços de Caldas a São Paulo foi realizado em aproximadamente 3 horas. Nos Laboratórios de Fecundação *in vitro*, Clonagem e Transgenia Animal, os embriões foram submetidos a imunocirurgia, fixados em paraformaldeído 4% ou congelados a -80°C para posterior extração de RNA.

4.3 Derivação e cultivo de células embrionárias suínas

Os métodos para derivação e cultivo de células embrionárias suínas serão descritos abaixo.

4.3.1 Imunocirurgia e cultivo de blastocistos suínos

Embriões no estágio de blastocisto foram destinados a imunocirurgia para remoção do trofotoderma e isolamento da MCI. Blastocistos eclodidos foram diretamente lavados em meio TCM Hepes (Gibco) com 10% SFB. Os blastocistos expandidos foram incubados em pronase 8mg/ml (Sigma) por 1 minuto para posterior lavagem. Foram realizadas duas lavagens em TCM Hepes com 10% SFB, seguida por uma lavagem em TCM Hepes adicionado de 1mg PVA/ml (Sigma).

Realizou-se a incubação com 200µl de soro de coelho anti-suíno (1:5 - Sigma) a 38,5°C por 45 minutos. Os embriões foram lavados em TCM Hepes com PVA e incubados com soro-complemento de cobaia (1:10 - Sigma) por 45 minutos. Foram lavados novamente em TCM Hepes com PVA e na seqüência lavados e cultivados em meio GMEM (Glasgow Modified Eagle Media - Sigma) adicionado de 0,1mM β -mercaptoetanol (Sigma), 1% aminoácidos não essenciais (Gibco), 15% SFB (Hyclone, Logan, UT, EUA) e 4ng/ml fator de crescimento de fibroblasto básico (bFGF – Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), denominado GMEM-ES. O cultivo foi realizado em estufa a 37°C e alta umidade em placas contendo MEF inativado ou Matrigel (Becton Dickinson, Bedford, MA. EUA) com meio previamente condicionado em MEF por 24h.

4.3.2 Preparo de placas com fibroblastos e Matrigel

O cultivo de MEF foi realizado a partir de fetos murinos após 14 dias de gestação. Os fetos foram lavados em PBS, fragmentados e incubados em 5ml de 0,02% de tripsina (Gibco) por 20 minutos. A suspensão foi homogeneizada e adicionada de 20ml de meio DMEM (Gibco) com 10% de SFB (Gibco), denominado meio padrão.

As células foram plaqueadas e subcultivados até a terceira passagem quando foram irradiados a 4000rads para inativação no Instituto de Ciências Biomédicas. Posteriormente os fibroblastos foram congelados no dispositivo Mr.Frosty (Nalgene, Rochester, NY, EUA) na concentração de 1×10^6 células vivas por ml, em meio padrão com 10% DMSO (Sigma).

O MEF foi descongelado e por centrifugações seqüenciais com meio GMEM foi retirado o crioprotetor. Cerca de 80.000 células foram distribuídas em placas de 4 poços (NUNC, Rochester, NY, EUA) e cultivadas em meio GMEM-ES por 1 dia antes do co-cultivo com as MCI isoladas.

O Matrigel foi usado na diluição 1:30 com meio GMEM. Os poços das placas NUNC (4 poços) foram recobertos com 35µl da solução de Matrigel em gelo, armazenados a 4°C por pelo menos 12h ou 2 horas à temperatura ambiente antes de colocar na estufa a 37°C.

4.3.3 Dissociação das MCI aderidas e passagem de colônias

Após 4 dias de cultivo em MEF ou Matrigel, as MCI aderidas foram removidas e dissociadas mecanicamente em meio GMEM-ES com o auxílio de pipeta fina e 0,5UI/ml de colagenase (Sigma). As MCI oriundas do MEF foram alocadas individualmente em poços de placa NUNC contendo MEF ou Matrigel. As MCI oriundas do Matrigel foram alocadas somente em poços com Matrigel.

4.4 Cultivo de células-tronco embrionárias murinas

Células-tronco embrionárias da linhagem USP1 na 17^a passagem foram descongeladas e cultivadas em GMEM-ES sobre MEF ou Matrigel. Após atingirem semiconfluência foram subcultivadas usando tripsina 0,1% (Gibco). As colônias foram cultivadas até atingirem a semiconfluência na 18^a passagem e fixadas para imunocitoquímica.

4.5 Colheita de blastocistos murinos

Fêmeas murinas da linhagem 129 foram sincronizadas e superovuladas 5 UI de eCG (Novormon, Calier) por via intraperitoneal e após 48h foram injetadas com 5 UI de hCG (Vetecor, Calier). No quarto dia após a aplicação do hCG, as fêmeas

foram eutanasiadas por deslocamento cervical. O útero foi removido e lavado com PBS adicionado de 1% de SFB.

4.6 PCR

Células-tronco murinas e blastocistos *in vivo* ou *in vitro* em D7 foram congelados em freezer a -80°C . COC suínos também foram congelados para uso como controle positivo. O RNA foi extraído com o *Illustra RNAspin MiniRNA Isolation Kit* (GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, Reino Unido), sendo usado um número entre 25 e 30 blastocistos por extração. A partir do RNA extraído foi sintetizado o cDNA usando o *Superscript First-Strand Synthesis System for RT-PCR* (Invitrogen), seguindo o protocolo do kit.

Cada PCR foi realizada em volume final de $25\mu\text{l}$, utilizando $12,5\mu\text{l}$ de *Sybr GreenER qPCR Supermix* (Invitrogen), quantidades variáveis de *primers* e de cDNA, além de água ultrapura q.s.p. As reações foram realizadas em termociclador quantitativo (Mastercycler Realplex² - Eppendorf Hamburg, Alemanha) nas seguintes condições: 2 minutos a 50°C , 10 minutos a 95°C , 45 ciclos de 15s a 95°C para denaturação, 60s a 55°C para anelamento dos *primers* e extensão.

Os primers foram desenhados usando o programa computacional Primer 3 (Whitehead Institute for Biomedical Research, Cambridge, MA, EUA), conforme descritos na Tabela 1. Os produtos foram analisados em gel de agarose 2% e em seguida seqüenciados.

Tabela 1 – Lista das seqüências dos *primers* para PCR de embriões suínos – São Paulo - 2008

Gene Alvo	Seqüência dos <i>primers</i>	Concentração
Oct-4	F 5'-CACCTCAGGTCGGAGTGG-3'	400nM
	R 5'-AGCTTGGCAAATTGTTTCGAG-3'	400nM
CD9	F 5'GGCTCCGATTTGACTCTCAG 3'	400nM
	R 5'CACCTGATCCTTGTGGGAAT 3'	400nM
α_6 -integrina	F 5'CAGATCCCGGCCTGTTATT 3'	400nM
	R 5'GCTCACCATATTCCGCTAGG 3'	200nM

4.7 Seqüenciamento de DNA

As reações de seqüenciamento dos produtos de PCR oriundo dos *primers* de CD9 e α_6 -integrina foi realizada utilizando o *Kit Big Dye* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) e o equipamento ABI PRISM[®] 377 DNA Sequencer (Applied Biosystems)

4.8 Imunocitoquímica

Os embriões murinos e suínos e os complexos *cumulus*-oócitos suínos após maturação (COC) foram fixados em solução de paraformaldeído 4% em PBS (PF4%). Para todos os tipos celulares foram realizadas lavagens em PBS para retirada do meio de cultivo, incubação em PF4% por 1h à temperatura ambiente para embriões e COC suínos e 30 minutos para embriões murinos. Na seqüência houve lavagem em PBS adicionado de 1mg/ml de polivinilpirrolidona (PBS-PVP - Sigma) e o material foi armazenado a 4°C em PBS-PVP.

As células foram permeabilizadas em PBS 0,25% Triton x-100 (Sigma) por 20 minutos para o Oct-4 e 5 minutos para os antígenos de membrana CD9 e α_6 -integrina. Depois, lavadas 3 vezes em PBS para serem bloqueadas em PBS com 10% soro eqüino (*horse serum* – HS – Gibco) por 30 minutos. Na seqüência, foram incubadas em câmara úmida por 12h a 4°C com os anticorpos primários diluídos (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA - Tabela 1) em PBS com 1% HS. Lavaram-se novamente as células em PBS 3 vezes para incubação com anticorpo secundário diluído (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA - Tabela 2) por 1h à temperatura ambiente no escuro. Por fim, foi realizada lavagem em PBS no escuro e os embriões incubados com CD9 e α_6 -integrina foram incubados por 30 minutos em 0,5 mg/ml RNase (Sigma) seguido por incubação com 50 μ g/ml de iodeto de propídeo (Sigma). Foram então colocados em lâminas preparadas com parafina e glicerol e cobertos com lamínulas para análise em microscopia confocal.

