

**FLAVIA REGINA OLIVEIRA DE BARROS**

**Identificação de marcadores de pluripotência em  
células-tronco embrionárias e embriões suínos**

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

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.





UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

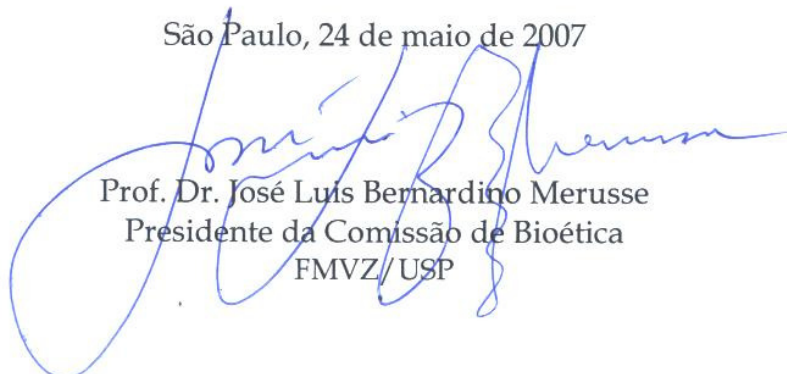
*Comissão Bioética*

## CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado “Identificação de marcadores de pluripotência em células-tronco embrionárias de suínos”, protocolado sob o nº1064/2007, utilizando 3 (três) machos suínos e 2 (duas) fêmeas murinas prenhes, 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 em reunião de 23/05/07.

(We certify that the Research “Pluripotency markers identification in swine embryonic stem cells”, protocol number 1064/2007, utilizing 3 (tree) swines and 2 (two) mice, under the responsibility Prof. Dr. José Antonio Visintin, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the School of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved in the meeting of the day 05/23/2007).

São Paulo, 24 de maio de 2007



Prof. Dr. José Luis Bernardino Merusse  
Presidente da Comissão de Bioética  
FMVZ/USP



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

*Comissão Bioética*

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado “Estabelecimento do cultivo de células-tronco embrionárias e verificação de marcadores de pluripotência em suínos”, protocolado sob o nº1106/2007, utilizando 3 (três) machos suínos, 2 (duas) fêmeas murinas prenhes e 15 (quinze) fêmeas suínas, 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 em reunião de 23/05/07.

(We certify that the Research “Embryonic stem cells establishment and assessment of pluripotency markers in swine”, protocol number 1106/2007, utilizing 20 (twenty) swines, under the responsibility Prof. Dr. José Antonio Visintin, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the School of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved in the meeting of the day 05/23/2007).

São Paulo, 24 de maio de 2007

Prof. Dr. José Luis Bernardino Merusse  
Presidente da Comissão de Bioética  
FMVZ/USP

## FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: DE BARROS, Flavia Regina Oliveira

Título: Identificação de marcadores de pluripotência em células-tronco embrionárias e embriões suínos

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: \_\_\_\_\_

***Às minhas duas mães, Carmen e Claryce.***

***Ao Dan.***

## AGRADECIMENTOS

Quero algo especial  
Quero algo diferente  
Quero dizer, expressar, agradecer

Quero lembrar minhas duas mães  
Carmen e Claryce  
Que nenhuma conquista é solitária  
As minhas nunca serão  
Minhas? Não, nossas!  
Essa aqui é de vocês também!

Quero dizer ao Dan,  
Meu amor,  
Meu parceiro,  
Meu amigo,  
Obrigada, muito obrigada  
Pelo apoio incondicional!

Quero parabenizar meu Orientador,  
Professor Doutor que virou Diretor  
Pela coragem  
De aceitar mais essa “bucha”  
Por me orientar mesmo quando  
Não sabe que o faz  
Obrigada, Visintin!  
Por acreditar em mim  
E continuar acreditando...

Quero dizer obrigada  
À “co-orientadora”  
Que nunca diz não  
À Mayra  
Que me ensina  
A aprender,  
A ensinar

Quero falar  
Falar da amiga, colega,  
Amiga! Mari!  
Mas ela não deixa  
Fala mais do que eu  
Obrigada, por tudo!  
Me ensinou FIV suína,  
Só não tenho certeza  
Se aprendi... Onde estão os BLs?



Quero mandar um telegrama  
Internacional,  
E dizer ao amigo Marcelo  
Que trabalhar sozinho  
É impossível  
E trabalhar junto,  
É muito melhor!  
Obrigada, pela paciência!

Quero ter mais folhas  
E agradecer um por um  
Pois todos fizeram parte

Quero dizer à Camilla,  
Que consegue fazer  
10 coisas ao mesmo tempo,  
Consegue ser três ao mesmo tempo  
Doutoranda, mãe e amiga,  
Obrigada por sempre estar por perto!

Quero que a Rê saiba  
Que mais organizada  
Mais disposta, mais divertida,  
Amiga não há  
Tudo fica mais fácil com você!

Queria que estivesse aqui!  
A Alê quis ir embora,  
Quase foi,  
Não foi,  
Agora... foi.  
Obrigada por tudo!

Quero agradecer  
O Weber e o Zeca,  
Cada um com o seu jeito  
Me ajudou e me apoiou!

Quero dizer à Maza,  
Que além de ser boa *roomate*  
Sabe entender minhas dúvidas e  
É uma grande professora.  
Obrigada.

Quero que a Fabíola  
Saiba que tê-la por perto  
Me dá confiança  
Obrigada pelos ensinamentos!

Quero dizer à Maran  
Que a sua companhia diária  
É ótima e divertida!  
Você faz parte da equipe sim!

Quero que o Paulo saiba  
Que mesmo não parecendo  
Adoro ouvir suas opiniões!  
Sou apenas lenta para entendê-las.  
Obrigada!

Quero que os IC's saibam  
Que agradeço a torcida  
E o apoio de vocês  
Mariana, Fê, Pedro e Giana,  
Obrigada!

Quero que o Cabral  
Também fique sabendo  
Que foi muito bom  
Trabalhar com ele  
Aprendi e ri muito!  
Obrigada por tudo!

Quero agradecer a todos do Departamento de Reprodução Animal-FMVZ/USP: alunos, docentes e funcionários. E não posso deixar de agradecer aos alunos de graduação da Faculdade de Medicina Veterinária da Pontifícia Universidade Católica de Poços de Caldas-MG: Juliana, João Paulo, João Rafael, Tiago e Ana Clara. Agradeço também à Fazenda Sertãozinho Ltda (Botelhos, MG) e ao Frigorífico Nossa Senhora da Saúde (Poços de Caldas, MG). Zulu e Ramiro, obrigada pela contribuição neste trabalho. Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, pelo apoio financeiro. Para todos vocês, o meu sincero agradecimento.

Flavia Regina Oliveira de Barros

**“Don’t worry about a thing  
’cause every little thing is gonna be all right”  
(Bob Marley)**

## RESUMO

DE BARROS, F. R. O. **Identificação de marcadores de pluripotência em células-tronco embrionárias e embriões suínos.** [Identification of pluripotency markers in swine embryonic stem cells and embryos]. 2008. 86 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

Células-tronco embrionárias (CTE) são importantes para estudos de desenvolvimento embrionário, diferenciação e manipulação genética. Além disso, essas células podem ser utilizadas na terapia celular e organogênese *in vitro*. Na pesquisa sobre terapia celular a partir de CTE oriundas de embriões humanos, considerações éticas, morais e religiosas têm sido feitas por pesquisadores e leigos. Portanto, um modelo animal como o suíno (*Sus scrofa*) será bastante válido por transpor tais barreiras, visto que o suíno possui parâmetros fisiológicos semelhantes aos humanos. Apesar do alto potencial biomédico das CTE, existem dificuldades na manutenção da pluripotência *in vitro* dessas células em suínos. Portanto, estudos que visam elucidar os mecanismos de manutenção da pluripotência de CTE *in vitro* são necessários para viabilizar o cultivo dessas células. Os objetivos do presente estudo foram (1) isolar células-tronco embrionárias suínas a partir de blastocistos produzidos *in vitro* e *in vivo*; (2) comparar dois sistemas de cultivo *in vitro* das massas celulares internas (MCI) isoladas, MEF ou Matrigel e (3) identificar e comparar a expressão dos fatores de transcrição Nanog, Sox2 e FoxD3 em CTE e blastocistos suínos produzidos *in vitro* e *in vivo*. Assim, blastocistos suínos foram produzidos *in vitro* a partir da maturação e fecundação *in vitro* de oócitos de ovários obtidos em matadouro. Os embriões foram cultivados *in vitro* por 7 dias, até atingirem o estágio de blastocisto. Blastocistos suínos também foram produzidos *in vivo*, através de superovulação seguida de inseminação artificial de marrãs com 150 dias de idade. Para a colheita dos embriões, foi realizada lavagem dos cornos uterinos *post-mortem* cinco dias após a ovulação. Tanto blastocistos produzidos *in vitro* quanto os produzidos *in vivo* foram submetidos à imunocirurgia para isolamento da MCI. Brevemente, a zona pelúcida foi digerida com solução de pronase e os embriões incubados com soro de coelho anti-suíno para remoção das células do trofoectoderma e soro complemento de cobaia. A MCI resultante foi cultivada em meio para células-tronco (GMEM acrescido de 15% SFB, 0,1 mM β-mercaptoetanol, 1% aminoácidos não essenciais e 4 ng/mL de bFGF) sobre monocamada de

fibroblastos fetais murinos (MEF) inativados por radiação ou sobre Matrigel. Não foi observada diferença entre os dois sistemas de cultivo *in vitro* (MEF e Matrigel) na adesão das MCI isoladas. Também não foi verificada diferença entre os grupos de blastocistos, produzidos *in vitro* e *in vivo*, nas taxas de adesão das MCI cultivadas. Contudo, nenhuma colônia de CTE suínas foi obtida. A análise da expressão gênica em blastocistos produzidos *in vitro* e *in vivo* demonstrou que os genes Nanog e Sox2 são menos expressos em blastocistos produzidos *in vitro*. Contudo, a expressão do gene FoxD3, demonstrada pela primeira vez em suínos no presente trabalho, se mostrou semelhante entre os dois grupos de embriões. Visto que nenhuma linhagem de CTE legítima foi isolada em suínos até o momento, sugere-se que esta espécie possua requerimentos diferentes dos já conhecidos para as espécies murina e humana. Portanto, novos estudos são necessários para o estabelecimento de protocolos mais efetivos para o isolamento de CTE de suínos.

Palavras-chave: Células-tronco embrionárias. Suínos. Nanog. Sox2. FoxD3.

## ABSTRACT

DE BARROS, F. R. O. **Identification of pluripotency markers in swine embryonic stem cells and embryos.** [Identificação de marcadores de pluripotência em células-tronco embrionárias e embriões suínos]. 2008. 86 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

Embryonic stem cells (ESC) represent a useful tool to study embryonic development, cell differentiation and genetic manipulation. Moreover, these cells can be applied in cell-based therapies and *in vitro* organogenesis. The research conducted with human ESC has generated many ethical, moral and religious considerations by scientists and laymen alike. Therefore, an animal model like the pig (*Sus scrofa*) is valuable by overcoming such hurdles, since this species holds physiologic parameters similar to humans. In spite of the high biomedical potential of ESC, many difficulties have been faced to maintain these cells in a pluripotent state *in vitro*. For this reason, studies to elucidate the mechanisms of *in vitro* maintenance of undifferentiated ESC are needed to improve the culture of these cells. The objectives of this study were (1) to isolate ESC from *in vitro* and *in vivo* produced swine blastocysts, (2) to compare two *in vitro* culture conditions to maintain isolated inner cell masses (ICM), MEF or Matrigel and (3) to identify and to compare the expression of the pluripotency markers Nanog, Sox2 and FoxD3 at ESC and *in vitro* and *in vivo* produced swine blastocysts. In this manner, swine blastocysts were obtained by *in vitro* maturation and fertilization of oocytes from ovaries collected in abattoirs. Embryos were *in vitro* cultured for 7 days until blastocyst stage. In addition, *in vivo* produced blastocysts were obtained by superovulation followed by artificial insemination of gilts (150 days of age). Embryos were collected by *post-mortem* uterus flushing five days after ovulation. *In vitro* and *in vivo* produced blastocysts were submitted to immunosurgery to isolate the ICM. Briefly, zona pellucida was digested with pronase solution and embryos were incubated with anti-swine rabbit serum to remove trophoectoderm cells and with guinea-pig complement serum. The resultant ICM was cultured in stem cells media (GMEM added by 15% SFB, 0.1 mM  $\beta$ -mercaptoethanol, 1% non essential amino acids and 4 ng/mL of bFGF) over monolayer of irradiated murine fetal fibroblasts (MEF) or Matrigel. No difference was observed between the *in vitro* culture conditions (MEF and Matrigel) on isolated ICM adhesion. In addition, no difference was verified between *in vitro* and *in vivo* produced blastocysts on adhesion

of cultured ICM. However, no swine ESC was obtained. Gene expression analysis of *in vitro* and *in vivo* produced blastocysts showed that Nanog and Sox2 are less expressed in *in vitro* produced blastocysts. However, the expression of FoxD3, demonstrated in this study for the first time, was similar between groups. Since no ESC lineage was obtained in swine until now, we believe this species have different requirements compared to murine and human. Therefore, more studies are necessary to establish protocols to isolate porcine ESC.

Key words: Embryonic stem cells. Swine. Nanog. Sox2. FoxD3.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Origem e classificação das CTE ao longo do desenvolvimento embrionário. Adaptado de Wobus; Boheler, 2005..... 27
- Figura 2 - Delineamento experimental seguido no cultivo *in vitro* de MCI isoladas de blastocistos produzidos *in vivo* ou *in vitro*. ..... 43
- Figura 3 - Blastocistos suínos produzidos *in vivo* durante procedimento de imunocirurgia..... 53
- Figura 4 - MCI 4 dias após imunocirurgia sobre monocamada de MEF..... 54
- Figura 5 - Verificação da expressão do marcador de pluripotência Nanog em blastocistos suínos produzidos *in vitro* e *in vivo* por PCR em tempo real ..... 55
- Figura 6 - Verificação da expressão do marcador de pluripotência Sox2 em blastocistos suínos produzidos *in vitro* e *in vivo* por PCR em tempo real ..... 56
- Figura 7 - Verificação da expressão do marcador de pluripotência FoxD3 em blastocistos suínos produzidos *in vitro* e *in vivo* por PCR em tempo real ..... 57
- Figura 8 - Comparação da expressão gênica dos marcadores de pluripotência Nanog, Sox2 e FoxD3 entre blastocistos suínos produzidos *in vivo* e *in vitro* ..... 58
- Figura 9 - Curvas de eficiência e dissociação do gene GAPDH em reação de PCR em tempo real com cDNA de CTE murinas de baixa concentração..... 74
- Figura 10 - Curvas de eficiência e dissociação do gene Sox2 em reação de PCR em tempo real com cDNA de CTE murinas de baixa concentração..... 75
- Figura 11 - Curvas de eficiência e dissociação do gene FoxD3 em reação de PCR em tempo real com cDNA de CTE murinas de baixa concentração..... 76



Figura 12 -	Curvas de eficiência e dissociação do gene GAPDH em reação de PCR em tempo real com cDNA de blastocistos suínos.....	77
Figura 13 -	Curvas de eficiência e dissociação do gene Nanog em reação de PCR em tempo real com cDNA de blastocistos suínos.....	78
Figura 14 -	Curvas de eficiência e dissociação do gene Sox2 em reação de PCR em tempo real com cDNA de blastocistos suínos.....	79
Figura 15 -	Curvas de eficiência e dissociação do gene FoxD3 em reação de PCR em tempo real com cDNA de blastocistos suínos.....	80
Figura 16 -	Gel de agarose 1% para verificação do tamanho dos fragmentos amplificados pela reação de PCR em tempo real .....	81

#### LISTA DE QUADRO

Quadro 1 -	<i>Primers</i> utilizados na verificação da expressão dos genes Nanog, Sox2, FoxD3 e GAPDH (controle endógeno) – São Paulo, 2008 ...	45
------------	--	----