Tabela 2 – Códigos de catálogo e diluições dos anticorpos usados nas reações da imunocitoquímica – São Paulo – 2008

	Oct-4 (<i>goat</i>)	CD9 (<i>rabbit</i>)	α_6 -integrina (<i>rabbit</i>)	<i>Donkey anti-goat</i> Cy5	<i>Donkey anti-rabbit</i> FITC
Código de catálogo	sc3858	sc9148	sc10730	sc3858	sc2090
Diluição	1/50	1/100	1/100	1/200	1/200

4.9 Delineamento Experimental

Os embriões *in vitro* (FIV) ou *in vivo* foram submetidos a imunocirurgia para cultivo das MCI, fixação em PF4% para imunocitoquímica e extração de RNA para a PCR. Os embriões submetidos a imunocirurgia foram cultivados em MEF ou Matrigel por 4 dias. Após esse período as estruturas aderidas foram dissociadas, sendo as cultivadas em MEF transferidas para placas contendo MEF ou Matrigel. As MCI cultivadas em Matrigel foram transferidas somente para placas contendo Matrigel (Figura 3).

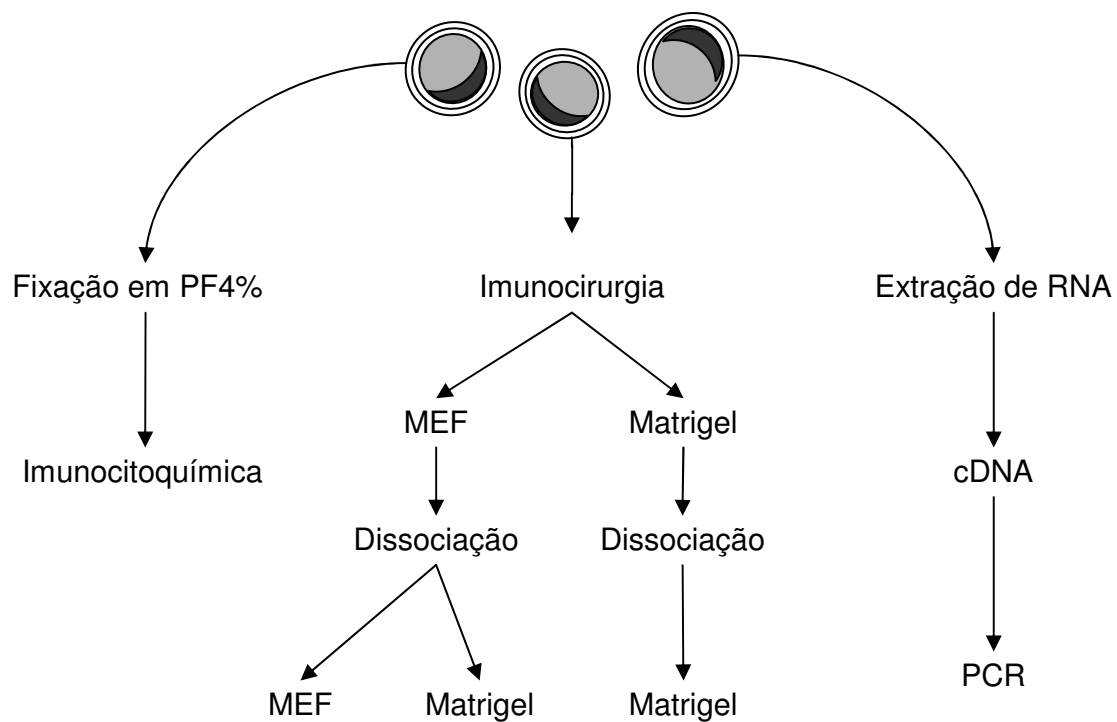


Figura 1 – Representação gráfica do delineamento experimental

5.1 Produção *in vitro* de embriões suínos

Foram realizadas 25 manipulações para a PIV de embriões suínos. Estas manipulações totalizaram 2316 oócitos maturados e submetidos a FIV. Destes, 331 (14,29%) clivaram e 111 (4,79%) atingiram estágio de blastocisto. Os dados completos sobre as manipulações para PIV em suínos estão na tabela 3.

5.2 Colheita de embriões suínos

Foram realizadas 8 colheitas, totalizando 36 marrãs superovuladas. Foram colhidas 657 estruturas, sendo 239 aproveitadas para o cultivo e derivação de células-tronco, imunocitoquímica e PCR. Os dados completos sobre as colheitas de embriões suínos estão na tabela 4. O destino das estruturas aproveitadas está sumarizado na tabela 5.

5.3 Derivação e cultivo de células embrionárias suínas

Os embriões *in vitro* ou *in vivo* submetidos a imunocirurgia foram colocados em cultivo em MEF ou Matrigel por 4 dias. Das 37 MCI cultivadas em MEF, 19 aderiram e foram dissociadas para cultivo em MEF ou Matrigel (Tabela 6). Em Matrigel, 20 MCI foram cultivadas e 3 aderiram às placas, sendo dissociadas e cultivadas novamente em Matrigel (Tabela 7). Nenhuma colônia de células derivadas das MCI de embriões suínos foi observada no cultivo em MEF ou Matrigel (Tabelas 6 e 7).

5.4 Cultivo de células-tronco embrionárias murinas

As células-tronco embrionárias da linhagem USP1 cultivadas em meio GMEM-ES apresentaram colônias com morfologia de células-tronco pluripotentes quando cultivadas em MEF ou Matrigel. As colônias cultivadas em MEF eram bem

delimitadas contendo células pequenas (Figura 2) e as colônias cultivadas em Matrigel eram menos regulares (Figura 3 e 4).

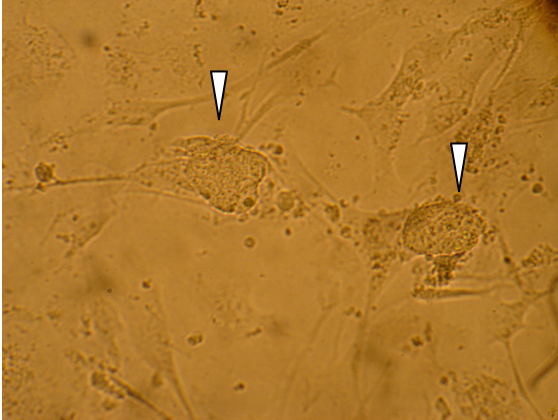


Figura 2 – Colônias de células-tronco embrionárias cultivadas em MEF – as setas brancas apontam as colônias (100X).

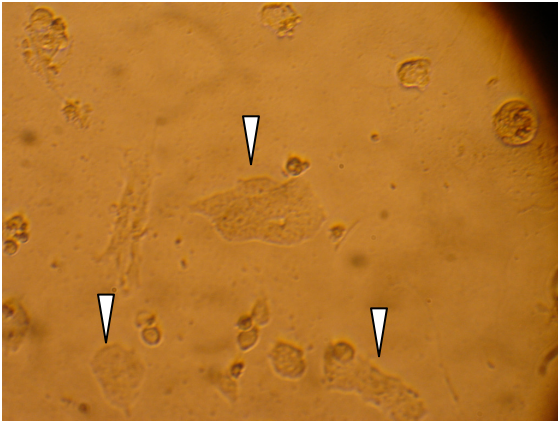


Figura 3 – Colônias de células-tronco embrionárias cultivadas em Matrigel – as setas brancas apontam as colônias (100X).

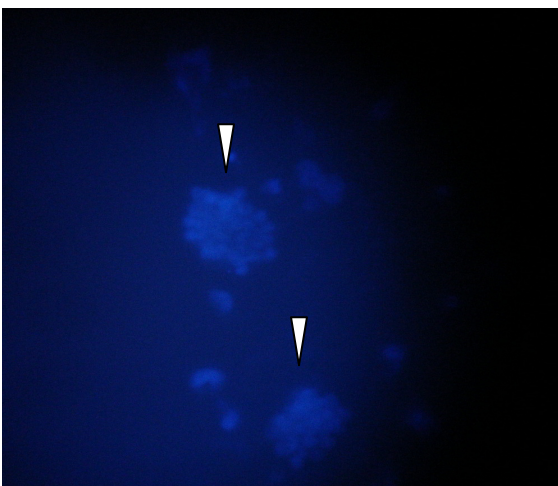


Figura 4 – Colônias de células-tronco embrionárias cultivadas em Matrigel com núcleos corados com DAPI – as setas brancas apontam as colônias (100X).

Resultados

Tabela 3 – Dados das manipulações para PIV de embriões suínos, incluindo taxas de clivagem e de formação de blastocistos – São Paulo – Mar 2007/Dez 2007

Data da MIV	Oócitos	Clivados	Clivagem (%)	Blastocistos	% Blastocistos sobre oócitos	% Blastocistos sobre clivados
12/03/07	125	0	0	0	0,00	0
26/03/07	115	0	0	0	0,00	0
17/04/07	81	9	11,11	0	0,00	0
23/04/07	86	41	47,67	31	36,05	75,6
07/05/07	148	37	25,00	7	4,73	18,91
15/05/07	113	67	59,29	33	29,20	49,25
21/05/07	54	32	59,26	7	12,96	21,86
12/06/07	101	6	5,94	1	0,99	16,67
10/07/07	20	9	45,00	0	0,00	0
16/07/07	93	0	0	0	0,00	0
25/07/07	80	0	0	0	0,00	0
28/08/07	107	8	7,48	0	0,00	0
03/09/07	119	0	0	6	5,04	
11/09/07	78	8	10,26	1	1,28	12,50
12/09/07	66	23	34,85	8	12,12	34,78
17/09/07	90	0	0	0	0,00	0
24/09/07	116	0	0	3	2,59	
15/10/07	88	0	0	0	0,00	0
16/10/07	151	43	28,48	8	5,30	18,6
22/10/07	162	5	3,09	0	0,00	0
30/10/07	80	5	6,25	0	0,00	0
19/11/07	48	4	8,33	0	0,00	0
26/11/07	65	0	0	0	0,00	0
03/12/07	74	6	8,11	1	1,35	16,67
11/12/07	56	28	50,00	5	8,93	17,86
Total	2316	331	14,29 ⁽¹⁾	111	4,79 ⁽¹⁾	33,53 ⁽¹⁾

⁽¹⁾ Média das 25 manipulações.

Resultados

Tabela 4 – Estágios e classificação embrionária – São Paulo - 2008

Estágio Embrionário	Colheitas								Total
	1	2	3	4	5	6	7	8	
Não fecundados		55	5	1					61
Mórula Compacta				3				5	8
Blastocisto inicial				1	4				5
Blastocisto	1			1		18		15	35
Blastocisto expandido				8	6	1		49	64
Blastocisto expandido retraído			17	2		15		10	44
Blastocisto eclodido inicial			4						4
Blastocisto eclodido tardio	16		40	4	30	4			94
Degenerados	14		45	87	20		84	92	342
Total de estruturas	31	55	111	107	60	38	84	171	657
Taxa de recuperação (%) ⁽¹⁾	47,69	56,70	62,36	70,39	56,07	40,86	77,06	67,06	

⁽¹⁾ Razão entre o número de estruturas e o número de corpos lúteos.

Tabela 5 – Estruturas por colheita destinadas ao cultivo celular, imunocitoquímica e PCR – São Paulo -2008

Destino das estruturas	Colheitas								Total
	1	2	3	4	5	6	7	8	
Cultivo	5	0	10	12	6	8	0	12	53
PCR	6	0	31	0	21	19	0	45	122
Imunocitoquímica	5	0	12	5	10	10	0	22	64
Total	16	0	53	17	37	37	0	79	239

Tabela 6 – Derivação de células pluripotentes a partir de MCI cultivada em MEF – São Paulo – 2008

Origem dos embriões	Número de MCI		Número de colônias	
	Total	Aderidas	MEF	Matrigel
<i>In vitro</i>	5	3	0	0
<i>In vivo</i>	32	16	0	0

Tabela 7 – Derivação de células pluripotentes a partir de MCI cultivada em Matrigel – São Paulo - 2008

Origem dos embriões	Número de MCI		Número de colônias
	Total	Aderidas	Matrigel
<i>In vitro</i>	4	0	0
<i>In vivo</i>	16	3	0

5.5 PCR

Cada PCR foi padronizada a partir de cDNA de células-tronco embrionárias murinas, devido ao número reduzido de embriões suínos. Exceção feita à α_6 -integrina que foi detectada em embriões suínos *in vivo* devido à incompatibilidade do *primer* com amostra de cDNA murina.

Foi observada a expressão de Oct4 e CD9 nas ESC murinas, observando-se um produto amplificado por PCR assim como em blastocistos suínos (Figura 5). Durante a padronização da PCR quantitativa, foi observado um padrão anormal de amplificação do gene CD9 na curva de dissociação (Figura 6). Os produtos foram analisados em gel de agarose 2% e verificou-se a presença somente de um produto amplificado por par de *primer* usado (Figura 5 e 7). A amplificação do gene da α_6 -integrina também gerou apenas um produto amplificado (Figura 7).

Os produtos da amplificação dos *primers* CD9 e α_6 -integrina a partir de amostra de blastocistos suínos foram seqüenciados. As seqüências resultantes

foram comparadas com as seqüências de cDNA depositadas em base de dados pública (NCBI GenBank). Foi encontrada homologia de 99% com a seqüência de CD9 de *Sus scrofa* (NM_214006 – Figura 8). O produto de amplificação de α_6 -integrina teve homologia com α_6 -integrina de diversas espécies (Figura 9). A porcentagem de bases idênticas entre o produto e as seqüências das diferentes espécies está descrita na tabela 8.

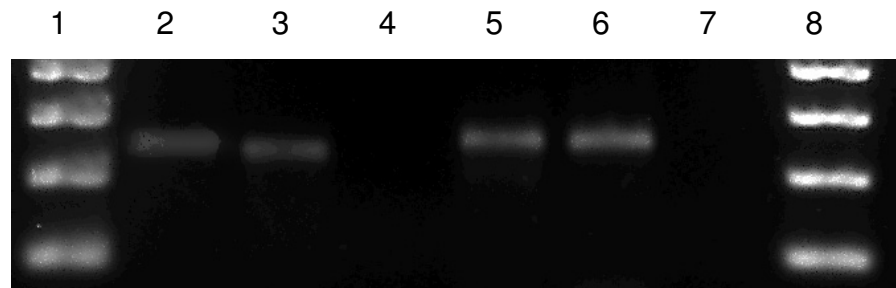


Figura 5 – Produtos de PCR em gel de agarose 2%: 1- peso molecular de 100pb; 2- Oct4 de blastocisto suíno; 3- Oct4 de ESC murinas; 4- controle negativo para Oct4; 5- CD9 de blastocisto suíno; 6- CD9 de ESC murinas; 7- controle negativo para CD9; 8- peso molecular de 100pb.

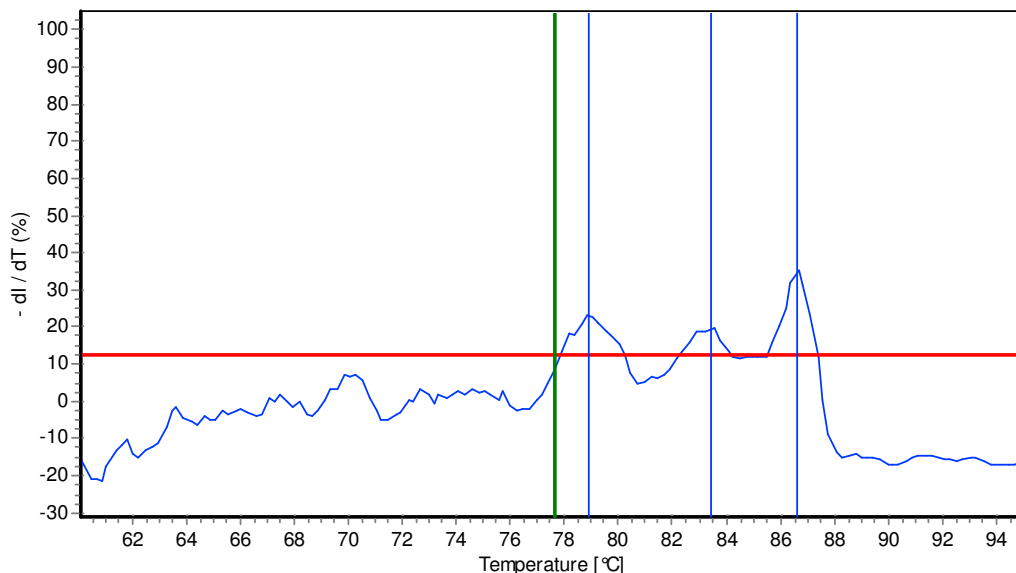


Figura 6 – Curva de dissociação resultante de PCR quantitativo referente ao gene CD9 de blastocistos suínos