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Dados das manipulações para PIV de embriões suínos, incluindo índices de clivagem e de formação de blastocistos – São Paulo, 2008. ....	48
Tabela 2 -	Colheitas de embriões suínos produzidos <i>in vivo</i> durante o mês de Janeiro de 2008 – São Paulo, 2008 .....	50
Tabela 3 -	Distribuição dos blastocistos suínos produzidos <i>in vivo</i> colhidos durante o mês de Janeiro de 2008 – São Paulo, 2008 .....	51
Tabela 4 -	Colheitas de embriões suínos produzidos <i>in vivo</i> durante os meses de Setembro, Outubro e Novembro de 2008 – São Paulo, 2008 .....	51
Tabela 5 -	Distribuição dos blastocistos suínos produzidos <i>in vivo</i> colhidos durante os meses de Setembro, Outubro e Novembro de 2008 – São Paulo, 2008.....	52
Tabela 6 -	Cultivo em MEF de MCI oriundas de blastocistos suínos submetidos à imunocirurgia – São Paulo, 2008 .....	54
Tabela 7 -	Cultivo em Matrigel de MCI oriundas de blastocistos suínos submetidos à imunocirurgia – São Paulo, 2008 .....	54
Tabela 8 -	Análise da expressão gênica de Nanog, Sox2 e FoxD3 em blastocistos suínos produzidos <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> . São Paulo, 2008.	59

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

bFGF	Fator de Crescimento de Fibroblasto Básico
BL	Blastocisto
CCOs	Complexo cumulus-oócito (pl.)
cDNA	Ácido desoxirribonucléico complementar
CGP	Células Germinativas Primordiais
CIV	Cultivo <i>in vitro</i>
ct	<i>Cycle Threshold</i>
CTE	Células-tronco embrionárias
CTE-like	Células semelhantes à CTE
DEPC	Dietilpirocarbonato
DMEM	<i>Dulbeco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
E	Eficiência da Reação de PCR em Tempo Real
eCG	Gonadotrofina Coriônica Eqüina
EGF	Fator de Crescimento Epidérmico
FIV	Fecundação <i>in vitro</i>
FSH	Hormônio Folículo Estimulante
GAPDH	Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
GMEM	<i>Glasgow Modified Eagle Media</i>
HbT	<i>Tyrode's Buffered Hepes</i>
LIF	Fator inibidor da leucemia
MCE	Massa Celular Externa
MCI	Massa Celular Interna
MEF	Fibroblastos Fetais Murinos
MIV	Maturação <i>in vitro</i>
NCSU23	<i>North Caroline State University media</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Solution</i>
PFF	Líquido Folicular Suíno
PUEC	Células Epiteliais de Útero Suíno

PVA	Álcool polivinílico
PVP	Polivinilpirrolidona
PZM3	<i>Porcine Zigote Media</i>
RNA	Ácido ribonucléico
SFB	Soro Fetal Bovino
STO	Linhagem imortal de fibroblastos embrionários murinos

## LISTA DE SÍMBOLOS

$\beta$	Beta
$\Delta$	Delta
$^{\circ}\text{C}$	Graus Celsius
+	Mais
®	Marca Registrada
<	Menor
$\mu$	Micro
%	Porcentagem

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>24</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>26</b>
2.1 ORIGEM E CLASSIFICAÇÃO DAS CÉLULAS-TRONCO.....	26
2.2 OBTENÇÃO E CULTIVO <i>IN VITRO</i> DE CTE .....	28
2.3 REGULAÇÃO DA PLURIPOTÊNCIA DE CTE .....	29
2.4 CTE E A ESPÉCIE SUÍNA .....	31
<b>3 HIPÓTESE E OBJETIVOS.....</b>	<b>34</b>
3.1 HIPÓTESE .....	34
3.2 OBJETIVOS .....	34
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>36</b>
4.1 PRODUÇÃO <i>IN VITRO</i> DE EMBRIÕES SUÍNOS.....	36
4.1.1 Colheita de Oócitos.....	36
4.1.2 Maturação <i>in vitro</i> dos oócitos.....	36
4.1.3 Fecundação <i>in vitro</i> .....	37
4.1.4 Cultivo <i>in vitro</i> .....	38
4.2 COLHEITA DE EMBRIÕES SUÍNOS PRODUZIDOS <i>IN VIVO</i> .....	38
4.2.1 Animais e protocolo hormonal.....	39
4.2.2 Abate e lavagem dos cornos uterinos .....	39
4.2.3 Recuperação e transporte dos embriões .....	40
4.3 CULTURA DE CTE SUÍNAS .....	40
4.3.1 Obtenção de fibroblastos fetais de camundongo (MEF) .....	41
4.3.2 Imunocirurgia .....	41
4.3.3 Derivação mecânica.....	42
4.3.4 Cultivo .....	43
4.4 CARACTERIZAÇÃO .....	44
4.4.1 Expressão gênica.....	44
4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	45
<b>5 RESULTADOS.....</b>	<b>48</b>

5.1 PRODUÇÃO <i>IN VITRO</i> DE EMBRIÕES SUÍNOS.....	48
5.2 COLHEITA DE EMBRIÕES SUÍNOS PRODUZIDOS <i>IN VIVO</i> .....	50
5.2.1 Colheitas realizadas em Janeiro de 2008 .....	50
5.2.2 Colheitas realizadas em Setembro, Outubro e Novembro de 2008 .....	51
5.3 CULTURA DE CTE SUÍNAS .....	52
5.3.1 Imunocirurgia .....	52
5.4 CARACTERIZAÇÃO .....	55
5.4.1 PCR em tempo real.....	55
<b>6 DISCUSSÃO .....</b>	<b>61</b>
<b>7 CONCLUSÕES .....</b>	<b>67</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>68</b>
<b>APÊNDICES .....</b>	<b>73</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>82</b>

## **INTRODUÇÃO**



## 1 INTRODUÇÃO

Células-tronco embrionárias (CTE) são células indiferenciadas pluripotentes que possuem a capacidade de formar diversos tipos celulares pertencentes aos três folhetos embrionários, além da linhagem germinativa. Por esse motivo, tais células são uma grande esperança na medicina regenerativa. As CTE também possuem a capacidade de auto-renovação, ou seja, de produzir duas células-tronco filhas idênticas quando ocorre a divisão celular, sem que ocorra a diferenciação celular.

Em 1981, foram cultivadas com sucesso células-tronco a partir da massa celular interna (MCI) de blastocistos de camundongos, daí denominadas CTE (EVANS; KAUFMAN, 1981). A partir de então, diversas tentativas de isolar CTE foram feitas em outras espécies mamíferas, como ovinos (HANDYSIDE et al., 1987; TSUSHIYA et al., 1994), leporinos (GILES et al., 1993; NIEMANN; STRELCHENKO, 1994), bovinos (CHERNY et al., 1994; STRELCHENKO; STICE, 1994), suínos (GERFEN; WHEELER, 1995; CHEN et al., 1999), primatas (THOMSON et al., 1995) e humanos (THOMSON et al., 1998). O estabelecimento de colônias de CTE de animais domésticos pode ser útil na criação de métodos de multiplicação de animais geneticamente superiores, produção de animais transgênicos, além de oferecer um valioso modelo de estudo da biologia do desenvolvimento e diferenciação celular (EVANS, 1989; PIEDRAHITA et al., 1998). Dentre os animais domésticos podemos destacar a espécie suína por seu grande valor como modelo animal, visto que apresenta semelhanças imunológicas e fisiológicas com a espécie humana (PHILLIPS; TUMBLESON, 1986).

Apesar do alto potencial biomédico das CTE, ainda existem dificuldades na manutenção da pluripotência *in vitro* dessas células em suínos. Sabe-se que o controle da diferenciação das CTE é feito por genes que medeiam mudanças morfológicas permanentes. Em busca de viabilizar a cultura de CTE suínas, o presente estudo teve como objetivos (1) isolar CTE suínas a partir de blastocistos produzidos *in vitro* e *in vivo*; (2) comparar dois sistemas de cultivo *in vitro* de MCI isoladas, MEF ou Matrigel e (3) identificar e comparar a expressão dos fatores de transcrição Nanog, Sox2 e FoxD3 em CTE e embriões produzidos *in vitro* e *in vivo* na espécie suína.



## 2 REVISÃO DE LITERATURA

Descobertas feitas nos últimos 30 anos nas áreas de biologia celular e biologia do desenvolvimento mudaram a maneira como entendemos o que é vida. A reprogramação de células somáticas após a transferência nuclear em oócitos enucleados (WILMUT et al., 1997), o isolamento e cultivo de CTE em camundongos (EVANS; KAUFMAN, 1981) e humanos (THOMSON et al., 1998); a criação de modelos genéticos em camundongos pela recombinação homóloga com CTE (THOMAS; CAPECCHI, 1987) e a demonstração da diferenciação *in vitro* de CTE em outros tipos celulares como: músculo, células nervosas, células germinativas (CHEN et al., 1999; WEST et al., 2006) abre novas portas para a medicina regenerativa, oferecendo uma possível fonte renovável de células (WOBUS; BOHELER, 2005).

### 2.1 ORIGEM E CLASSIFICAÇÃO DAS CÉLULAS-TRONCO

Após a formação do zigoto, o embrião sofre divisões mitóticas sucessivas formando células filhas idênticas (blastômeros) num processo conhecido como clivagem. Os blastômeros são considerados células totipotentes, visto que carregam o potencial de formar tanto o indivíduo propriamente dito quanto seus anexos fetais (DUDEK; FIX, 2004). Quando o embrião atinge o estágio de blastocisto, duas populações celulares podem ser distinguidas: a massa celular externa (MCE) e a interna. A MCE, também conhecida como trofoectoderma, dá origem aos anexos fetais, como a placenta. Na MCI encontram-se as CTE, que são consideradas pluripotentes, pois retém a capacidade de gerar células pertencentes aos três folhetos embrionários, o ectoderma, o mesoderma e o endoderma, assim como células as germinativas primordiais (CGP). Além disso, essas células conseguem se auto-renovar, ou seja, se proliferar sem que ocorra a diferenciação.

Com o desenvolvimento do embrião, algumas células passam a estar comprometidas com uma determinada linhagem celular, pertencente a um dos três folhetos embrionários ou à linhagem germinativa. Assim, tais células passam a ser reconhecidas como multipotentes, pois podem gerar qualquer tipo celular dentro do folheto embrionário ao qual está comprometida. O próximo passo do desenvolvimento celular é a formação das células progenitoras e por último as células do tecido adulto propriamente dito (DUDEK; FIX, 2004).

A figura 1 apresenta a origem e a classificação das células-tronco ao longo do desenvolvimento embrionário.

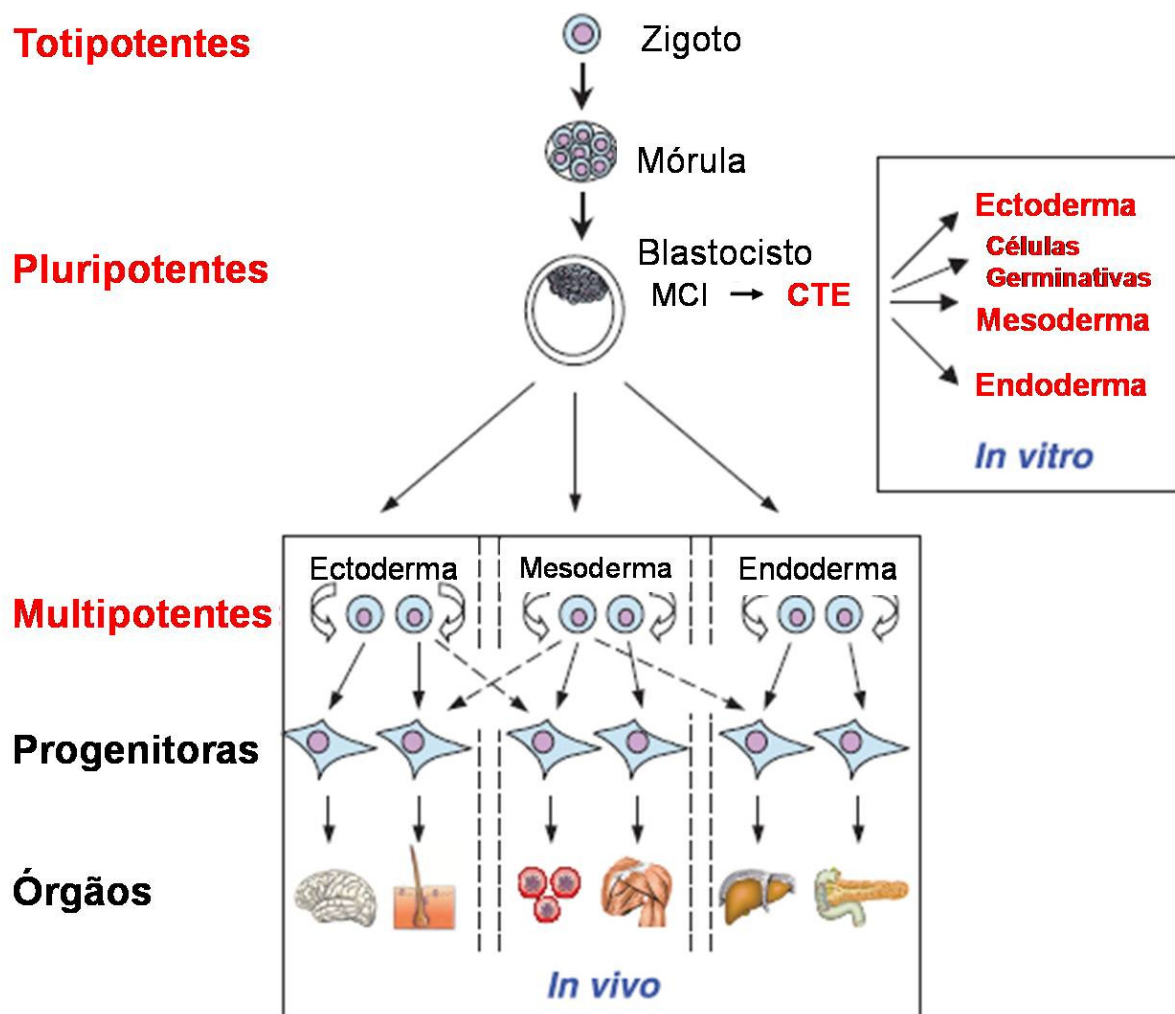


Figura 1 – Origem e classificação das CTE ao longo do desenvolvimento embrionário. Fonte: Adaptado de Wobus; Boheler, 2005.

## 2.2 OBTENÇÃO E CULTIVO *IN VITRO* DE CTE

Segundo Evans e Kaufman (1981), o sucesso na obtenção de culturas de CTE depende de três fatores: o estágio exato das células do embrião, a retirada de número suficiente de células e as condições de cultivo adequadas que conduzam mais à multiplicação do que à diferenciação.

Nas primeiras tentativas de isolamento de CTE suínas, embriões foram cultivados inteiros, ou seja, MCI e trofoectoderma (NOTARIANNI et al., 1990; STROJEK et al., 1990). Devido à dificuldade de separar morfológicamente células do trofoectoderma e células da MCI, pesquisadores desenvolveram técnicas para isolar a MCI, possibilitando uma cultura de CTE mais pura. Dentre elas, a imunocirurgia é a mais difundida (SOLTER; KNOWLES, 1975). Esta técnica consiste na remoção das células do trofoectoderma por duas reações de citotoxicidade. Blastocistos sem zona pelúcida são incubados com anti-soro e depois expostos à ação de complemento de coabaia. Esta técnica já foi utilizada com sucesso em suínos (PIEDRAHITA; ANDERSON; BONDURANT, 1990; LI et al., 2004a).