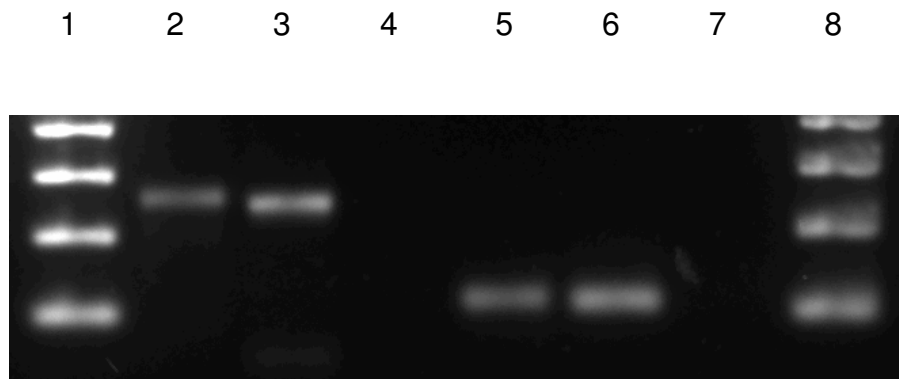


Figura 7 – Produtos de PCR em gel de agarose 2%: 1- peso molecular de 100pb; 2- CD9 de blastocisto suíno; 3- CD9 de COC suíno; 4- controle negativo para CD9; 5- α_6 -integrina de blastocisto suíno; 6- α_6 -integrina de COC suíno; 7- controle negativo para α_6 -integrina; 8- peso molecular de 100pb.

```

ref|NM_214006.1| Sus scrofa CD9 molecule (CD9), mRNA
gb|AY072785.1| Sus scrofa CD9 antigen (CD9) mRNA, complete cds
Length=1227

GENE ID: 397067 CD9 | CD9 molecule [Sus scrofa] (10 or fewer PubMed links)

Score = 446 bits (241), Expect = 2e-122
Identities = 244/246 (99%), Gaps = 0/246 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 1 GGCTCCGATTTGACTCTCAGACCAAGAGCATCTTCGAGCAAGAAAATAATAACTCTAGCT 60
|||||
Sbjct 196 GGCTCCGATTTGACTCTCAGACCAAGAGCATCTTCGAGCAAGAAAATAATAACTCTAGCT 255

Query 61 TCTACACAGGAGTTTATATTCTCATTGGAGCCGGCGCCCTCATGATGGTGGTGGGCTTCC 120
|||||
Sbjct 256 TCTACACAGGAGTTTATATTCTCATTGGAGCCGGCGCCCTCATGATGGTGGTGGGCTTCC 315

Query 121 TGGGCTGCTGCGGGGCCGTGCAGNAGTCCCAGTGCATGCTGGGCTTGTTCCTTGGCTTCC 180
|||||
Sbjct 316 TGGGCTGCTGCGGGGCCGTGCAGGAGTCCCAGTGCATGCTGGGCTTGTTCCTTGGCTTCC 375

Query 181 TCTTGGTGATATTTGCCATTGAAATAGCCGCGGCCATCIGGGGATATTTCCACAGGGATC 240
|||||
Sbjct 376 TCTTGGTGATATTTGCCATTGAAATAGCCGCGGCCATCIGGGGATATTTCCACAAGGATC 435

Query 241 AGGTGA 246
|||||
Sbjct 436 AGGTGA 441

```

Figura 8 – Alta homologia da seqüência de CD9 suína (NM_214006) com a seqüência do produto de PCR comparada em base de dados pública de nucleotídeos (NCBI Blast).

```

Suíno -----GGTGNTCACCATATTC 16
Eqüino (XM_001495066.1) GTATGTCTACATTAACCAGCAAGGCAGATGGAATAATGTCAAGCCAATTC 994
Bovino (NM_001109981.1) GTATGTCTACATTAACCAGCAAGGCAGATGGAATAACGTCAGCCGATTC 1102
Humano (AF166340.1) GGAGGCTGAAGAGAAGGGCAAGTGTGGTACAATGGAGGCTCCCAAGTTC 202
Chimpanzé (XM_515909.2) GTATGTCTACATGAACCAGCAAGGCAGATGGAATAATGTGAAGCCAATTC 1747
Gambá (XM_001368046.1) GTATGTCTACATTAATCAGCAAGGCAAAATGGAATAACGTCAAACCAATTC 1105
                                     *      *      ***

Suíno -CGCTAGGGAGACCCGAGGATGT-TTTCTGACG--GAGATCGAATCTGT 62
Eqüino (XM_001495066.1) -GTCTTAATGGAACCAAGATTCTATGTTTGGCATCGCAGTGAAAAATAT 1043
Bovino (NM_001109981.1) -GTCTTAATGGAACCAAGATTCTATGTTTGGCATTGCAGTCAAAAATAT 1151
Humano (AF166340.1) AGGATTGCCTGTATTAATTCACATACTGTAGACACGCTGATCATGAGCAT 252
Chimpanzé (XM_515909.2) -GTCTTAATGGAACCAAGATTCTATGTTTGGCATTGCAGTAAAAATAT 1796
Gambá (XM_001368046.1) -GCCTTAATGGAACCAAGATTCTATGTTTGGTATTGCAGTCGAAAACAT 1154
                                     *      *      *      *      *      *

Suíno TA--GGTGTTACCTGGGATGGTTGCGTN----- 88
Eqüino (XM_001495066.1) TGGAGATATTAATCAAGACGGCTACCCAGATATCGCAGTTGGAGCTCCCT 1093
Bovino (NM_001109981.1) TGGTGATATTAATCAAGATGGCTACCCAGATATTGCGGTTGGAGCACCCCT 1201
Humano (AF166340.1) CTCAGGTATTA----GGTGTGGTGGTGAATTCTCCAGAGGGTATG 297
Chimpanzé (XM_515909.2) TGGAGATATTAATCAAGATGGCTACCCAGATATTGCGGTTGGAGCTCCCT 1846
Gambá (XM_001368046.1) CGGTGATGTTAATCAAGATGGGTATCCAGATATTGCAGTTGGAGCACCCCT 1204
                                     * * * * *      * * *

```

Figura 9 – Comparação das seqüências de α_6 -integrina entre o produto de PCR e diferentes espécies animais. Asteriscos (*) indicam bases conservadas.

Tabela 8 – Porcentagem de bases nucleotídicas idênticas do gene da α_6 -integrina de diversas espécies comparadas a seqüência de α_6 -integrina obtida após PCR – São Paulo – 2008.

Espécie	Número de acesso	Identidade (%)
Eqüino	XM_001495066	85
Bovino	NM_001109981	81
Humano	AF166340	80
Chimpanzé	XM_515909	79
Gambá	XM_001368046	78

5.6 Imunocitoquímica

As reações de imunocitoquímica foram padronizadas para cada anticorpo primário. Considerando o Oct-4, foram utilizados blastocistos murinos nos quais foi possível observar a marcação positiva no núcleo das células (Figura 10). Para o CD9, foram utilizados oócitos suínos maturados sem células do cumulus, nos quais foi observada a expressão no citoplasma oocitário (Figura 11). Para α_6 -integrina, foram utilizados COC maturados para visualização da proteína alvo nas células do cumulus (Figura 12).

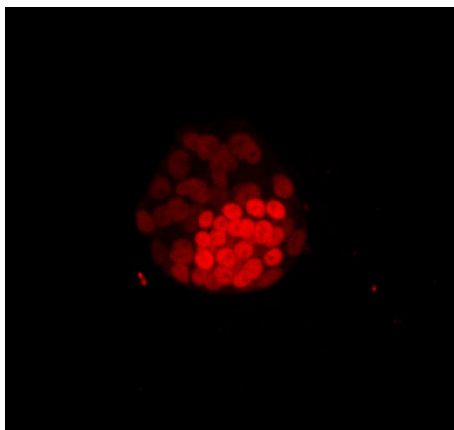


Figura 10 – Embrião murino com marcação positiva para Oct-4 por microscopia confocal (400X)

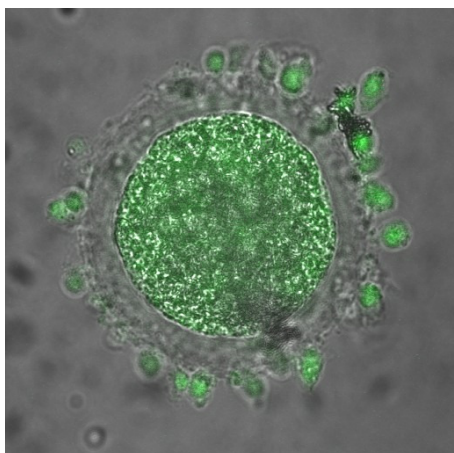


Figura 11 – Oócito suíno após maturação *in vitro* com marcação positiva para CD9 (400X)

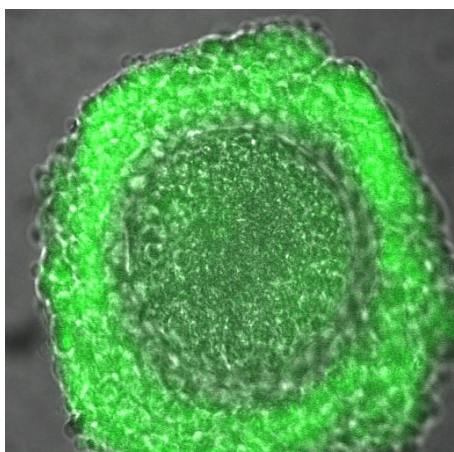


Figura 12 – Complexo *cumulus*-oócito com marcação positiva para α_6 -integrina (400X)

Embriões *in vivo* suínos apresentaram marcação positiva para Oct-4, porém não estava localizada no núcleo das células (figura 13). Também foi observada marcação positiva para CD9 (figura 14) e α_6 -integrina (figura 15), preferencialmente no citoplasma dos trofoblastos (figura 16 e 17).

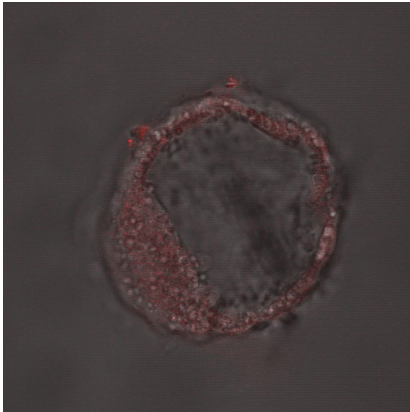


Figura 13 – Embrião suíno *in vivo* com marcação citoplasmática para Oct-4 em microscopia confocal com contraste por interferência diferencial (400X)

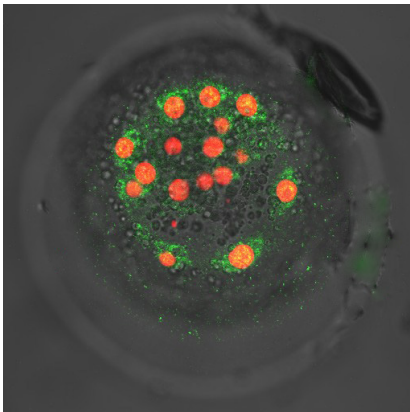


Figura 14 – Embrião suíno *in vivo* com marcação citoplasmática para CD9 em microscopia confocal com contraste por interferência diferencial (400X)

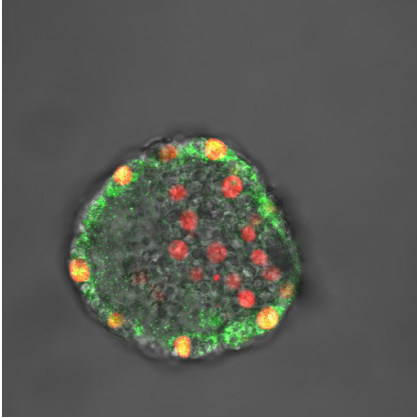


Figura 15 - Embrião suíno *in vivo* com marcação citoplasmática para α_6 -integrina em microscopia confocal com contraste por interferência diferencial (400X)

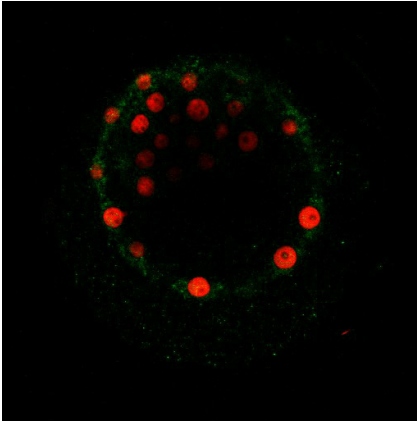


Figura 16 – Embrião *in vivo* com marcação positiva para CD9 preferencialmente nas células do trofoblasta; em microscopia confocal (400x)

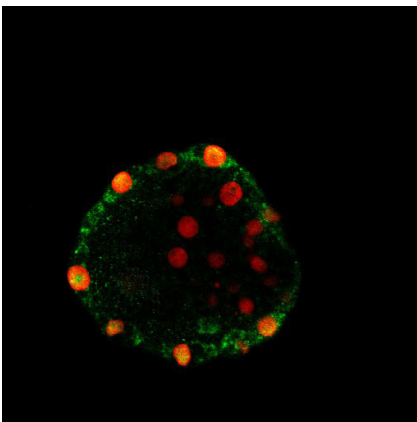


Figura 17 - Embrião *in vivo* com marcação positiva para α_6 -integrina preferencialmente nas células do trofoblasta; em microscopia confocal (400x)

6 DISCUSSÃO

Não foi possível testar a hipótese que as ESC suínas apresentam expressão similar de Oct-4, CD9 e α_6 -integrina à das células da MCI. Nenhuma colônia de ESC suína (pESC – *porcine* ESC) foi obtida a partir de embriões FIV ou *in vivo*.

O baixo número de embriões FIV contribuiu para a falha na obtenção de colônias e também dificultou a padronização das reações de imunocirurgia, assim como as reações de qPCR. Para solucionar a escassez de material biológico, buscou-se a alternativa de colheita de embriões *in vivo*.

Embriões suínos FIV possuem menor número de células que embriões *in vivo* (MACHÁTY; DAY; PRATHER, 1998). Este fator pode influenciar a obtenção de colônias de ESC. Apesar de embriões murinos FIV também apresentarem menor quantidade de células que embriões *in vivo* (GIRITHARAN et al., 2007), é possível a derivação de ESC de embriões murinos FIV (LIU et al., 2006).

O uso de embriões *in vivo* também não possibilitou a derivação de colônias de pESC. Sugere-se que o tempo da colheita até o cultivo, que incluindo transporte e imunocirurgia foi de aproximadamente 5 horas, influenciou a qualidade embrionária. Embora algumas estruturas tenham evoluído de estágio embrionário ou blastocistos re-expandirem após o transporte, pode ter ocorrido estresse oxidativo, diminuindo a viabilidade da MCI por alterações de expressão de genes relacionados ao metabolismo energético (BALASUBRAMANIAN et al., 2007).

O cultivo de ESC murinas (mESC) da linhagem USP1 demonstra que o meio GMEM-ES está adequado para o cultivo de células pluripotentes, assim como o MEF e Matrigel. Isto minimizaria os efeitos do sistema de cultivo celular no insucesso da obtenção de colônias de pESC. É provável que os requerimentos das células suínas sejam diferentes das murinas para manutenção da pluripotência.

Diversas tentativas de obtenção de pESC foram realizadas por diferentes grupos de pesquisa no mundo com diferentes métodos (revisado por VACKOVA; UNGROVA; LOPES, 2007). Porém, nenhuma linhagem apresentou as características desejadas para a determinação de pESC .

A manutenção de ESC pluripotentes em cultivo ocorre pela ativação de genes similares em camundongos e humanos (SATO et al., 2003), porém a ativação destes

genes pode ocorrer por vias diferentes (SMITH et al., 1988; REUBINOFF et al., 2000; LIU et al., 2007).