O co-cultivo com monocamadas celulares, geralmente fibroblastos mitoticamente inativados, é essencial tanto para o isolamento das CTE como sua manutenção *in vitro*. Sabe-se que as células do co-cultivo estimulam o crescimento das células da MCI, além de prevenir sua diferenciação (NICHOLS et al., 1990). Sabe-se que CTE humanas e murinas são mantidas indiferenciadas *in vitro* no co-cultivo com a linhagem imortal de fibroblastos embrionários murinos STO ou fibroblastos embrionários murinos inativados (MEF; EVANS; KAUFMAN, 1981; REUBINOFF et al., 2000). O MEF é obtido de fetos de camundongo (aproximadamente 14 dias de gestação) e são geralmente inativados mitoticamente com mitomicina-C ou irradiação. Kim et al. (2007) tentaram isolar CTE suínas a partir de embriões produzidos *in vitro* utilizando o co-cultivo com células STO, MEF e células epiteliais provenientes de útero suíno (do inglês *porcine uterine epithelial cells*, PUEC), todas inativadas com mitomicina-C. Não foi observada diferença na quantidade de MCI aderidas ou número de colônias semelhantes à CTE obtidas entre os grupos MEF e STO. Contudo, a adesão foi mais baixa no grupo cultivado em PUEC e nenhuma colônia de CTE foi obtida.

Já foi demonstrado, em humanos, que o cultivo sem o uso do co-cultivo é possível (ROSLER et al., 2004). 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 de moléculas de integrinas. Eles utilizaram o Matrigel como matriz extracelular e meio condicionado em MEF, indicando que outros fatores estão envolvidos na manutenção da pluripotência *in vitro* de CTE humanas.

Contudo, de todas as linhagens de CTE suínas que foram desenvolvidas até o momento, nenhuma atende todos os critérios requeridos para sua definição como CTE. Tal definição baseia-se no adotado em camundongos, como a formação de quimeras, teratomas, cariótipo estável, etc. Assim, sugere-se que tais linhagens sejam definidas como semelhantes a CTE (CTE-like; BREVINI et al., 2007).

## 2.3 REGULAÇÃO DA PLURIPOTÊNCIA DE CTE

Entender os mecanismos que controlam a pluripotência e capacidade de auto-renovação das CTE é fundamental para o controle da diferenciação *in vitro* dessas células e sua futura aplicação em terapias celulares. Sabe-se que o controle da diferenciação das CTE é feito por genes que geralmente são reguladores de transcrição, que ativam ou reprimem padrões de expressão gênica gerando a mudança fenotípica vista no processo de diferenciação das células-tronco (PESCE; SCHOLER, 2001). São muitos os fatores de transcrição que já foram identificados que estão envolvidos nessa regulação. Dentre os considerados principais, podemos destacar o Oct3/4, Nanog e Sox2.

O gene POU5f1 codifica o fator de transcrição Oct-3/4 que é restrito às células totipotentes e pluripotentes (SCHOLER et al., 1990). Em CTE, a expressão contínua de Oct-3/4 em níveis ótimos é necessária para manter a pluripotência. O aumento de até 50% da função deste fator de transcrição causa diferenciação no endoderma e no mesoderma primitivos, enquanto sua diminuição induz à formação de trofoectoderma concomitante com a perda da pluripotência (NIWA; MIYAZAKI; SMITH, 2000).

Há alguns anos, dois grupos identificaram o gene *Nanog* como outro importante fator na regulação da pluripotência (CHAMBERS et al., 2003; MITSUI et al., 2003). Sua expressão durante o desenvolvimento embrionário está restrita a populações de células pluripotentes, incluindo a MCI dos blastocistos e células germinativas primordiais (CHAMBERS et al., 2003; YAMAGUCHI et al., 2005). Alterações na expressão do gene *Nanog* em CTE causam a perda da pluripotência, que resulta na diferenciação em endoderma primitivo (MITSUI et al., 2003). Além disso, uma subsequência molecular (*motif*) de DNA reconhecida pela proteína *Nanog*, foi encontrada na região promotora de *Gata6*, um gene crítico na diferenciação endodérmica (MITSUI et al., 2003). Portanto, pode-se dizer que prevenir a diferenciação de CTE em endoderma primitivo é função primária do *Nanog*. Contudo, pouco se sabe sobre a via que regula essa função do *Nanog*.

Em camundongos, o Oct-3/4 atua em conjunto com outras proteínas como o *Sox2* (AVILION et al., 2003; TOMIOKA et al., 2002). Embora muitos estudos sustentem tal atuação conjunta, o modo como ela ocorre ainda não é conhecido. O fator de transcrição *Sox2* é expresso tanto em CTE como em células neuronais (TOMIOKA et al., 2002). Em estudo realizado por Takahashi e Yamanaka (2006), no qual foram produzidas células-tronco com pluripotência induzida por fatores de pluripotência, *Sox2* mostrou-se essencial ao lado de Oct3/4. Neste mesmo trabalho foi observado que a expressão desse gene diminui significativamente quando as células diferenciam-se.

Outro fator de transcrição, *FoxD3* é um membro da família *Forkhead Box* (*Fox*) e tem importante papel nas decisões sobre as linhagens celulares nos primeiros estágios embrionários, principalmente no desenvolvimento do endoderma com subsequente organogênese endodermal (HROMAS; COSTA, 1995; SUTTON et al., 1996). O gene *FoxD3* recebeu a princípio o nome de *Genesis* quando identificado pela primeira vez, baseado na sua expressão em camundongos estar restrita ao início do desenvolvimento embrionário. Tompers et al. (2005) demonstraram que a expressão de *FoxD3* não é somente necessária para a manutenção da MCI e conseqüente estabelecimento da cultura de CTE em camundongos, como também é essencial em linhagem extraembrionárias. A expressão de *FoxD3* também pode ser utilizada como marcador na identificação de linhagens de CTE humanas (SUTTON et al., 1996). Sabe-se que a expressão de *FoxD3* é inibida pela ação do ácido retinóico, conhecido como agente indutor de

diferenciação celular (PESCE; SCHOLER, 2001). FoxD3 tem sido relacionado ao controle da diferenciação de múltiplos sistemas. Um exemplo é a superexpressão de FoxD3 numa linhagem de células mielóides, que inibe a maturação correta dessas células em granulócitos (XU et al., 1998). Em trabalho realizado por Hanna et al. (2002), observou-se a necessidade de FoxD3 na manutenção de células pluripotentes nos períodos de implantação e peri-implantação na embriogênese de camundongos. Embora já se tenha observado a sua importância na manutenção da pluripotência de CTE humanas e murinas, não existem na literatura estudos desse marcador de pluripotência em suínos.

## 2.4 CTE E A ESPÉCIE SUÍNA

Em 1999 foram obtidas CTE-like a partir de embriões suínos nas seguintes fases embrionárias: blastocisto inicial, blastocisto intermediário e blastocisto expandido pré-implantação. Tais linhagens apresentaram-se morfologicamente estáveis e indiferenciadas (CHEN et al., 1999). Em trabalho realizado por Dyce et al. (2006) foi observado que células-tronco isoladas da pele de fetos suínos possuem capacidade intrínseca de se diferenciarem em células similares a oócitos.

O primeiro isolamento e caracterização de células-tronco de pele de fetos da espécie suína foram reportados em 2004. Nesse trabalho foi observada a expressão dos genes Stat3 e Oct4, conhecidos marcadores de pluripotência (DYCE et al., 2004). Carlin et al. (2006) isolaram células-tronco de cordão umbilical de suínos, realizando a identificação da expressão dos genes Oct4, Nanog e Sox2.

Assim, acredita-se que o conhecimento limitado da regulação da pluripotência e auto-renovação das CTE nessa espécie seja fator limitante no sucesso de obtenção de CTE suínas legítimas, capazes de serem mantidas indiferenciadas *in vitro*.

A produção *in vitro* de embriões é uma poderosa ferramenta biotecnológica, pois permite a produção de blastocistos, necessários para o isolamento das CTE. Contudo, embora a produção *in vitro* de embriões bovinos esteja muito bem estabelecida, suína esta técnica ainda enfrenta muitos obstáculos na espécie. Ainda,



poucos estudos tentaram o isolamento de CTE suínas a partir de embriões produzidos *in vitro* (MIYOSHI et al., 2000; LI et al., 2004b; KIM et al., 2007).

**HIPÓTESE E OBJETIVOS**

### 3 HIPÓTESE E OBJETIVOS

#### 3.1 HIPÓTESE

As células-tronco embrionárias cultivadas *in vitro* apresentam expressão dos genes Nanog, FoxD3 e Sox2 similares às observadas nas células da massa celular interna de blastocistos suínos produzidos *in vitro* e *in vivo*.

#### 3.2 OBJETIVOS

Os objetivos do presente estudo foram (1) isolar células-tronco embrionárias suínas a partir de blastocistos produzidos *in vitro* e *in vivo*; (2) comparar dois sistemas de cultivo *in vitro* das massas celulares internas isoladas, MEF ou Matrigel e (3) identificar e comparar a expressão dos fatores de transcrição Nanog, Sox2 e FoxD3 em CTE e embriões produzidos *in vitro* e *in vivo* na espécie suína.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES SUÍNOS

Embriões suínos foram produzidos *in vitro* e cultivados até o estágio de blastocisto, estágio que permite o isolamento da MCI contendo as CTE.

#### 4.1.1 Colheita de Oócitos

Ovários oriundos de abatedouro foram trazidos ao laboratório em recipiente contendo solução salina (cloreto de sódio 0,9%) à 37°C. Após lavagem com solução salina aquecida para remoção do sangue, os ovários foram fixados com pinça hemostática e os folículos (2-8 mm) incisados com bisturi, sendo todo o líquido folicular recolhido em becker contendo 35 mL de meio de lavagem de oócitos (HbT; Anexo A). Ao término das incisões de cada ovário, o mesmo foi mergulhado no becker e agitado gentilmente contra a parede do becker para melhor recuperação do conteúdo folicular. O conteúdo folicular foi transferido para um tubo de centrífuga de 50 mL, que permaneceu em banho-maria à 37°C por 15 min para sedimentação dos complexos cumulus-oócitos (CCOs).

#### 4.1.2 Maturação *in vitro* dos oócitos

O sedimento obtido do conteúdo folicular foi ressuspenso em meio HbT e transferido para placas de Petri de 100 mm. Esta recuperação dos CCOs foi feita com auxílio de micropipeta e estereomicroscópio (aumento 20 x). Os CCOs foram transferidos para placas de Petri de 35 mm contendo HbT, onde foram selecionados

quanto à homogeneidade do citoplasma e conformação das células do cumulus (mínimo três camadas de células do cúmulo compactas e completas). Após serem lavados três vezes em meio de maturação com hormônio (Anexo B), os CCOs foram transferidos para gotas de 90 µL deste meio, cobertas com óleo mineral (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, Missouri, EUA) em placas de Petri de 35 mm. Foram colocados em média 20 CCOs por gota. A placa de maturação permaneceu em estufa a 38,5°C; 5% de CO<sub>2</sub> em ar e alta umidade por 22 h. O meio de maturação com hormônio foi então substituído por meio de maturação sem hormônio (Anexo B) e a placa de maturação permaneceu por mais 22 h em estufa, completando 44 h de maturação.

#### 4.1.3 Fecundação *in vitro*

Os CCOs foram transferidos para um microtubo contendo 150 µL do meio de fecundação *in vitro* (FIV, Anexo C), onde as células do cumulus foram removidas mecanicamente por pipetagem. Os oócitos foram transferidos para placas de Petri de 35 mm contendo gotas 90 µL de meio FIV cobertas por óleo mineral (20 oócitos por gota). O sêmen para a FIV foi colhido 24 h antes pela técnica da mão enluvada e refrigerado a 15-18°C com diluidor Beltsville-TS (BTS, Minitube, Verona, Wisconsin, EUA). No momento da FIV, o sêmen foi separado do diluidor por centrifugação (7000 x g / 3 min) e 200 µL do sedimento purificados por gradiente de Percoll. Para isto, um microtubo foi preparado com 400 µL de Percoll 90% sob 400 µL de Percoll 45% (Anexo D). O sêmen com Percoll foi centrifugado a 7000 x g/ 4 min. Em seguida, 200 µL de sêmen foram lavados em 1 mL de meio FIV a 7000 x g/ 2 min e 100 µL do sedimento diluídos em 100 µL de meio FIV. Após esse procedimento, a motilidade e a concentração foram avaliadas e a diluição do sêmen corrigida para  $4 \times 10^5$  espermatozoides/mL. A fecundação foi feita com 5 µL da diluição final de sêmen para cada gota de 90 µL contendo os oócitos. A placa de fecundação permaneceu por 30 min a 38,5°C; 5% de CO<sub>2</sub> em ar e alta umidade. Os oócitos foram lavados em meio de fecundação para retirar o excesso de espermatozoides e

diminuir os índices de polispermia. Em uma nova placa de fecundação, os oócitos permaneceram em estufa por 5,5 h, completando 6 h de FIV.

#### 4.1.4 Cultivo *in vitro*

Ao término do período de fecundação *in vitro*, os zigotos foram lavados em meio de cultivo *Porcine Zygote Media* (PZM3; Anexo E) e transferidos para placas de Petri de 35 mm contendo gotas 90  $\mu$ L de meio PZM3 cobertas por óleo mineral (20 zigotos por gota). A placa de cultivo permaneceu a 38,5°C; 5% de CO<sub>2</sub> e 5% de O<sub>2</sub> (atmosfera controlada com baixa tensão de oxigênio) e alta umidade durante todo o desenvolvimento embrionário. Nos dias 2 e 5 após o início do cultivo *in vitro* (CIV), 45  $\mu$ L do meio PZM3 foram adicionados em cada gota para renovar o meio de cultivo (“*feeding*”). Os índices de clivagem foram avaliados no dia 2 do cultivo e os índices de blastocistos no dia 7. Os índices de clivagem foram dados pela razão entre o número de embriões clivados e o número de oócitos submetidos à FIV. Os índices de blastocistos foram calculados pela razão entre o número de embriões que atingiram o estágio de blastocisto e o número de embriões clivados.

## 4.2 COLHEITA DE EMBRIÕES SUÍNOS PRODUZIDOS *IN VIVO*

Para o isolamento da MCI de embriões suínos produzidos *in vivo*, fêmeas foram superovuladas e inseminadas, e os embriões colhidos 5 dias após a ovulação, quando atingiram o estágio de blastocisto.

#### 4.2.1 Animais e protocolo hormonal

Marrãs (n=47) provenientes do plantel da Fazenda Sertãozinho Ltda (Botelhos, MG), com aproximadamente 110 kg e 5 meses de idade foram superovuladas com 1000 UI IM de eCG (Folligon®, Intervet, Boxmeer, Holanda) e 5 mg IM de LH (LUTROPIN-V®, Bioniche, Belleville, Ontario, Canadá) 3 dias após o eCG (n=47) ou 750UI IM de hCG (CHORULON®, Intervet, Holanda) 4 dias após o eCG (n=6). Os animais foram inseminados 12 h após a administração do indutor de ovulação (hCG ou LH), quando da manifestação do comportamento de estro. O dia 0 (D0) foi considerado o dia da ovulação (aproximadamente 40 h após a administração do hCG ou LH).

#### 4.2.2 Abate e lavagem dos cornos uterinos

No D5, 133 (n=6) ou 120 (n=47) h após a ovulação, os animais foram abatidos no Frigorífico Nossa Senhora da Saúde (Poços de Caldas - MG). Antes da eletronarcolese, foram introduzidas pipetas de inseminação do tipo *Golden Pig* preenchidas com silicone na cérvix das marrãs para evitar a entrada de líquido no útero durante a escalda. O trato reprodutivo foi colhido e levado ao laboratório de Reprodução Animal da Pontifícia Universidade Católica (PUC) Poços de Caldas, em Minas Gerais, em sacos plásticos acondicionados em caixas de isopor.