O uso de LIF em cultivo de mESC ativa a via de sinalização JAK/STAT utilizando-se do transdutor de sinal gp130 para manter a pluripotência (NIWA, 2001), porém em ESC humanas (hESC) o LIF não mantém a pluripotência (REUBINOFF et al., 2000). Em hESC verificou-se que a adição de LIF humano levou à fosforilação de STAT3, porém isto não é necessário para a manutenção da pluripotência devido a não ocorrência de fosforilação e migração nuclear de STAT3 em hESC pluripotentes (DAHÉRON et al., 2004).

Além disso, a inibição de ERK (proteína da superfamília de MAPK) mantém a pluripotência de mESC (BURDON et al., 1999) enquanto a ativação de ERK em hESC pluripotentes ocorre relacionada à ação de FGF-2 (DVORAK et al., 2005). O bloqueio de receptores de FGF-2 levou à diminuição da fosforilação de MEK e de seu substrato ERK, causando a diferenciação de hESC (DVORAK et al., 2005).

Ainda, BMP4 atua favoravelmente na manutenção da pluripotência em mESC ativando *inhibitor of differentiation protein* (Id) via ativação de SMAD1 (YING et al., 2003) e também inibindo ERK (QI et al., 2004). Entretanto, em hESC o BMP4 não mantém a pluripotência ao induzir a diferenciação em endoderma primitivo e trofoblasto (XU et al., 2002).

A partir destas diferenças interespecíficas das ESC mais estudadas, pode-se formular uma hipótese que vias diferentes são ativadas para expressão dos genes de pluripotência em pESC. Isto implicaria em diferentes métodos no cultivo de pESC, como a adição de hormônios e sistemas de cultivo ou co-cultivo diferentes.

Outra hipótese é que embriões suínos não possuam vias similares para manutenção da pluripotência devido à grande diferença da implantação embrionária entre ungulados e primatas ou roedores (SENGER, 2003). Estudos de expressão gênica global em embriões suínos seriam necessários para elucidar a presença de vias bioquímicas e genes ativados de maneira semelhante a humanos e murinos.

Durante a implantação há comunicação entre útero e embrião por meio de moléculas como o LIF, sintetizado pelo endométrio murino e humano (WANG; DEY, 2006). Em camundongos homocigotos negativos para LIF (*Lif*^{-/-}) não ocorre a implantação e os embriões permanecem em diapausa (revisado por WANG; DEY, 2006). Não há relato de diapausa em blastocistos suínos, o que sugere diferentes mecanismos moleculares presentes nestes embriões.

Apesar dessa diferença fisiológica, genes relacionados à pluripotência como Oct4, Nanog e Sox2 são expressos em epiblasto suíno em cultivo (BLOMBERG; SCHREIER; TALBOT, 2008). A quantidade expressa de Oct4 aumentou significativamente em epiblasto cultivado por 48h em relação a MCI de embriões, porém esta expressão diminuiu após 96h, indicando um início de diferenciação celular (BLOMBERG; SCHREIER; TALBOT, 2008).

Neste estudo, foi observada a expressão gênica de Oct-4 por RT-PCR em blastocistos suínos. O Oct-4 também foi detectado por imunocitoquímica na MCI e em trofoblastos. Apesar de ser fortemente associada a células da MCI em murinos e humanos, a expressão de Oct-4 já foi demonstrada em trofoblastos de bovinos e suínos (KIRCHHOF et al., 2000) e em caprinos juntamente com a expressão de Nanog (HE et al., 2006), que é um fator de transcrição relacionado à pluripotência (CHAMBERS et al., 2003). Em bovinos foram detectadas as expressões de Oct-4, Nanog e Sox-2 nos trofoblastos em embriões na fase de alongação (DEGRELLE et al., 2005).

Assim como o Oct-4, o CD9 está relacionado com a pluripotência de mESC, pois sua expressão diminui durante a diferenciação (OKA et al., 2002, CUI et al., 2004). Em células de câncer de mama demonstrou-se que CD9 atua bloqueando a via do fosfoinositídeo-3-kinase (PI3K – SAITO et al., 2006). Curiosamente, o bloqueio farmacológico da via PI3K diminuiu a capacidade do LIF em manter ESC diferenciadas (PALING et al., 2004) e diminuiu a expressão de Nanog (STORM et al., 2007).

Apesar disso, o CD9 está expresso em diversas linhagens de hESC derivadas em diferentes países (INTERNATIONAL STEM CELL INITIATIVE, 2007). Deste modo, fica clara sua importância como marcador de pluripotência em ESC, talvez atuando bioquimicamente de maneira diferente em ESC do que em células tumorais.

Até o momento não havia sido descrita a expressão de CD9 em blastocistos suínos. Apesar do padrão anormal de expressão do CD9 observado na curva de dissociação do PCR quantitativa, apenas um produto de PCR foi observado em gel de agarose. Devido à maior sensibilidade da PCR quantitativa em relação ao gel, optou-se por seqüenciar o produto, que é uma técnica mais sensível. Os resultados indicaram que havia apenas um produto, o CD9 suíno.

A expressão desta molécula no estágio de blastocisto poderia permitir sua utilização como marcador de pluripotência para caracterização de colônias de pESC.

Entretanto, por imunocitoquímica observou-se que a expressão da tetraspanina CD9 ocorre preferencialmente nos trofoblastos. Em embriões murinos foi observado que o CD9 é expresso em trofoblastos além da MCI, exercendo papel regulador na implantação (LIU et al., 2006).

O CD9 localiza-se usualmente na membrana das células, porém outros marcadores de pluripotência localizados normalmente em membrana de hESC, como SSEA4, TRA-1-81 e TRA-1-60, também foram observados no citoplasma de ESC-símbles bovinas (MUÑOZ et al., 2008).

A α_6 -integrina é um receptor de laminina cuja expressão está relacionada ao CD9 (BERDITCHEVSKI; ZUTTER; HEMLER, 1996). Durante a diferenciação de ESC ocorre mudança da isoforma B da α_6 -integrina pela isoforma A (COOPER et al., 1991). A imunocitoquímica e PCR seguidas pelo seqüenciamento de DNA permitiram a verificação da expressão de α_6 -integrina pela primeira vez em blastocistos suínos. Porém, estudos para a determinação da presença das isoformas variantes ainda devem ser realizados.

A expressão de α_6 -integrina em blastocisto suíno poderia indicar a possibilidade do uso do Matrigel como substrato para cultivo de pESC, apesar dos resultados apresentados não terem sido positivos. Contudo, a localização preferencialmente trofoblástica e citoplasmática da α_6 -integrina não permite inferir se as células da MCI teriam capacidade de aderir ao Matrigel e explica a baixa adesão de MCI no Matrigel.

A expressão de Oct-4, CD9 e α_6 -integrina nos trofoblastos evidenciam as diferenças na expressão de fatores entre ungulados e murinos ou humanos. Estes dados indicam a necessidade de mais estudos para determinar moléculas que poderão ser utilizadas como marcadores de pluripotência em suínos.

7 CONCLUSÕES

Não foi possível estabelecer cultivo de células-tronco embrionárias pluripotentes em suínos utilizando o Matrigel[®] nas condições descritas.

Blastocistos suínos *in vitro* e *in vivo* apresentam expressão de CD9 e α_6 -integrina.

Não foi detectada presença de isoforma de α_6 -integrina pela técnica de PCR com os *primers* utilizados.

Referências

- BALASUBRAMANIAN, S.; SON, W. J.; KUMAR, B. M.; OCK, S. A.; YOO, J.G.; IM, G. S.; CHOE, S. Y.; RHO, G. J. Expression pattern of oxygen and stress-responsive gene transcripts at various developmental stages of in vitro and in vivo preimplantation bovine embryos. **Theriogenology**, v. 68, p. 265-275, 2007.
- BERDITCHEVSKI, F.; ZUTTER, M. M.; HEMLER, M. E. Characterization of novel complexes on the cell surface between integrins and proteins with 4 transmembrane domains (TM4 proteins). **Molecular Biology of the Cell**, v. 7, p. 193-207, 1996.
- BLOMBERG, L. E. A; SCHREIER, L. L.; TALBOT, N. C. Expression analysis of pluripotency factors in the undifferentiated porcine inner cell mass and epiblast during in vitro culture. **Molecular Reproduction and Development**, v. 75, p. 450-63, 2008.
- BONGSO, A.; FONG, C. Y.; NG, S. N.; RATNAM, S. Isolation and culture of inner cell mass cells from human blastocysts. **Human Reproduction**, v.9 , p.2110-2117, 1994.
- BREVINI, T. A. L.; TOSETTI, V.; CRESTAN, M.; ANTONINI, S.; GANDOLFI, F. Derivation and characterization of pluripotent cell lines from pig embryos of different origins. **Theriogenology**, v. 67, p. 54-63, 2007.
- BURDON, T.; TRACEY, C.; CHAMBERS, I.; NICHOLS, J.; SMITH, A. Suppression of SHP-2 and ERK signalling promotes self-renewal of mouse embryonic stem cells. **Developmental Biology**, v. 210, p. 30-43, 1999.
- CHAMBERS, I.; COLBY, D.; ROBERTSON, M.; NICHOLS, J.; LEE, S.; TWEEDIE, S.; SMITH, A. Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. **Cell**, v. 113, p. 643-655, 2003.