Os cornos uterinos foram dissecados para evidenciar os ovidutos e separados um do outro por um corte no corpo do útero. Os ovários foram retirados e identificados para verificação da resposta superovulatória. Os cornos uterinos foram suspensos pela região caudal em um pedestal para o início da lavagem. Foram injetados 10 mL de PBS com 1% de soro fetal bovino (SFB - Nutricell, Campinas, São Paulo, Brasil) no infundíbulo com auxílio de sonda plástica. O conteúdo líquido do oviduto foi massageado em direção ao corno uterino e o oviduto retirado com um corte na junção útero-tubárica. Neste local e no acesso feito na região caudal do corno uterino foram injetados 20 mL de PBS com 1% de SFB. Duas pinças



hemostáticas atraumáticas foram colocadas na junção útero-tubárica de forma a deixar uma pequena saída para o escoamento do lavado uterino. Antes de escoar o lavado uterino, o corno foi movimentado verticalmente alternando suas extremidades (junção útero-tubárica e porção caudal) para completa lavagem do corno. O lavado uterino foi colhido em placas de Petri de 100 mm previamente marcadas e observado em estereomicroscópio para recuperação dos embriões.

#### 4.2.3 Recuperação e transporte dos embriões

Embriões que atingiram o estágio de blastocisto (eclodidos ou não) ou mórula foram selecionados em estereomicroscópio e lavados 3 vezes em meio TCM hepes (Nutricell) acrescido de 3 mg/mL de albumina sérica bovina (BSA, Sigma). Para o transporte dos embriões de Poços de Caldas para São Paulo (duração de 4 h), os embriões foram acondicionados em palhetas de sêmen de 0,5 mL com meio TCM hepes com BSA. As palhetas foram transportadas em recipiente térmico ( $\pm 37^{\circ}\text{C}$ ). Nas últimas quatro colheitas, os embriões foram acondicionados em microtubos de 650  $\mu\text{L}$  contendo TCM hepes com BSA.

### 4.3 CULTURA DE CTE SUÍNAS

Tanto blastocistos suínos produzidos *in vitro* quanto *in vivo* foram submetidos ao isolamento da MCI por imunocirurgia para obtenção de culturas de CTE. Além da comparação entre as duas origens de embriões para a obtenção de CTE suínas, foram testados dois sistemas de cultivo *in vitro*: co-cultivo com MEF e Matrigel.

#### 4.3.1 Obtenção de fibroblastos fetais de camundongo (MEF)

Os fibroblastos foram obtidos de fetos murinos com 15 dias de gestação, que foram decaptados e seus fragmentos de pele colocados em placas com meio de cultura DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium* – Gibco, Carlsbad, California, EUA) e 10% de SFB com 50 µg/mL de gentamicina (Sigma). As placas foram incubadas à 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> em ar e alta umidade. Quando os fibroblastos atingiram 90% de confluência, foi adicionada tripsina 0,05% em PBS (Gibco) para retirada das células aderidas às placas, que foram transferidas para uma nova placa. Cada vez que as células foram transferidas de uma placa para outra, diz-se que sofreram uma passagem. Após a terceira passagem, os fibroblastos foram congelados em DMEM com 20% de dimetilsulfóxido (DMSO) e 10% SFB. As células foram descongeladas e cultivadas em DMEM com 10% de SFB e 50 µg/mL de gentamicina e irradiadas com 4 krad (Césio 137; IBL-637, Oris Industrie) para inativação da proliferação (mitose) e novamente congeladas, sendo descongeladas somente no momento do uso.

#### 4.3.2 Imunocirurgia

Para a remoção das células do trofoectoderma foi realizada a imunocirurgia dos blastocistos suínos produzidos *in vitro* e *in vivo*. Os blastocistos foram lavados 3 vezes em meio TCM Hepes (Nutricell) acrescido de 10% SFB (Nutricell). Os blastocistos não eclodidos foram incubados em solução de pronase (8 mg/mL de TCM Hepes; Sigma) por 1 min sob supervisão em estereomicroscópio para digestão da zona pelúcida. Em seguida, os embriões foram lavados 6 vezes em TCM Hepes e 3 vezes em TCM Hepes com álcool polivinílico (PVA 1 mg/mL). Os embriões foram incubados com soro de coelho anti-suíno (1:5; Sigma) diluído em TCM Hepes a 38,5°C por 1 h. Após a incubação com o anticorpo, foram feitas 3 lavagens em TCM Hepes e os embriões incubados com soro complemento de cobaia (1:10; Sigma) por 1 h a 38,5°C. Ao término da segunda incubação, os embriões foram lavados

novamente em TCM HEPES com PVA e, em seguida, lavados e cultivados por 4 dias em meio GMEM-ES, constituído por GMEM (Glasgow Modified Eagle Media - Sigma), 0,1 mM  $\beta$ -mercaptoetanol (Sigma), 1% aminoácidos não essenciais (Gibco), 15% SFB (Hyclone, Logan, Utah, EUA) e 4 ng/mL fator de crescimento de fibroblasto básico (bFGF – Invitrogen, Carlsbad, California, EUA). O cultivo foi realizado em placas de quatro cavidades com 1,9 cm<sup>2</sup> de área (NUNC, Rochester, Nova Iorque, EUA) a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> e umidade em ar (2 embriões/poço). As placas foram previamente preparadas com camada de MEF inativado (8x10<sup>4</sup> células/poço) ou camada de Matrigel (BD, Bedford, Massachusetts, EUA). O Matrigel foi diluído em GMEM (1:30) antes de ser aplicado aos poços das placas. O Matrigel foi aplicado às placas refrigerado, pois quando aquecido torna-se gelatinoso.

#### 4.3.3 Derivação mecânica

Ao término de 4 dias de cultivo dos embriões submetidos à imunocirurgia, realizou-se a derivação mecânica. Com o auxílio de micropipetas e solução de colagenase (0,5 mg/mL em PBS sem Ca<sup>2+</sup> e Mg<sup>2+</sup>) a 37°C, as MCI dos embriões que aderiram à camada de MEF inativado ou ao Matrigel foram dissociadas e colocadas em poços de placas de 4 cavidades (um poço para cada embrião) com MEF inativado ou Matrigel e meio GMEM-ES.

#### 4.3.4 Cultivo

Para avaliar o efeito do sistema de cultivo (MEF ou Matrigel), seguiu-se o seguinte delineamento experimental (Figura 2):

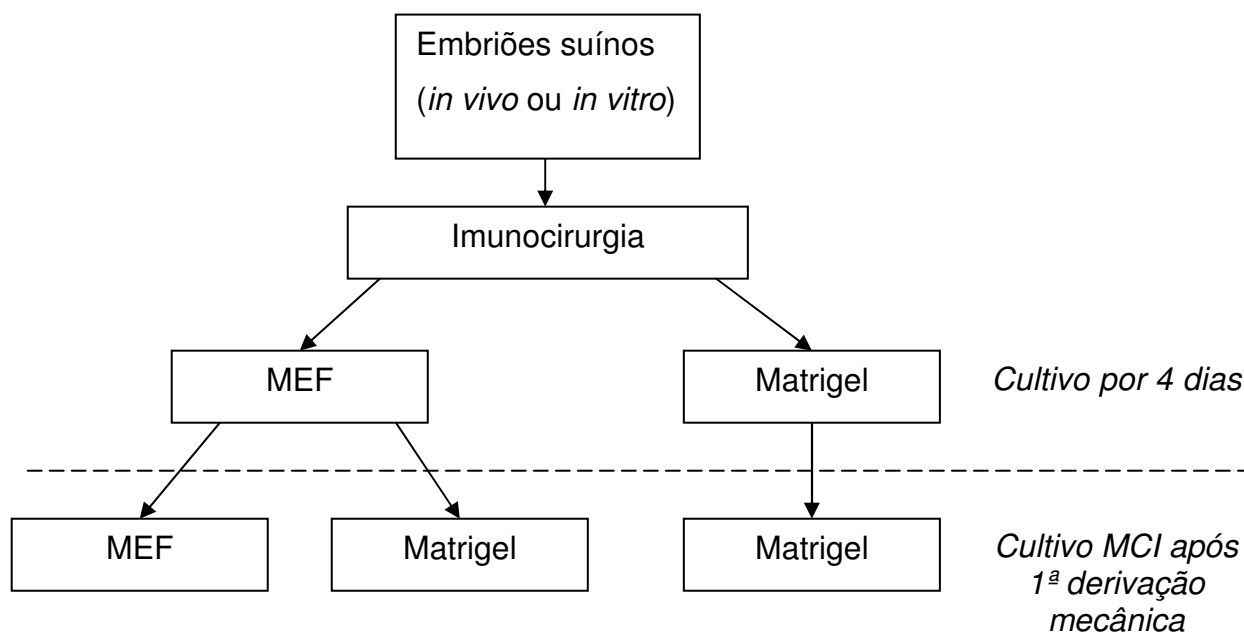


Figura 2 – Delineamento experimental seguido no cultivo *in vitro* de MCI isoladas de blastocistos produzidos *in vivo* ou *in vitro*.

Os embriões foram cultivados em MEF ou Matrigel após a imunocirurgia por 4 dias. Feita a derivação da MCI, o material cultivado em MEF foi dividido em dois grupos: MEF ou Matrigel, enquanto o material proveniente do Matrigel continuou em cultivo no Matrigel. Todo o cultivo foi realizado com meio GMEM-ES, a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> e alta umidade em ar. O meio foi renovado diariamente, sendo que as células cultivadas em Matrigel receberam 50% de meio GMEM-ES novo e 50% de meio GMEM-ES condicionado em MEF (obtido de placas de Petri de 35 mm contendo MEF) a cada renovação. Para a detecção de colônias, as placas foram avaliadas em microscópio diariamente.

## 4.4 CARACTERIZAÇÃO

Foi realizado PCR em tempo real para comparar a expressão de Nanog, Sox2 e FoxD3 entre embriões produzidos *in vitro* e *in vivo*.

### 4.4.1 Expressão gênica

O RNA total dos embriões produzidos *in vitro* (n=34; duas manipulações de FIV) e *in vivo* (n=30; uma colheita, 5 fêmeas) foi extraído com *Illustra RNAspin Mini RNA Isolation Kit* (GE Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido), seguindo as instruções do fabricante. O RNA total foi eluído da coluna com o volume de 50 µL de água tratada com dietilpirocarbonato (DEPC). Imediatamente após a extração, o cDNA foi sintetizado com *Superscript® VILO™ cDNA synthesis kit* (Invitrogen). A concentração de RNA total e cDNA foram verificadas por espectrofotometria (Nanodrop ND-1000, Nanodrop Technologies, Inc., Wilmington, Delaware, EUA).

As análises de PCR em tempo real foram realizadas no sistema de detecção ABI Prism® 7500, utilizando-se o *SYBR GreenER™ qPCR Supermix Universal* (Invitrogen) com 25 µL de volume total. Como controle endógeno foi utilizado o gene gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH). Os primers foram desenhados com o auxílio do software Primer3 (Quadro 1). Para todas as amplificações, foi utilizado um programa de 3 passos: 95 °C/ 15 seg, 55 °C/ 15 seg e 68 °C/ 20 seg por 45 ciclos, seguido da curva de dissociação. Como controle negativo da reação foi utilizado o mix da reação e os *primers*, sem adição do cDNA. As reações de PCR em tempo real foram padronizadas com cDNA obtido de CTE murinas (Apêndice A) e verificadas em blastocistos suínos para a determinação das curvas de eficiência (Apêndice B). O tamanho dos fragmentos amplificados por reação de PCR em tempo real foram verificados por eletroforese em gel de agarose 1% (Apêndice C).

Genes	Primers	Concentração (nM)
<b>Nanog</b>	F 5' – CTGAGGTTTATGGGCCTGAA – 3'	400
	R 5' – TGGGACCTTTTCCTCCTTCT – 3'	400
<b>Sox2</b>	F 5' – ACATGAATGGCTGGAGCAAC – 3'	400
	R 5' – GCGAGTAGGACATGCTGTAGG – 3'	200
<b>FoxD3</b>	F 5' – ATCTGCGAGTTCATCAGCAA – 3'	400
	R 5' – CCGTTGTGCGAACATGTCCTC – 3'	400
<b>GAPDH</b>	F 5' – TCGGAGTGAACGGATTTG – 3'	400
	R 5' – CCTGGAAGATGGTGTATGG – 3'	400

Quadro 1 - *Primers* utilizados na verificação da expressão dos genes Nanog, Sox2, FoxD3 e GAPDH (controle endógeno)

As razões de expressão dos genes alvo (Nanog, Sox2 e FoxD3) foram normalizadas pela razão da expressão do controle endógeno (GAPDH) de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{Razão da expressão normalizada} = \frac{E \text{ alvo}^{\Delta ct \text{ (vitro-vivo)}}}{E \text{ endógeno}^{\Delta ct \text{ (vitro-vivo)}}$$

Onde: E= eficiência média do PCR para cada par de *primers*; ct= ciclo em que cada curva de amplificação passa pelo *threshold*;  $\Delta ct$ = diferença entre o grupo testado (blastocistos produzidos *in vitro*) e grupo referência (blastocistos produzidos *in vivo*).

#### 4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a comparação dos dois sistemas de cultivo *in vitro* das MCI após imunocirurgia: MEF ou Matrigel para os dois grupos de embriões: produzidos *in vivo* e *in vitro*, foi empregado o teste qui-quadrado, com nível de significância de 5% com

o software *Statistica for Windows*. O teste exato de Fisher foi usado quando a frequência esperada foi menor ou igual a 5.

Para a comparação da expressão dos genes *Nanog*, *Sox2* e *FoxD3* entre embriões suínos produzidos *in vitro* e *in vivo* foi usado o teste não paramétrico de modo pareado fixo de realocação ao acaso (*Pair wise fixed reallocation randomisation test*) utilizando o “*Relative Expression Software Tool*” (REST; PFAFFL et al., 2002). O nível de significância adotado foi de 5%. Os dados foram apresentados em escala logarítmica.

**RESULTADOS**



## 5 RESULTADOS

Embriões suínos foram produzidos *in vitro* e *in vivo* com sucesso, embora os índices de produção tenham sido abaixo do esperado.

### 5.1 PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES SUÍNOS

Foram realizadas 48 manipulações para a PIV de embriões suínos. Estas manipulações totalizaram 4495 oócitos maturados e submetidos à FIV. Destes, 902 (20,07%) clivaram e 279 (30,93%) atingiram estágio de blastocisto. Os dados completos sobre as manipulações para PIV em suínos estão na tabela 1.

Tabela 1 - Dados das manipulações para PIV de embriões suínos, incluindo índices de clivagem e de formação de blastocistos – São Paulo – 2009  
(Continua)

Manipulação	Data da MIV	Oócitos Fecundados	Clivados	Índice de Clivagem (%)	Blastocistos	Índice de Blastocisto (%) sobre oócitos	Índice de Blastocisto (%) sobre clivados
1	12/03/07	125	0	0	0	0	0
2	26/03/07	115	0	0	0	0	0
3	17/04/07	81	9	11,11	0	0	0
4	23/04/07	86	41	47,67	31	36,05	75,6
5	07/05/07	148	37	25,00	7	4,73	18,91
6	15/05/07	113	67	59,29	33	29,20	49,25
7	21/05/07	54	32	59,26	7	12,96	21,86
8	12/06/07	101	6	5,94	1	0,99	16,67
9	10/07/07	20	9	45,00	0	0	0
10	16/07/07	93	0	0	0	0	0
11	25/07/07	80	0	0	0	0	0
12	28/08/07	107	8	7,48	0	0	0
13	03/09/07	119	não avaliado	não avaliado	6	5,04	
14	11/09/07	78	8	10,26	1	1,28	12,50
15	12/09/07	66	23	34,85	8	12,12	34,78

Tabela 1- Dados das manipulações para PIV de embriões suínos, incluindo índices de clivagem e de formação de blastocistos – São Paulo – 2009  
(Conclusão)

Manipulação	Data da MIV	Oócitos Fecundados	Clivados	Índice de Clivagem (%)	Blastocistos	Índice de Blastocisto (%) sobre oócitos	Índice de Blastocisto (%) sobre clivados
16	17/09/07	90	0	0	0	0	0
17	24/09/07	116	não avaliado	não avaliado	3	2,59	
18	15/10/07	88	0	0	0	0	0
19	16/10/07	151	43	28,48	8	5,30	18,60
20	22/10/07	162	5	3,09	0	0	0
21	30/10/07	80	5	6,25	0	0	0
22	19/11/07	48	4	8,33	0	0	0
23	26/11/07	65	0	0	0	0	0
24	03/12/07	74	6	8,11	1	1,35	16,67
25	11/12/07	56	28	50,00	5	8,93	17,86
26	12/12/07	60	0	0	0	0	0
27	08/01/08	114	19	16,67	4	3,51	21,05
28	09/01/08	47	9	19,15	0	0	0
29	19/02/2008	99	33	33,33	5	5,05	15,15
30	25/02/2008	73	30	41,10	17	23,29	56,67
31	03/03/2008	90	36	40,00	1	1,11	2,78
32	17/03/2008	111	62	55,86	28	25,23	45,16
		18	6	33,33	3	16,67	50,00
33	18/03/2008	99	29	29,29	6	6,06	20,69
34	24/03/2008	67	7	10,45	0	0,00	0,00
		13	2	15,38	0	0,00	0,00
35	05/05/2008	93	13	13,98	0	0,00	0,00
36	12/05/2008	130	0	0,00	0	0,00	0,00
37	19/05/2008	71	13	18,31	2	2,82	15,38
38	26/05/2008	94	26	27,66	5	5,32	19,23
39	09/06/2008	100	27	27,00	3	3,00	11,11
40	16/06/2008	137	32	23,36	5	3,65	15,63
41	17/06/2008	112	40	35,71	17	15,18	42,50
42	14/07/2008	84	19	22,62	8	9,52	42,11
43	21/07/2008	140	41	29,29	17	12,14	41,46
44	28/07/2008	76	25	32,89	15	19,74	60,00
45	29/07/2008	87	19	21,84	9	10,34	47,37
46	06/08/2008	120	47	39,17	17	14,17	36,17
47	11/08/2008	70	36	51,43	6	8,57	16,67
48	22/09/2008	74	0	0,00	0	0,00	0,00
<b>Total</b>		<b>4495</b>	<b>902</b>	<b>20,07</b>	<b>279</b>	<b>6,21</b>	<b>30,93</b>

Parte dos blastocistos obtidos foi utilizada também em outro estudo, realizado por Goissis (2008).

## 5.2 COLHEITA DE EMBRIÕES SUÍNOS PRODUZIDOS *IN VIVO*

Foram realizadas colheitas de embriões suínos em dois períodos: Janeiro de 2008 (8 colheitas) e Setembro a Novembro de 2008 (4 colheitas).

### 5.2.1 Colheitas realizadas em Janeiro de 2008

Num total de 8 colheitas, 246 blastocistos viáveis foram recuperados. O resumo das colheitas encontra-se na tabela 2. Destes, 239 sobreviveram ao transporte e foram distribuídos de acordo com a tabela 3.

Tabela 2 - Colheitas de embriões suínos produzidos *in vivo* durante o mês de Janeiro de 2008 – São Paulo – 2008

Estágio Embrionário	Colheita								Total
	1	2	3	4	5	6	7	8	
Não fecundados		55	5	1					61
Mórula Compacta				3				5	8
BL Inicial				1	4				5
BL	1			1		18		15	35
BL Expandido				8	6	1		49	64
BL Expandido Retraído			17	2		15		10	44
BL Eclodido Inicial			4						4
BL Eclodido Tardio	16		40	4	30	4			94
Degenerados	14		45	87	20		84	92	342
<b>Total por coleta</b>	<b>31</b>	<b>55</b>	<b>111</b>	<b>107</b>	<b>60</b>	<b>38</b>	<b>84</b>	<b>171</b>	<b>657</b>

onde: BL= blastocisto

Tabela 3 - Distribuição dos blastocistos suínos produzidos *in vivo* colhidos durante o mês de Janeiro de 2008 – São Paulo – 2008

	Coleta								Total
	1	2	3	4	5	6	7	8	
Imunocirurgia e cultivo	5		10	12	6	8		12	53
PCR em tempo real	6		31		21	19		45	122
Imunocitoquímica	5		12	5	10	10		22	64
<b>Total por coleta</b>	<b>16</b>		<b>53</b>	<b>17</b>	<b>37</b>	<b>37</b>		<b>79</b>	<b>239</b>

Assim como os embriões produzidos *in vitro*, uma parte dos blastocistos foi utilizada em outro estudo, realizado por Goissis (2008). Os embriões destinados à imunocitoquímica estão armazenados em solução de polivinilpirrolidona (PVP) em PBS para futura análise.

#### 5.2.2 Colheitas realizadas em Setembro, Outubro e Novembro de 2008

De um total de 4 colheitas, foram recuperados 76 blastocistos (Tabela 4). Os blastocistos foram distribuídos de acordo com a tabela 5.

Tabela 4 - Colheitas de embriões suínos produzidos *in vivo* durante os meses de Setembro, Outubro e Novembro de 2008 – São Paulo – 2008

Estágio Embrionário	Colheita				Total
	1	2	3	4	
Não fecundados		6	5	33	44
Mórula Compacta		1			1
BL Inicial	1				1
BL	3		1	3	7
BL Expandido	4				4
BL Expandido Retraído	39	6	2	13	60
BL Eclodido Inicial		4			4
BL Eclodido Tardio					
Degenerados		4	9	11	24
<b>Total por coleta</b>	<b>47</b>	<b>21</b>	<b>17</b>	<b>60</b>	<b>145</b>

onde: BL= blastocisto

Tabela 5 - Distribuição dos blastocistos suínos produzidos *in vivo* coletados durante os meses de Setembro, Outubro e Novembro de 2008 – São Paulo – 2008

	Colheita				Total
	1	2	3	4	
Imunocirurgia e cultivo	17		3	5	25
PCR em tempo real	30			11	41
Imunocitoquímica		10			10
<b>Total por coleta</b>	<b>47</b>	<b>10</b>	<b>3</b>	<b>16</b>	<b>76</b>

Os embriões destinados à imunocitoquímica estão armazenados em solução de PVP em PBS para futura análise.

### 5.3 CULTURA DE CTE SUÍNAS

#### 5.3.1 Imunocirurgia

A avaliação morfológica sob estereomicroscopia sugere que a imunocirurgia não removeu completamente o trofoectoderma dos blastocistos (Figura 3). Nas imagens D e E da figura 3 é possível observar que mesmo após o término da imunocirurgia, ainda foi possível visualizar o trofoectoderma dos blastocistos.

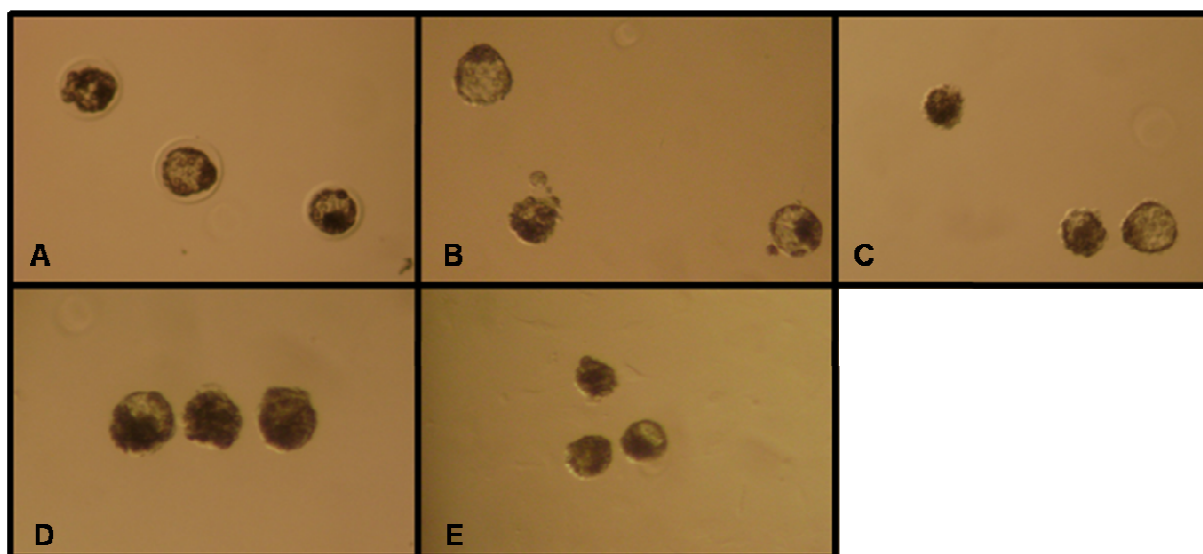


Figura 3 – Blastocistos suínos produzidos *in vivo* durante procedimento de imunocirurgia (A-E; aumento de 40 x - A, B, C e E; aumento de 60 x - D). Blastocistos com zona pelúcida (A); blastocistos após digestão da zona pelúcida com solução de pronase (B); blastocistos após incubação com soro anti-suíno por 1 h (C); blastocistos após incubação com complemento de cobra por 1 h (D) e blastocistos cultivados sobre monocamada de MEF, dia 0 do cultivo (E)

Na tabela 6 estão apresentados os resultados de MCI isoladas de embriões suínos produzidos *in vivo* e *in vitro* por imunocirurgia cultivadas em MEF, enquanto na tabela 7 estão os resultados do cultivo realizado em Matrigel. De 10 MCI provenientes de embriões produzidos *in vitro* que foram cultivadas em MEF, somente 3 aderiram à monocamada de células murinas, enquanto nenhuma MCI interna aderiu ao Matrigel das 4 cultivadas. Quanto às MCI oriundas de embriões produzidos *in vivo*, 27 das 50 cultivadas em MEF aderiram, enquanto somente 3 de 16 aderiram ao Matrigel. Contudo, não houve diferença entre os sistemas de cultivo MEF e Matrigel na aderência das MCI. Também não houve diferença entre os dois grupos de embriões: *in vitro* e *in vivo* ( $p > 0,05$ ).

As MCI que aderiram ao MEF foram subcultivadas em MEF ou Matrigel após a 1ª derivação (Tabela 6). As MCI que aderiram ao Matrigel foram subcultivadas em Matrigel (Tabela 7). Nenhuma colônia foi obtida em ambos os sistemas de cultivo.

Tabela 6 - Cultivo em MEF de MCI oriundas de blastocistos suínos submetidos à imunocirurgia – São Paulo – 2008

Sistema de Produção dos Embriões	Número de MCI cultivadas		Número de colônias após 1 <sup>a</sup> derivação	
	Total	Aderidas	MEF	Matrigel
<i>In vitro</i>	10	3	0	0
<i>In vivo</i>	50	27	0	0

Tabela 7 - Cultivo em Matrigel de MCI oriundas de blastocistos suínos submetidos à imunocirurgia – São Paulo – 2008

Sistema de Produção dos Embriões	Número de MCI cultivadas		Número de colônias
	Total	Aderidas	Matrigel
<i>In vitro</i>	4	0	0
<i>In vivo</i>	16	3	0

A Figura 4 ilustra MCI aderidas ao MEF quatro dias após a imunocirurgia de 3 blastocistos suínos produzidos *in vivo*.

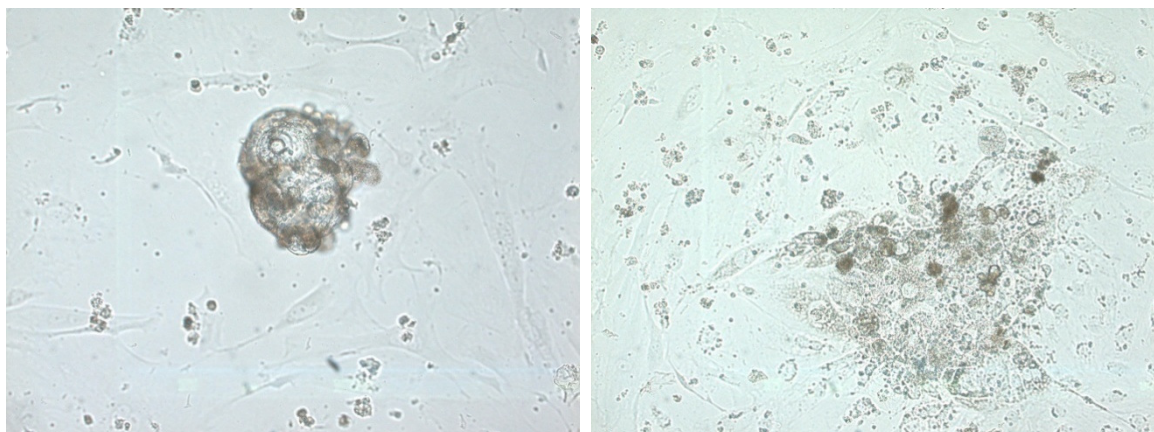


Figura 4 – MCI 4 dias após imunocirurgia sobre monocamada de MEF. (A) MCI não aderida; (B) MCI aderida. Aumento de 200 x.

## 5.4 CARACTERIZAÇÃO

### 5.4.1 PCR em tempo real

Foi identificada a expressão dos genes Nanog, Sox2 e FoxD3 nos blastocistos suínos produzidos *in vitro* e *in vivo* (Figuras 5-7).

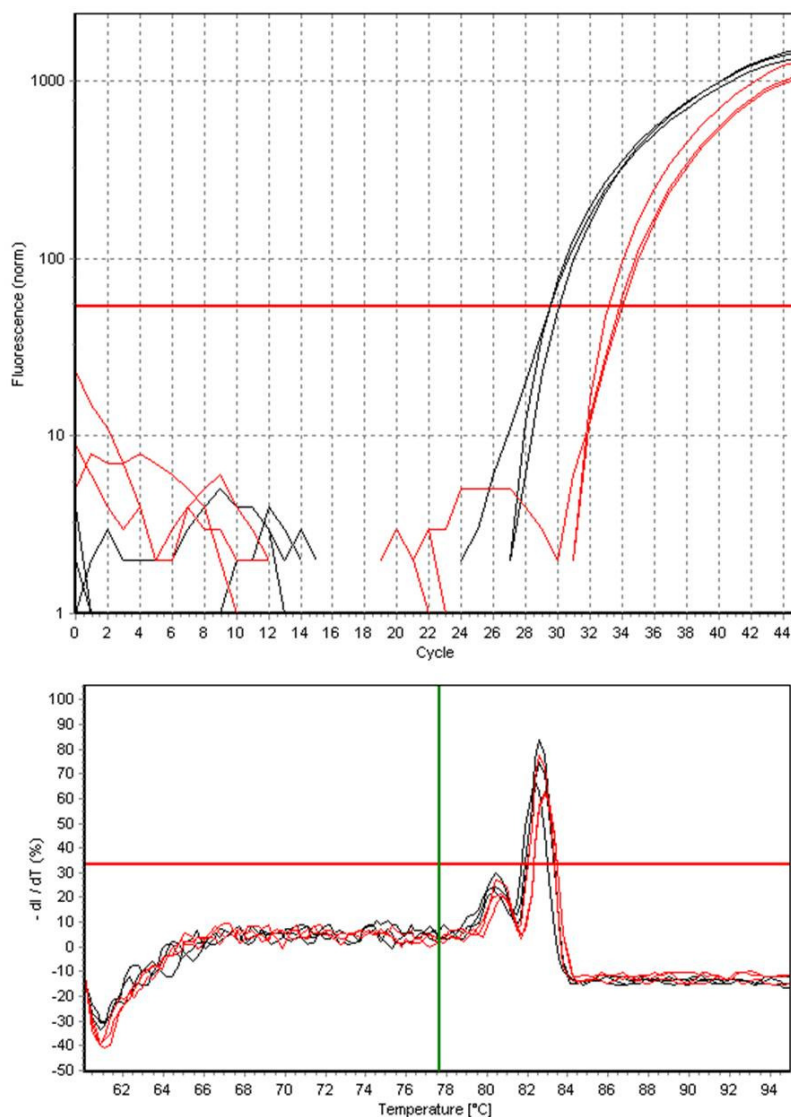


Figura 5 – Verificação da expressão e curva de dissociação do marcador de pluripotência Nanog em blastocistos suínos produzidos *in vitro* (vermelho) e *in vivo* (preto) por PCR em tempo real.