-
- CHEN, L. R.; SHIUE, Y. L.; BERTOLINI, L.; MEDRANO, J. F.; BONDURANT, R. H.; ANDERSON, G. B. Establishment of pluripotent cell lines from porcine preimplantation embryos. **Theriogenology**, v. 52, p.195-212, 1999.
- CHIN LIN, T.; YEN, J. M.; GONG, K. B.; HSU, T. T.; CHEN, L. R. IGF-I/IGFBP-I increases blastocyst formation and total blastocyst cell number in mouse embryo culture and facilitates the establishment of a stem cell line. **BMC Cell Biology**, v.4 2003. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?tool=pubmed&pubmedid=14499003>> Acesso em: 02 mar. 2008.
- COOPER, H. M.; TAMURA, R. N.; QUARANTA, V. The major laminin receptor of mouse embryonic stem cells is a novel isoform of the $\alpha_6\beta_1$ integrin. **The Journal of Cell Biology**, v. 115, p. 843-850, 1991.
- CUI, L. I.; JOHKURA, K.; YUE, F.; OGIWARA, N.; OKOUCHI, Y.; ASANUMA, K.; SASAKI, K. Spatial distribution and initial changes of SSEA-1 and other cell adhesion-related molecules on mouse embryonic stem cells before and during differentiation. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 52, p. 1447-1457, 2004.
- DAHÉRON, L.; OPITZ, S. L.; ZAEHRES, H.; LENSCH, M. W.; ANDREWS, P. W.; ITSKOVITZ-ELDOR, J.; DALEY, G. Q. LIF/STAT3 signaling fails to maintain self-renewal of human embryonic stem cells. **Stem Cells**, v. 22, p. 770-778, 2004.
- DEGRELLE, S. A.; CAMPION, E.; CABAU, C.; PIUMI, F.; REINAUD, P.; RICHARD, C.; RENARD, J. P.; HUE, I. Molecular evidence for a critical period in mural trophoblast development in bovine blastocysts. **Developmental Biology**, v. 288, p. 448-460, 2005.
- DVORAK, P.; DVORAKOVA, D.; KOSKOVA, S.; VODINSKA, M.; NAJVIRTOVA, M.; KREKAC, D.; HAMPL, A. Expression and potential role of fibroblast growth factor 2 and its receptors in human embryonic stem cells. **Stem Cells**, v. 23, p. 1200-1211, 2005.

ECKBLOM, P.; VESTWEBER, D.; KEMLER, R. Cell-matrix interactions and cell adhesion during development. **Annual Reviews of Cell Biology**, v. 2, p. 27-47, 1986.

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

GIRITHARAN, G.; TALBI, S.; DONJACOUR, A.; DI SEBASTIANO, F.; DOBSON, A. T.; RINAUDO, P. F. Effect of in vitro fertilization on gene expression and development of mouse preimplantation embryos. **Reproduction**, v. 134, p. 63-72, 2007.

HE, S.; PANT, D.; SCHIFFMACHER, A.; BISCHOFF, S.; MELICAN, D.; GAVIN, W.; KEEFER, C. Developmental expression of pluripotency determining factors in caprine embryos: novel pattern of NANOG protein localization in the nucleolus. **Molecular Reproduction and Development**, v. 73, p. 1512-22, 2006.

HYNES, R. O. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. **Cell**, v. 69, p. 11-25, 1992.

INTERNATIONAL STEM CELL INITIATIVE. Characterization of human embryonic stem cell lines by the International Stem Cell Initiative. **Nature Biotechnology**, v. 25, p. 803–816, 2007.

KIRCHHOF, N.; CARNWATH, J. W.; LEMME, E.; ANASTASSIADIS, K.; SCHÖLER, H.; NIEMANN, H. Expression pattern of Oct-4 in preimplantation embryos of different species. **Biology of Reproduction**, v. 63, p. 1698-705, 2000.

LI, M.; LI, Y.H.; HOU, Y.; SUN, X.F.; SUN, Q.; WANG, W.H. Improved isolation and culture of embryonic stem cells from chinese miniature pig. **Journal of Reproduction and Development**, v. 50, p. 237-244, 2004a.

LI, M.; LI, Y. H.; HOU, Y.; SUN, X. F.; SUN, Q.; WANG, W. H. Isolation and culture of pluripotent cells from *in vitro* produced porcine embryos. **Zygote**, v. 12, p. 43-48, 2004b.

LIU, J.; SCHOONJANS, L.; TIELENS, S.; SPELEMAN, F.; CORNELISSEN, M.; DE SUTTER, P.; DHONT, M.; VAN DER ELST, J. Culturing *in vitro* produced blastocysts in sequential media promotes ES cell derivation. **Molecular Reproduction and Development**, v. 73, p. 1017-1021, 2006.

LIU, N.; LU, M.; TIAN, X.; HAN, Z. Molecular mechanisms involved in self-renewal and pluripotency of embryonic stem cells. **Journal of Cell Physiology**, v. 211, p. 279-286, 2007.

LIU, W. M.; CAO, Y. J.; YANG, Y. J.; LI, J.; HU, Z.; DUAN, E. K. Tetraspanin CD9 regulates invasion during mouse embryo implantation. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 36, p. 121-130, 2006.

MACHÁTY, Z.; DAY, B. N.; PRATHER, R. S. Development of early porcine embryos *in vitro* and *in vivo*. **Biology of Reproduction**, v. 59, p. 451-455, 1998.

MATSUDA, T.; NAKAMURA, T.; NAKAO, K.; ARAI, T.; KATSUKI, M.; HEIKE, T.; YOKOTA, T. STAT 3 activation is sufficient to maintain an undifferentiated state of mouse embryonic stem cells **European Molecular Biology Organization Journal**, v. 18, p. 4261-4269, 1999.

MINAMI, M.; INOUE, M.; WEI, S.; TAKEDA, K.; MATSUMOTO, M.; KISHIMOTO, T.; AKIRA, S. STAT 3 activation is a critical step in gp130-mediated terminal differentiation and growth arrest of a myeloid leukemia cell line. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 93, p. 3963-3966, 1996.

MUÑOZ, M.; RODRÍGUEZ, A.; DE FRUTOS, C.; CAAMAÑO, J. N.; DÍEZ, C.; FACAL N.; GÓMEZ, E. Conventional pluripotency markers are unspecific for bovine embryonic-derived cell-lines. **Theriogenology**, 15 apr. 2008. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.02.014>>. Acesso em: 29 jun. 2008.

- NICHOLS, J.; EVANS, E. P.; SMITH, A. G. Establishment of germ-line-competent embryonic (ES) cells using differentiation inhibiting activity. **Development**, v. 110, p. 1341-1348, 1990.
- NICHOLS, J.; ZEVNIK, B.; ANASTASSIADIS, K.; NIWA, H.; KLEWE-NEBENIUS, D.; CHAMBERS, I.; SCHOLER, H.; SMITH, A. Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. **Cell**, v. 95 p. 379-391, 1998.
- NIWA, H. Molecular mechanisms to maintain stem cell renewal of ES cells **Cell Structure and Function**, v. 26, p. 137-148, 2001.
- NOTARIANNI, E.; LAURIE, S.; MOOR, R. M.; EVANS, M. J. Maintenance and differentiation in culture of pluripotential embryonic cell lines from pig blastocysts. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. __, p. 51-56, 1990. Suppl.41
- OKA, M.; TAGOKU, K.; RUSSEL., T. L.; NAKANO, Y.; HAMAZAKI, T.; MEYER, E. M.; YOKOTA, T.; TERADA, N. CD9 is associated with leukemia inhibitory factor-mediated maintenance of embryonic stem cells. **Molecular Biology of the Cell**, v. 13, p. 1274-1281, 2002.
- OKITA, K.; ICHISAKA, T.; YAMANAKA, S. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells **Nature**, v. 448, p. 313-317, 2007.
- PALING, N. R. D.; WHEADON, H.; BONE, H. K.; WELHAM, M. J. Regulation of Embryonic stem cell self-renewal by phosphoinositide 3-kinase-dependent signaling. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, p. 48063-48070, 2004.
- PIEDRAHITA, J. A.; ANDERSON, G. B.; BONDURANT, R. H. On the isolation of embryonic stem cells: comparative behavior of murine, porcine and ovine embryos. **Theriogenology**, v. 34, p. 879-901, 1990.

QI, X.; LI, T. G.; HAO, J.; HU, J.; WANG, J.; SIMMONS, H.; MIURA, S.; MISHINA, Y.; ZHAO, G.Q. BMP4 supports self-renewal of embryonic stem cells by inhibiting mitogen-activated protein kinase pathways. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 101, p. 6027-6032, 2004.

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

SAITO, Y.; TACHIBANA, I.; TAKEDA, Y.; YAMANE, H.; HE, P.; SUZUKI, M.; MINAMI, S.; KIJIMA, Y.; YOSHIDA, M.; KUMAGAI, T.; OSAKI, T.; KAWASE, I. Absence of CD9 enhances adhesion-dependent morphologic differentiation, survival, and matrix metalloproteinase-2 production in small cell lung cancer cells. **Cancer Research**, v. 66, p. 9557-9565, 2006.

SATO, N.; SANJUAN, I. M.; HEKE, M.; UCHIDA, M.; NAEF, F.; BRIVANLOU, A. H. Molecular signature of human embryonic stem cells and its comparison with the mouse. **Developmental Biology**, v. 260, p. 404-413, 2003.

SENGER, P. L. Placentation, the endocrinology of gestation and parturition
In: _____ **Pathways to Pregnancy and Parturition**. Pullman: Current Conceptions, 2003. p. 304-325.

SCHOLER, H.R.; DRESSLER, G.R.; BAILING, R.; ROHDEWOHL, H.; GRUSS, P. Oct-4: a germline-specific transcription factor mapping to the mouse t-complex
European Molecular Biology Organization Journal, v. 9, p. 2185-2195, 1990.

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

-
- SPECTOR, D. L.; GOLDMAN, R. D.; LEINWAND, L. A. Culture and *in vitro* differentiation of mouse embryonic stem cells In: _____ **Cells: a laboratory manual**. Woodbury: Cold Spring Laboratory Press, 1997. v.1, p. 8 1-8 22.
- STOJKOVIC, P.; LAKO, M.; PRZYBORSKI, S.; STEWART, R.; ARMSTRONG, L.; EVANS, J.; ZHANG, X.; STOJKOVIC, M. Human-serum matrix supports undifferentiated growth of human embryonic stem cells. **Stem Cells**, v. 23, p. 895-902, 2005.
- STORM, M. P.; BONE, H. K.; BECK, C. G.; BOURILLOT, P. Y.; SCHREIBER, V.; DAMIANO, T.; NELSON, A.; SAVATIER, P.; WELHAM M. J. Regulation of Nanog expression by phosphoinositide 3-kinase-dependent signaling in murine embryonic stem cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, p. 6265-6273, 2007.
- TAKAHASHI, K.; TANABE, K.; OHNUKI, M.; NARITA, M.; ICHISAKA, T.; TOMODA, K.; YAMANAKA, S. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. **Cell**, v. 131, p. 861-872, 2007.
- TAKAHASHI, K.; YAMANAKA, S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. **Cell**, v. 126, p. 663-676, 2006.
- TALBOT, N. C.; POWELL, A. M.; REXROAD, C. E. In vitro pluripotency of epiblasts derived from bovine blastocysts. **Molecular Reproduction and Development**, v. 42, p. 35-52, 1995.
- VACKOVA, I.; UNGROVA, A.; LOPES, F. Putative embryonic stem cell lines from pig embryos. **Journal of Reproduction and Development**, v. 53, p. 1137-1149, 2007.
- VUKICEVIC, S.; KLEINMAN, H. K.; LEYTON, F. P.; ROBERTS, A. B.; ROCHE, N. J.; REDDI, A. H. Identification of multiple active growth factors in basement membrane Matrigel suggests caution in interpretation of cellular activity related to extracellular matrix components. **Experimental Cell Research**, v. 202, p. 1-8, 1992.

WANG H.; DEY S. K. Roadmap to embryo implantation: clues from mouse models. **Nature Reviews Genetics**, v. 7, p. 185-99, 2006.

WANG, L.; LI, L.; MENENDEZ, P.; CERDAN, C.; BHATIA, M. Human embryonic stem cells maintained in the absence of mouse embryonic fibroblasts or conditioned media are capable of hematopoietic development. **Blood**, v. 105, p. 4598-4603, 2005.

WERNIG, M.; MEISSNER, A.; FOREMAN, R.; BRAMBRINK, T.; KU, M.; HOCHEDLINGER, K.; BERNSTEIN, B. E.; JAENISCH, R. In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state. **Nature**, v. 448, p. 318-324, 2007.

WHEELER, M. B. Development and validation of swine embryonic stem cells: a review. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 6, p. 563-568, 1994.

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

XU, C.; ROSLER, E.; JIANG, J.; LEBROWSKI, J. S.; GOLD, J. D.; O'SULLIVAN, C.; DELAVAN-BOORSMA, K.; MOK, M.; BRONSTEIN, A.; CARPENTER, M. K. Basic fibroblast growth factor supports undifferentiated human embryonic stem cell growth without conditioned medium. **Stem Cells**, v. 23, p. 315-323, 2005.

XU, R. H.; CHEN, X.; LI, D. S.; LI, R.; ADDICKS, G. C.; GLENNON, C.; ZWAKA, T. P.; THOMSON, J. A. BMP4 initiates human embryonic stem cell differentiation to trophoblast. **Nature Biotechnology**, v. 20, p. 1261-1264, 2002.

YING, Q. L.; NICHOLS, J.; CHAMBERS, I.; SMITH, A. BMP induction of Id proteins suppresses differentiation and sustains embryonic stem cell self-renewal in collaboration with STAT3. **Cell**, v. 115, p. 281-292, 2003.

YU, J.; VODYANIK, M. A.; SMUGA-OTTO, K.; ANTOSIEWICZ-BOURGET, J.; FRANE, J. L.; TIAN, S.; NIE, J.; JONSDOTTIR, G. A.; RUOTTI, V.; STEWART, R.; SLUKVIN, I. I.; THOMSON, J. A. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. **Science**, v. 318, p. 1917-1920, 2007.

Anexo A – Meio de lavagem

Meio Hepes buffered Tyrode's (HbT)

Componente	Concentração
NaCl	113,7 mM
NaHCO ₃	2 mM
Na Lactate	12,95 mM
Na Pyruvate	0,2 mM
NaH ₂ PO ₄	0,34 mM
KCL	3,22 mM
CaCl ₂ 2H ₂ O	2,04 mM
MgCl ₂ 6H ₂ O	0,5 mM
Hepes	10 mM
BSA V	3 mM
SFB	10%
Phenol Red	0,027 mM

Anexo B – Meio de fecundação

Meio Tris Buffered Medium modificado (mTBM)

Componentes	Concentração
NaCl	113,10 mM
KCl	3,00 mM
CaCl ₂	7,50 mM
Glucose	11,00 mM
Piruvato de Sódio	5,00 mM
Tris	20,00 mM
Cafeina	2,00 mM
Cisteina	0,57 mM
BSA FAF	2 mM

Anexo C – PERCOLL

Componente	Quantidade
Percoll	0,9ml
Solução 10x	100µl
NaHCO ₃	0,0021g
Ácido Láctico	3,7µl
MgCl ₂	3,9µl
CaCl ₂	2,0µl

Anexo D - Meio de cultivo

Componentes	PZM – 3 + BSA
NaCl	108.00 mM
KCl	10.00 mM
Ca lactato	2.00 mM
KH ₂ PO ₄	0.35 mM
MgSO ₄ 7H ₂ O	0.40 mM
NaHCO ₃	25.07 mM
Glutamina	1.0 mM
Hipotaurina	5.0 mM
Gentamicina	50 Ui/ml
BSA	3 mg/ml
Aminoácidos Essenciais (Sigma M7145)	20.00 ml/L
Aminoácidos não Essenciais (Sigma B6766)	10.00 ml/L