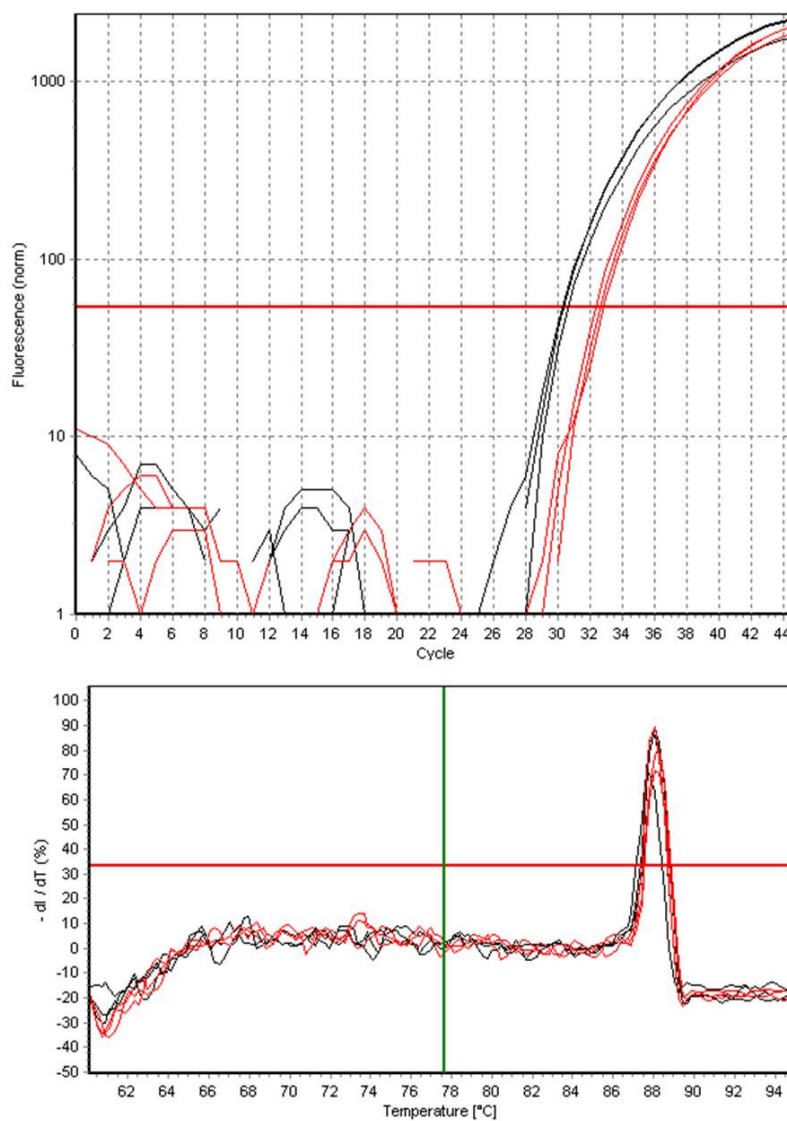


Figura 6 – Verificação da expressão e curva de dissociação do marcador de pluripotência Sox2 em blastocistos suínos produzidos *in vitro* (vermelho) e *in vivo* (preto) por PCR em tempo real.

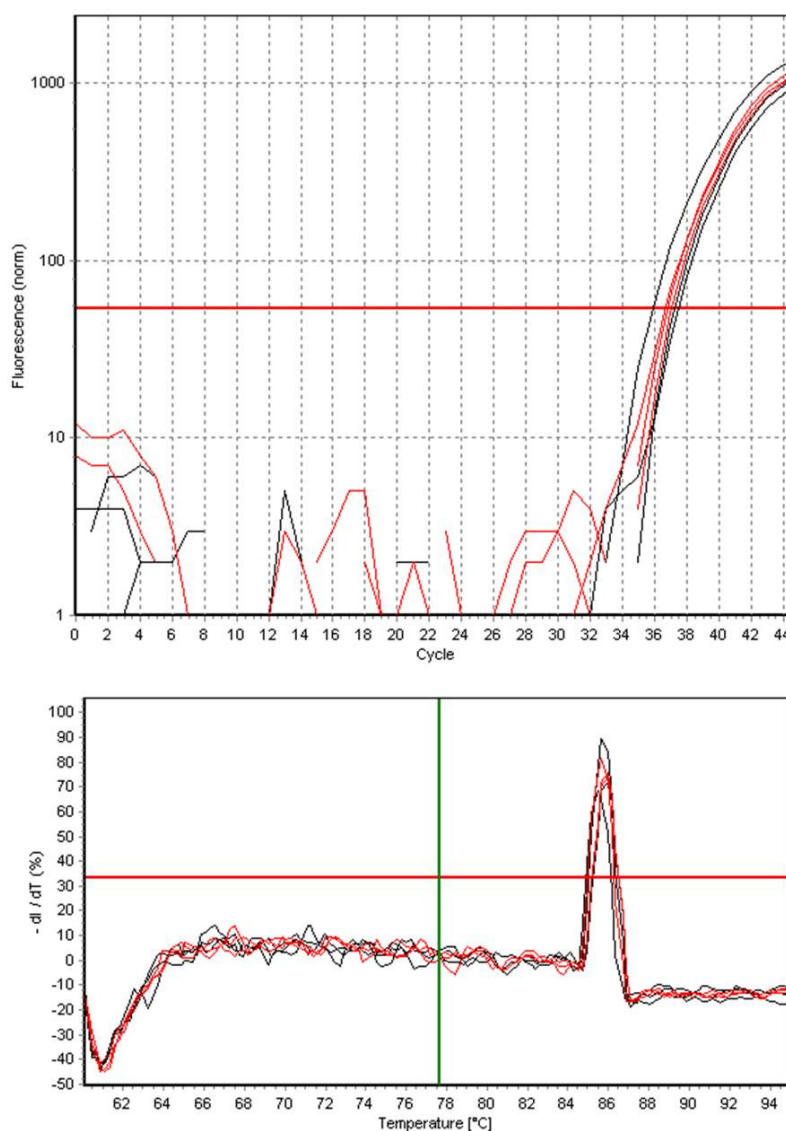


Figura 7 – Verificação da expressão e curva de dissociação do marcador de pluripotência FoxD3 em blastocistos suínos produzidos *in vitro* (vermelho) e *in vivo* (preto) por PCR em tempo real.

A figura 8 mostra a expressão de Nanog, Sox2 e FoxD3 nos blastocistos produzidos *in vitro* em relação à expressão observada nos blastocistos produzidos *in vivo*. A comparação da expressão desses genes revelou que não houve diferença no padrão de expressão do gene FoxD3 entre os grupos testados. Contudo, observou-se que blastocistos produzidos *in vitro* apresentaram uma menor expressão dos genes Nanog e Sox2 em relação aos blastocistos produzidos *in vivo* ( $p < 0,05$ ; Tabela 8).

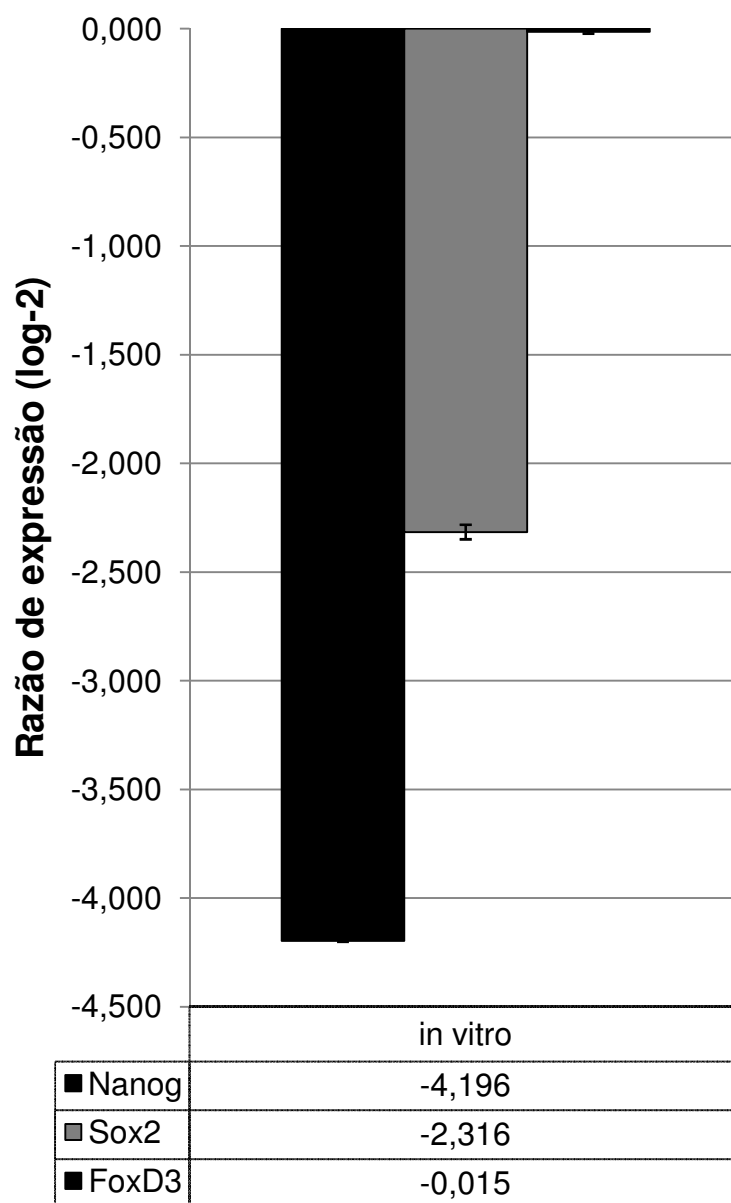


Figura 8 – Expressão dos genes Nanog, Sox2 e FoxD3 em blastocistos suínos produzidos *in vitro* em relação aos embriões produzidos *in vivo*. A razão da expressão gênica é dada em escala logarítmica.

Na tabela 8 estão apresentados os dados da análise da expressão gênica de Nanog, Sox2 e FoxD3 em blastocistos produzidos *in vivo* e *in vitro*.

Tabela 8 - Análise da expressão gênica de Nanog, Sox2 e FoxD3 em blastocistos suínos produzidos *in vitro* e *in vivo* – São Paulo – 2008

	GAPDH	Nanog	Sox2	FoxD3
Eficiência PCR	2,10	2,07	2,06	1,91
Médias <i>In vitro</i> (ct)	30,05	29,72	30,46	36,90
Médias <i>In vivo</i> (ct)	30,02	33,68	32,64	36,87
Valor de P		0,001	0,027	0,966

onde: ct= ciclo em que cada curva de amplificação passa pelo *threshold*.

**DISCUSSÃO**

## 6 DISCUSSÃO

Embora linhagens de já CTE-like tenham sido isoladas a partir de embriões pré-implantação em suínos (SHIM et al., 1997; CHEN et al., 1999; LI et al., 2003), poucos resultados foram obtidos com embriões produzidos *in vitro* até o momento. Miyoshi et al. (2000) isolaram CTE-like de embriões suínos produzidos *in vitro* após o cultivo dos embriões intactos, ou seja, que não foram submetidos ao isolamento da MCI. Li et al. (2004b) também cultivaram embriões suínos produzidos *in vitro* intactos. A linhagem obtida foi descrita como CTE-like, que se apresentou positiva para fosfatase alcalina, que é comumente expressa em células pluripotentes. Contudo, até momento não foram obtidas CTE suínas que apresentem todos os requisitos necessários para serem caracterizadas como CTE legítimas. O presente trabalho buscou o estabelecimento de uma linhagem de CTE a partir de embriões suínos produzidos *in vitro* e *in vivo*. Para tal, embriões em estágio de blastocisto foram submetidos à remoção do trofoectoderma por imunocirurgia. A MCI resultante foi cultivada sobre monocamada de MEF ou Matrigel. Embora tenha sido observada a adesão da MCI nos dois sistemas de cultivo, nenhuma colônia de CTE foi obtida após as derivações. Assim, a hipótese que CTE cultivadas *in vitro* apresentam expressão dos genes Nanog, FoxD3 e Sox2 similares às observadas nas células da MCI não pôde ser testada.

Contudo, foi possível comparar os dois sistemas de cultivo *in vitro* das MCI isoladas, MEF e Matrigel, quanto à adesão dessas MCI. Os dois sistemas mostraram-se eficientes em suportar o cultivo dessas MCI até a primeira derivação, realizada 4 dias após o início do cultivo. Mesmo assim, não foi possível comparar a eficiência dos dois sistemas de cultivo na obtenção de colônias de CTE suínas, visto que nenhuma colônia foi obtida.

A capacidade da linhagem de MEF e da monocamada de Matrigel utilizados neste estudo em servir de co-cultivo para CTE foi anteriormente averiguada por Goissis (2008). Através do cultivo de CTE murinas da linhagem USP1<sup>1</sup>, Goissis verificou que os dois sistemas são capazes de suportar o cultivo *in vitro* de CTE.

---

<sup>1</sup> CTE murinas da linhagem USP1 foram gentilmente cedidas pela Dra. Irina Kerkis, pesquisadora do Instituto Butantan de São Paulo

Durante o procedimento de imunocirurgia, observou-se que a MCI resultante tornou-se mais enegrecida. Muitas vezes o embrião se desfez durante a incubação com o complemento de covaia. Contudo, é difícil supor que a imunocirurgia possa ter causado algum dano nos blastocistos, visto que os anticorpos usados nesta técnica são amplamente utilizados em coloração diferencial de embriões suínos (MACHATY; DAY; PRATHER; 1998). Além disso, em algumas manipulações, foi difícil distinguir apenas com o uso do estereomicroscópio onde estava a MCI do embrião. Segundo Li et al. (2003), a difícil visualização da MCI de embriões suínos produzidos *in vitro* dificulta o seu isolamento, levando à baixas taxas de sucesso. Li et al. (2003) propuseram um novo método para isolar MCI de embriões suínos produzidos *in vivo* que utiliza uma digestão enzimática com solução de 0,25% de tripsina e 0,04% de EDTA. Seus resultados demonstraram que tal procedimento foi mais eficiente que cultivar embriões intactos, ou seja, que só tiveram a zona pelúcida removida. Li et al. (2004b) isolaram CTE-like de embriões suínos produzidos *in vitro* apenas cultivando blastocistos sem zona pelúcida pois, segundo esses autores, a imunocirurgia não é a técnica mais adequada para embriões suínos produzidos *in vitro* devido ao baixo número de células presentes na MCI destes blastocistos.

Diante do exposto sobre técnicas já utilizadas para isolar CTE de suínos, é possível verificar que nenhuma delas até o momento foi considerada totalmente efetiva, visto que somente células semelhantes à CTE foram obtidas. Além disso, o espaço amostral da maioria dos trabalhos é extremamente variável, deixando mais dúvidas sobre o quanto estamos perto de obter tais células na espécie suína. Enquanto Li et al. (2004b) cultivaram 12 blastocistos produzidos *in vitro* intactos (sem zona pelúcida), dos quais 9 aderiram no MEF e 2 colônias primárias de CTE-like foram obtidas; Kim et al. (2007) submeteram 127 blastocistos produzidos *in vitro* à imunocirurgia, obtendo 87 MCI aderidas e 32 colônias primárias de CTE-like. Miyoshi et al. (2000) cultivaram 32 blastocistos suínos produzidos *in vitro* intactos (sem zona pelúcida) e obtiveram 24 MCI aderidas e 9 colônias de CTE-like. Tal variação somente ressalta a elevada inconstância dos resultados da produção *in vitro* de embriões na espécie suína. Tal inconstância também foi observada no presente trabalho. Além disso, o mesmo quadro é observado nas tentativas de isolamento de CTE suínas a partir de embriões colhidos *in vivo*. Li et al. (2004a) obtiveram 19 colônias de CTE-like derivadas de 25 MCI aderidas, isoladas de um

total de 40 blastocistos suínos produzidos *in vivo*. Chen et al. (1999) isolaram MCI de 196 embriões produzidos *in vivo* em diferentes estágios pré-implantação. Obtiveram 129 MCI aderidas, 94 culturas primárias e 12 linhagens de CTE-like. Assim, cabe dizer que uma padronização do procedimento de imunocirurgia e das demais técnicas de isolamento da MCI de embriões suínos ainda é necessária para resultados mais efetivos.

Segundo Notarianni et al. (1991), uma possível explicação do porque ainda não se obtiveram linhagens de CTE suínas, se deve ao extenso período de pré-implantação, caracterizado por uma elongação pronunciada do blastocisto e quiescência simultânea da MCI. Chen et al. (1999) realizaram experimentos para verificar qual estágio pré-implantacional de embriões produzidos *in vivo* é o mais adequado para o isolamento de CTE suínas. Os embriões foram cultivados intactos ou foram submetidos à imunocirurgia para isolamento da MCI. Como co-cultivo foram utilizadas células STO. Concluíram que blastocistos recém eclodidos, colhidos 7-8 dias após inseminação, oferecem os melhores resultados.

O presente estudo também objetivou comparar a expressão gênica dos marcadores de pluripotência Nanog, Sox2 e FoxD3 nos dois grupos de embriões: produzidos *in vivo* e *in vitro*, com a finalidade de verificar se existe diferença no padrão de expressão entre os dois grupos. Foi observado que blastocistos suínos produzidos *in vivo* apresentam maior expressão de Nanog do que blastocistos obtidos por FIV. Tal observação colabora com o reportado por Kumar et al. (2007) e Magnani et al. (2008). O presente estudo também demonstrou uma menor expressão do gene Sox2 em embriões produzidos *in vitro* quando comparados com embriões produzidos *in vivo*. Essa diferença já havia sido reportada por Magnani et al. (2008). Contudo, vale ressaltar que o gene endógeno (GAPDH) utilizado para normalizar as análises da expressão gênica no presente estudo é diferente dos utilizados anteriormente, assim como as condições *in vitro* de produção de embriões.

Segundo estudo realizado por Kuijk et al. (2007), onde diversos genes endógenos foram comparados para realização da análise de expressão gênica de embriões suínos, o GAPDH é um excelente controle endógeno. Kumar et al. (2007) utilizaram o gene da histona H2a como gene endógeno enquanto Magnani et al. (2008), por sua vez, usou o gene YWHAG. Kuijk et al. (2007) desencorajou o uso da histona H2a como controle, por apresentar expressão variável ao longo do desenvolvimento embrionário, não oferecendo, assim, um bom controle endógeno.



Sabe-se que embriões produzidos *in vitro* possuem menor competência de desenvolvimento do que embriões produzidos *in vivo*. Assim, as condições de cultivo *in vitro* são essenciais para uma melhor competência de desenvolvimento embrionário. O meio NCSU23 (*North Caroline State University media*) é o mais comumente utilizado na produção *in vitro* de embriões suínos. Apesar de não ser tão eficiente quanto às condições fisiológicas, este meio oferece altos índices de blastocistos. Ultimamente o meio de cultivo de embriões suínos PZM3 tem sido muito utilizado. Ele é baseado em elementos inorgânicos e substratos energéticos do fluido do oviduto de suínos suplementado com aminoácidos, podendo ser uma alternativa para o desenvolvimento de embriões até o estágio de blastocisto (YOSHIOKA et al., 2002). Kumar et al. (2007) utilizou o meio NCSU23. O cultivo *in vitro* de embriões no presente estudo foi feito com o meio PZM3, assim como em Magnani et al. (2008). Portanto, pode-se dizer que foi observada uma menor expressão dos genes Nanog em blastocistos produzidos *in vitro* independente do meio de cultivo utilizado.

O presente estudo demonstrou a expressão do gene FoxD3 em embriões suínos. Ainda, foi observado que a expressão desse gene não diferiu entre os dois grupos de blastocistos. A autora do presente trabalho desconhece estudos na literatura que tenham demonstrado a amplificação do gene FoxD3 por PCR em tempo real em embriões suínos. Hanna et al. (2002) demonstraram que a expressão deste gene é necessária para a manutenção de CTE murinas *in vitro*. No mesmo trabalho, os autores observaram que células da MCI que não expressam FoxD3 param de se proliferar quando cultivadas *in vitro*, sugerindo que a ausência da expressão deste gene cause a morte dessas células *in vitro*. Liu et al. (2008) sugerem que FoxD3 esteja envolvido na sobrevivência e auto-renovação de CTE murinas, reprimindo a diferenciação celular. Embora já se tenha observado a sua importância na manutenção da pluripotência de CTE humanas e murinas, não existem na literatura estudos desse marcador de pluripotência em suínos. Sendo assim, mais estudos são necessários para entendermos o papel do FoxD3 na regulação da pluripotência de CTE embrionárias suínas.

Embora dados interessantes tenham sido obtidos no presente trabalho, no que diz respeito à expressão dos marcadores de pluripotência Nanog, Sox2 e FoxD3 em embriões suínos produzidos *in vivo* e *in vitro*; um estudo sobre a localização desses fatores nesses embriões, por reação de imunofluorescência, será de grande

interesse para complementar esses dados. Ainda, um seqüenciamento do fragmento amplificado por reação de PCR em tempo real correspondente ao gene FoxD3 será interessante para verificar a identidade deste fragmento com a espécie suína.

**CONCLUSÕES**

## 7 CONCLUSÕES

Embora não tenha sido possível testar a hipótese que CTE suínas apresentam o mesmo padrão de expressão dos genes Nanog, Sox2 e FoxD3 de MCI de embriões produzidos *in vivo* e *in vitro*, foi possível verificar a expressão desses três marcadores de pluripotência em embriões suínos de duas origens diferentes.

Ainda, foi possível observar que blastocistos suínos produzidos *in vivo* possuem uma maior expressão dos genes Nanog e Sox2. Visto que tais fatores de transcrição são atualmente considerados indispensáveis para a manutenção da pluripotência de CTE *in vitro*, é possível supor que a primeira colônia de CTE suínas legítima venha a ser obtida de embriões produzidos *in vivo*.

O presente trabalho demonstrou pela primeira vez, a expressão do gene FoxD3 em blastocistos suínos. Curiosamente, a expressão deste marcador de pluripotência, consagrado nas espécies murina e humana, foi semelhante nos dois grupos de blastocistos. Contudo, pouco se sabe sobre o seu papel na regulação da pluripotência de CTE suínas.

Dessa forma, mais estudos são necessários para estabelecer protocolos eficazes para o isolamento de CTE suínas, assim como esclarecer o papel dos fatores de transcrição Nanog, Sox2 e FoxD3 na regulação da pluripotência de CTE suínas.

## REFERÊNCIAS

- AVILION, A. A.; NICOLIS, S. K.; PEVNY, L. H.; PEREZ, L.; VIVIAN, N.; LOVELL-BADGE, R. Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. **Genes Dev**, v. 17, p. 126–140, 2003.
- 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.
- CARLIN, R.; DAVIS, D.; WEISS, M.; SCHULTZ, B.; TROYER, D. Expression of early transcription factors Oct-4, Sox-2 and Nanog by porcine umbilical cord (PUC) matrix cells. **Reprod Biol Endocrinol**, v. 4, n. 8, 2006.
- 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, n. 2, p. 195-212, 1999.
- CHERNY, R. A.; STOKES, T. M.; MEREI, J.; LOM, L.; BRANDON, M. R.; WILLIAMS, R. L. Strategies for the isolation and characterization of bovine embryonic stem cells. **Reprod Fertil Dev**, v. 6, p. 569-575, 1994.
- DUDEK, R.; FIX, J. **Board review series embryology**. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2004. 287 f.
- DYCE, P. W.; WEN, L.; LI, J. *In vitro* germline potential of stem cells derived from fetal porcine skin. **Nat Cell Biol**, v. 8, n. 4, p. 384-390, 2006.
- DYCE, P. W.; ZHU, H.; CRAIG, J.; LI, J. Stem cells with multilineage potential derived from porcine skin. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 316, p. 651-658, 2004.
- EVANS, M. J. Potential for genetic manipulation of mammals. **Mol Biol Med**, v. 6, n. 6, p. 557-565, 1989.
- EVANS, M. J.; KAUFMAN, M. H. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. **Nature**, v. 292, p. 154-156, 1981.
- GERFEN, R. W.; WHEELER, M. B. Isolation of embryonic cell-lines from porcine blastocysts. **Anim Biotechnol**, v. 6, n. 1, p. 1-14, 1995.
- GILES, J. R.; YANG, X.; MARK, W.; FOOTE, R. H. Pluripotency of cultured rabbit inner cell mass cells detected by isozyme analysis and eye pigmentation of fetuses following injection into blastocysts or morulae. **Mol Reprod Dev**, v. 36, n. 2, p. 130-138, 1993.

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.** 2008. 68 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

HANDYSIDE, A.; HOOPER, M. L.; KAUFMAN, M. H.; WILMUT, I. Towards the isolation of embryonal stem cell lines from the sheep. **Dev Genes Evol**, v. 196, n. 3, p. 185-190, 1987.

HANNA, L. A.; FOREMAN, R. K.; TARASENKO, I. A.; KESSLER, D. S.; LABOSKY, P. A. Requirement for *Foxd3* in maintaining pluripotent cells of the early mouse embryo. **Genes Dev**, v. 16, n. 20, p. 2650-2661, 2002.

HROMAS, R.; COSTA, R. The hepatocyte nuclear factor-3/forkhead transcription regulatory family in development, inflammation, and neoplasia. **Crit Rev Oncol Hematol**, v. 20, p. 129-140, 1995.

KIM, H. S.; SON, H. Y.; KIM, S.; LEE, G. S.; PARK, C. H.; KANG, S. K.; LEE, B. C.; HWANG, W. S.; LEE, C. K. Isolation and initial culture of porcine inner cell masses derived from *in vitro*-produced blastocysts. **Zygote**, v. 15, n. 1, p. 55-63, 2007.

KUIJK E. W.; DU PUY, L.; VAN TOL, H. T.; HAAGSMAN, H. P.; COLENBRANDER, B.; ROELEN, B. A. Validation of reference genes for quantitative RT-PCR studies in porcine oocytes and preimplantation embryos. **BMC Dev Biol**, v. 31, n. 7, p. 58, 2007.

KUMAR, B. M.; JIN, H. F.; KIM, J. G.; OCK, S. A.; HONG, Y.; BALASUBRAMANIAN, S.; CHOE, S. Y.; RHO, G. J. Differential gene expression patterns in porcine nuclear transfer embryos reconstructed with fetal fibroblasts and mesenchymal stem cells. **Dev Dyn**, v. 236, n. 2, p. 435-446, 2007.

LI, M.; ZHANG, D.; HOU, Y.; JIAO, L.; ZHENG, X.; WANG, W. H. Isolation and culture of embryonic stem cells from porcine blastocysts. **Mol Reprod Dev**, v. 65, n. 4, p. 429-434, 2003.

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 **J of Reprod Dev**, 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, n. 1, p. 43-48, 2004b.

LIU, Y.; LABOSKY, P. A. Regulation of embryonic stem cell self-renewal and pluripotency by *Foxd3*. **Stem Cells**, v. 26, n. 10, p. 2475-2484, 2008.

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

MAGNANI, L.; CABOT, R. A. *In vitro* and *in vivo* derived porcine embryos possess similar, but not identical, patterns of Oct4, Nanog, and Sox2 mRNA expression during cleavage development. **Mol Reprod Dev**, v.75, p. 1726-1735, 2008.

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. **EMBO**, v. 18, p. 4261-4269, 1999.

MITSUI, K.; TOKUZAWA, Y.; ITOH, H.; SEGAWA, K.; MURAKAMI, M.; TAKAHASHI, K.; MARUYAMA, M.; MAEDA, M.; YAMANAKA, S. The homeoprotein nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. **Cell**, v. 113, p. 631-642, 2003.

MIYOSHI, K.; TAGUCHI, Y.; SENDAI, Y.; HOSHI, H.; SATO, E. Establishment of a porcine cell line from *in vitro*-produced blastocysts and transfer of the cells into enucleated oocytes. **Biol Reprod**, v. 62, n. 6, p. 1640-1646, 2000.

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.

NIEMANN, H.; STRELCHENKO, N. Isolation and maintenance of rabbit embryonic stem (ES) cell like cells **Theriogenology**, v. 41, n. 1, p. 265, 1994.

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

NOTARIANNI, E.; GALLI, C.; LAURIE, S.; MOOR, R. M.; EVANS, M. J. Derivation of pluripotent, embryonic cell lines from the pig and sheep. **J Reprod Fertil**, v. 43, p. 255-260, 1990.

NOTARIANNI, E.; LAURIE, S.; MOOR, R. M.; EVANS, M. J. Maintenance and differentiation in culture of pluripotent embryonic cell lines from pig blastocysts **J Reprod Fertil**, v. 41, p. 51-56, 1990.

PESCE, M.; SCHOLER, H. R. Oct-4: Gatekeeper in the Beginnings of Mammalian Development. **Stem cells**, v. 19, p. 271-278, 2001.

PFAFFL, M. W.; HORGAN, G. W.; DEMPFLER, L. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. **Nucleic Acids Res**, v. 30, n. 9, e. 36, 2002

PHILLIPS, R. W.; TUMBLESON, M. E. **Models in 'swine in biomedical research'**, New York: Plenum Press, 1986, p. 437-440.

PIEDRAHITA, J. A.; ANDERSON, G. B.; BONDURANT, R. H. Influence of feeder layer type on the efficiency of isolation of porcine embryo-derived cell lines. **Theriogenology**, v. 34, p. 865-877, 1990.

- PIEDRAHITA, J. A.; MOORE, K.; OETAMA, B.; LEE, C. K.; SCALES, N.; RAMSOONDAR, J.; BAZER, F. W.; OTT, T. Generation of transgenic porcine chimeras using primordial germ cell-derived colonies. **Biol Reprod**, v. 58, n. 5, p. 1321-1329, 1998.
- REUBINOFF, B. E.; PERA, M. F.; FONG, C. Y.; TROUNSON, A.; BONGSO, A. Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation *in vitro*. **Nat Biotechnol**, v. 18, p. 399-404, 2000.
- ROSLER, E. S.; FISK, G. J.; ARES, X.; IRVING, J.; MIURA, T.; RAO, M. S.; CARPENTER, M. K. Long-term culture of human embryonic stem cells in feeder-free conditions. **Dev Dyn**, v. 229, n. 2, p. 259-274, 2004.
- 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. **EMBO**, v. 9, p. 2185-2195, 1990.
- SHIM, H.; GUTIÉRREZ-ADÁN, A.; CHEN, L. R.; BONDURANT, R. H.; BEHBOODI, E.; ANDERSON, G.B. Isolation of pluripotent stem cells from cultured porcine primordial germ cells. **Biol Reprod**, v. 57, n. 5, p. 1089-1095, 1997.
- SMITH, A. G.; HEATH, J. K.; DONALDSON, D. D.; WONG, G. G.; MOREAU, J.; STAHL, M.; ROGERS, D. Inhibition of pluripotential stem cell differentiation by purified polypeptides. **Nature**, v. 336, p. 688-690, 1988.
- SOLTER, D.; KNOWLES, B. B. Immunosurgery of mouse blastocyst. **PNAS**, v. 72, n. 12, p. 5099-5102, 1975.
- STRELCHENKO, N.; STICE, S. Bovine embryonic pluripotent cell lines derived from morula stage embryos. **Theriogenology**, v. 41, n. 1, p. 304, 1994.
- STROJEK, R. M.; REED, M. A.; HOOVER, J. L.; WAGNER, T. E. A method for cultivating morphologically undifferentiated embryonic stem cells from porcine blastocysts. **Theriogenology**, v. 33, p. 901-913, 1990.
- SUTTON, J.; COSTA, R.; KLUG, M.; FIELD, L.; XU, D.; LARGAESPADA, D.; FLETCHER, C.; JENKINS, N.; COPELAND, N.; KLEMSZ, M.; HROMAS, R. *Genesis*, a winged helix transcriptional repressor with expression restricted to embryonic stem cells. **J Biol Chem**, v. 271, p. 23126-23133, 1996.
- TAKAHASHI, K.; YAMANAKA, S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. **Cell**, v. 126, n. 4, p. 663-676, 2006.
- THOMAS, K. R.; CAPECCHI, M. R. Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. **Cell**, v. 51, p. 503-512, 1987.
- THOMSON, J. A.; ITSKOVITZ-ELDOR, J.; SHAPIRO, S. S.; WAKNITZ, M. A.; SWIERGIEL, J. J.; MARSHALL, V. S.; JONES, J. M. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. **Science**, v. 282, n. 5391, p. 1145-1147, 1998.



THOMSON, J. A.; KALISHMAN, J.; GOLOS, T. G.; DURNING, M.; HARRIS, C. P.; BECKER, R. A.; HEARN, J. P. Isolation of a primate embryonic stem cell line. **PNAS**, v. 92, n. 17, p. 7844–7848, 1995.

TOMIOKA, M.; NISHIMOTO, M.; MIYAGI, S.; KATAYANAGI, T.; FUKUI, N.; NIWA, H.; MURAMATSU, M.; OKUDA, A. Identification of Sox-2 regulatory region which is under the control of Oct-3/4-Sox-2 complex. **Nucleic Acids Res**, v. 30, p. 3202–3213, 2002.

TOMPERS, D. M.; FOREMAN, R. K.; WANG, Q.; KUMANOVA, M.; LABOSKY, P. A. Foxd3 is required in the trophoblast progenitor cell lineage of the mouse embryo. **Dev Biol**, v. 285, n. 1, p. 126-137, 2005.

TSUCHIYA, T.; RAASCH, G. A.; BRANDES, T. L.; MIZOSHITA, K.; YOUNGS, C. R. Isolation of ICM-derived cell colonies from sheep blastocysts. **Theriogenology**, v. 41, p. 321, 1994.

WEST, J. A.; PARK, I. H.; DALEY, G. Q.; GEIJSEN, N. *In vitro* generation of germ cells from murine embryonic stem cells. **Nat Protoc**, v. 1, n. 4, p. 2026-2036, 2006.

WILMUT, I.; SCHNIEKE, A. E.; MCWHIR, J.; KIND, A. J.; CAMPBELL, K. H. S. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. **Nature**, v. 385, p. 810-813, 1997.

WOBUS, A. M.; BOHELER, K. R. Embryonic stem cells: prospects for developmental biology and cell therapy. **Physiol Rev**, v. 85, p. 635-678, 2005.

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

XU, D.; YODER, M.; SUTTON, J.; HROMAS, R. Forced expression of *Genesis*, a winged helix transcriptional repressor isolated from embryonic stem cells, blocks granulocytic differentiation of 32D myeloid cells. **Leukemia**, v. 12, p. 207-212, 1998.

YAMAGUCHI, S.; KIMURA, H.; TADA, M.; NAKATSUJI, N.; TADA, T. Nanog 530 expression in mouse germ cell development. **Gene Expr Patterns**, v. 5, p. 639-646, 2005.

YOSHIOKA, K.; SUZUKI, C.; TANAKA, A.; ANAS, I. M.; IWAMURA, S. Birth of piglets derived from porcine zygotes cultured in a chemically defined medium. **Biol Reprod**, v. 66, n. 1, p. 112-119, 2002.

## APÊNDICES

### APÊNDICE A – PADRONIZAÇÃO DAS REAÇÕES DE PCR EM TEMPO REAL

As reações de PCR em tempo real foram padronizadas com cDNA obtido de CTE murinas, linhagem USP1 e validadas com cDNA de blastocistos suínos. Foram feitos testes de concentração de *primers* e curvas de eficiência para os genes FoxD3, Sox2 e GAPDH. As reações para o gene Nanog não puderam ser padronizadas com CTE murinas, pois a homologia entre as duas espécies para este gene é insuficiente. Ou seja, os *primers* para o Nanog não amplificam este fragmento de cDNA na espécie murina.

O RNA total foi extraído com *Illustra RNAspin Mini RNA Isolation Kit* (GE), seguindo as instruções do fabricante. O RNA total foi eluído com o volume de 40 µL de água tratada com DEPC para obtenção de uma solução mais concentrada de RNA total. Imediatamente após a extração, o cDNA foi sintetizado com *Superscript® VILO™ cDNA synthesis kit* (Invitrogen). A concentração de RNA total e cDNA foram verificadas por espectrofotometria (Nanodrop ND-1000, Nanodrop Technologies, Inc., Wilmington, Delaware, EUA). A concentração de cDNA de CTE murinas foi de aproximadamente 2128,2 ng/µL. Assim, para mimetizar a reação com a baixa concentração de cDNA dos blastocistos, o cDNA de CTE murinas foi diluído em água tratada com DEPC (cDNA de CTE murinas de baixa concentração).

Para a confecção das curvas de eficiência, o cDNA de CTE murinas de baixa concentração foi submetido a diluições seriadas, em base 2, gerando 5 diluições. A curva de eficiência foi gerada, então, com 5 pontos de diluição em triplicata, utilizando o sistema de detecção ABI Prism® 7500, com *SYBR GreenER™ qPCR Supermix Universal* (Invitrogen), 25 µL de volume total. Foi utilizado um programa de 3 passos: 95 °C/ 15 seg, 55 °C/ 15 seg e 68 °C/ 20 seg por 40 ou 45 ciclos, seguido da curva de dissociação.

As figuras 9-11 mostram as curvas de eficiência dos genes GAPDH, Sox2 e FoxD3 com cDNA de CTE murinas de baixa concentração, respectivamente.

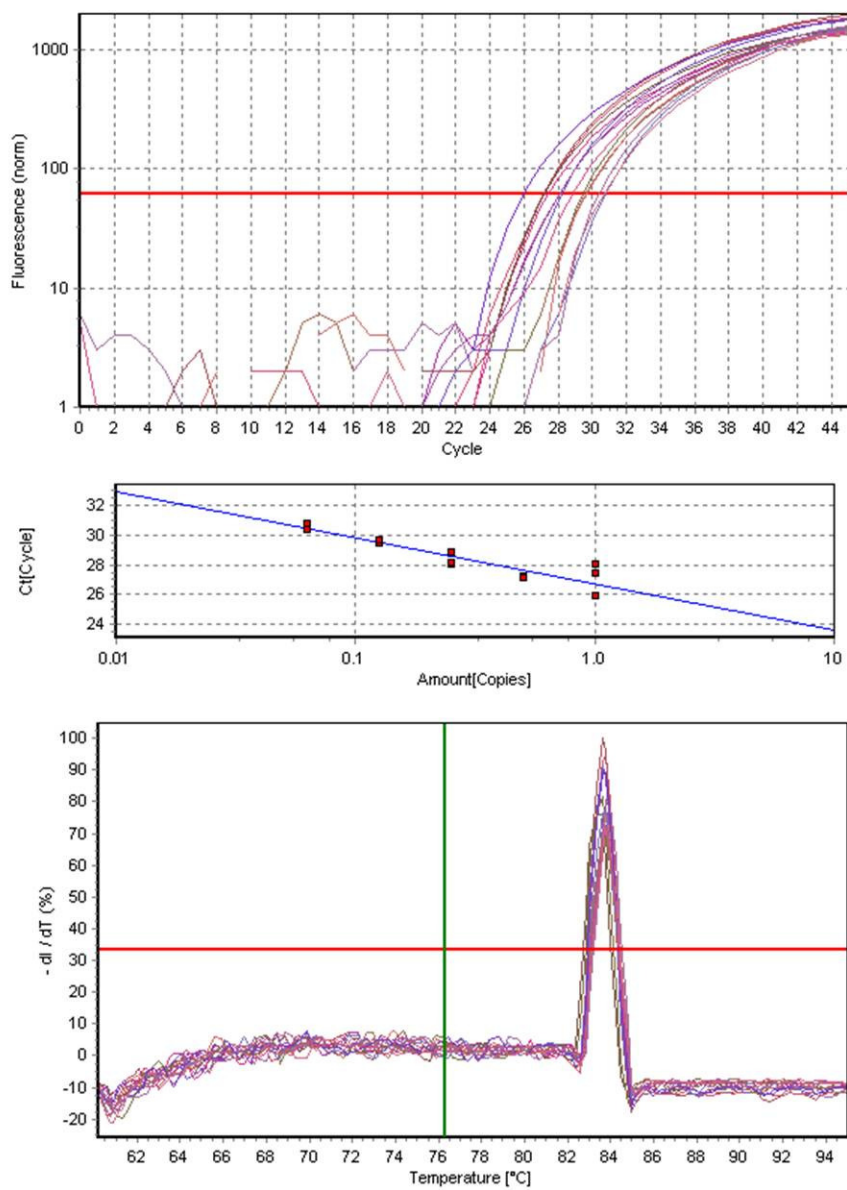


Figura 9 – Curvas de eficiência e dissociação do gene GAPDH em reação de PCR em tempo real com cDNA de CTE murinas de baixa concentração.

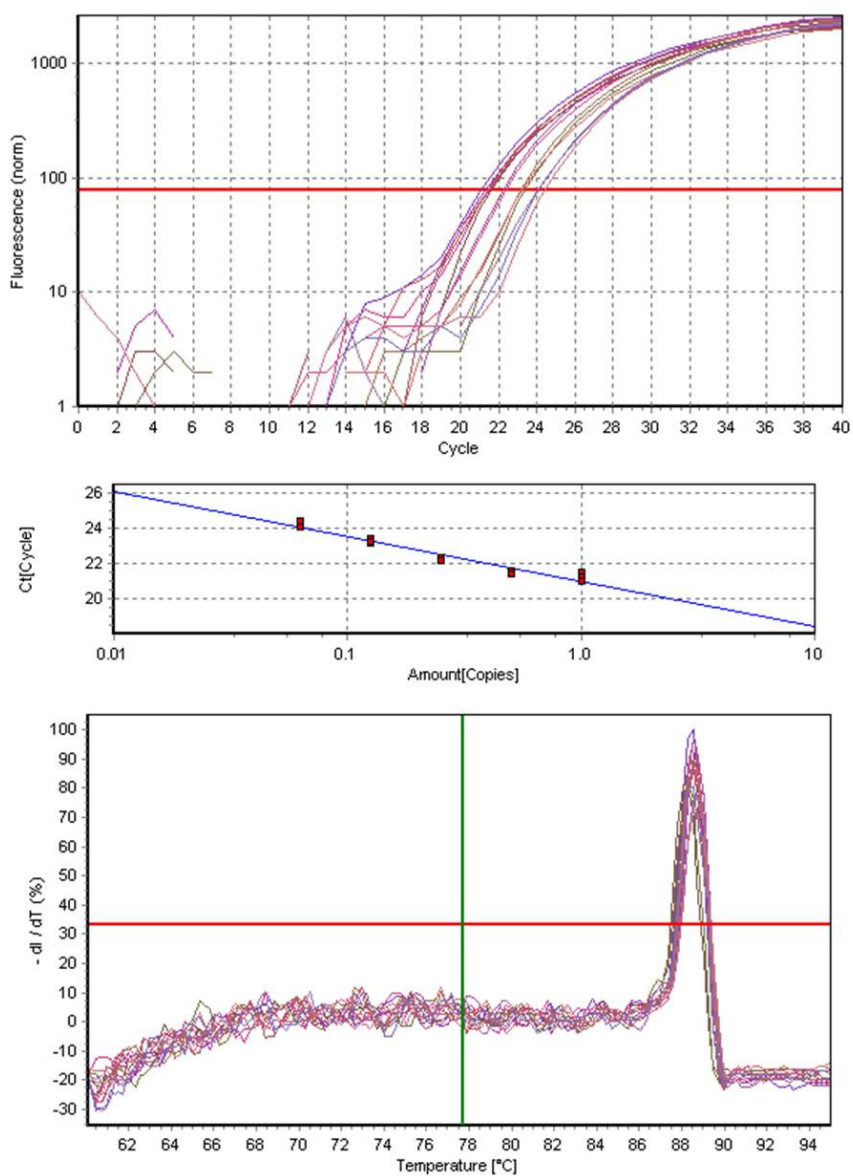


Figura 10 – Curvas de eficiência e dissociação do gene Sox2 em reação de PCR em tempo real com cDNA de CTE murinas de baixa concentração.

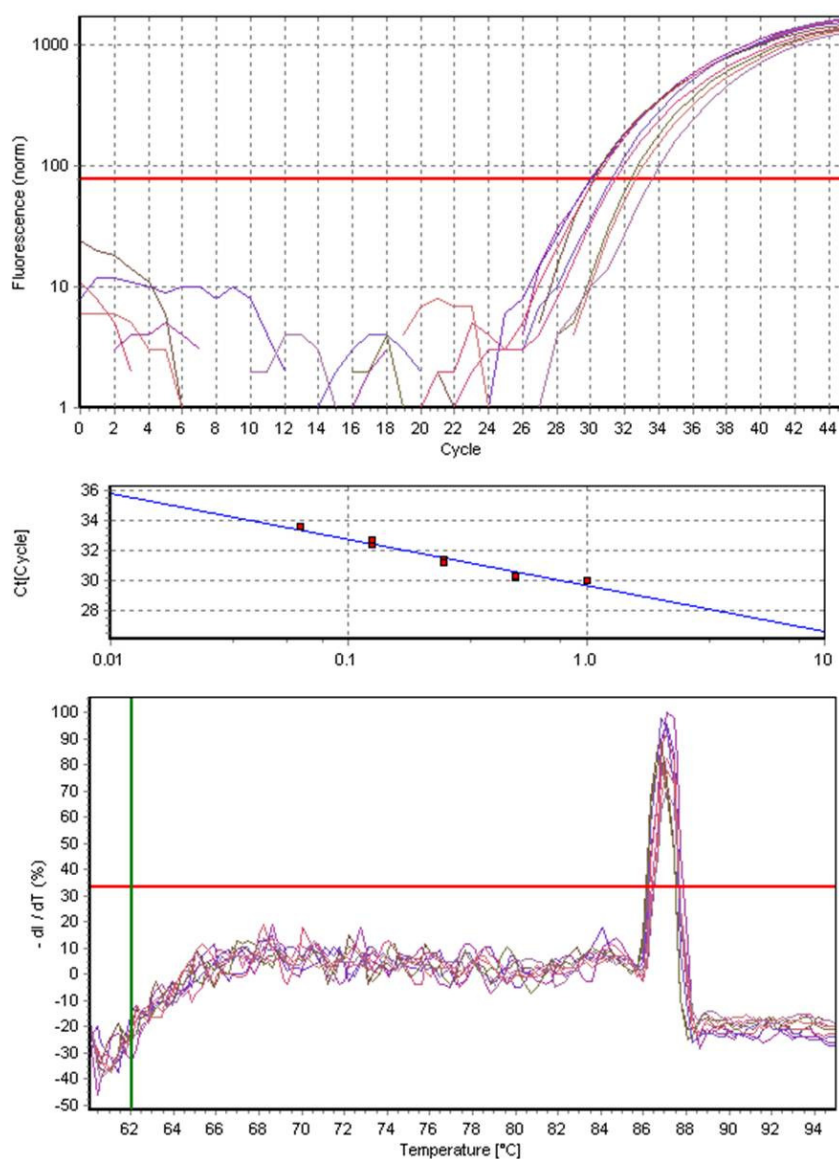


Figura 11 – Curvas de eficiência e dissociação do gene *FoxD3* em reação de PCR em tempo real com cDNA de CTE murinas de baixa concentração.

## APÊNDICE B – CURVAS DE EFICIÊNCIA DOS GENES NANOG, SOX2, FOXD3 E GAPDH EM BLASTOCISTOS SUÍNOS

Para a quantificação relativa da expressão dos genes Nanog, Sox2, FoxD3 em blastocistos suínos produzidos *in vitro* e *in vivo*, foram realizadas as curvas de eficiência conforme descrito no Apêndice A. As figuras 12-15 mostram as curvas de eficiência e dissociação dos genes GAPDH, Nanog, Sox2 e FoxD3 para as reações de PCR em tempo real em embriões suínos, respectivamente.

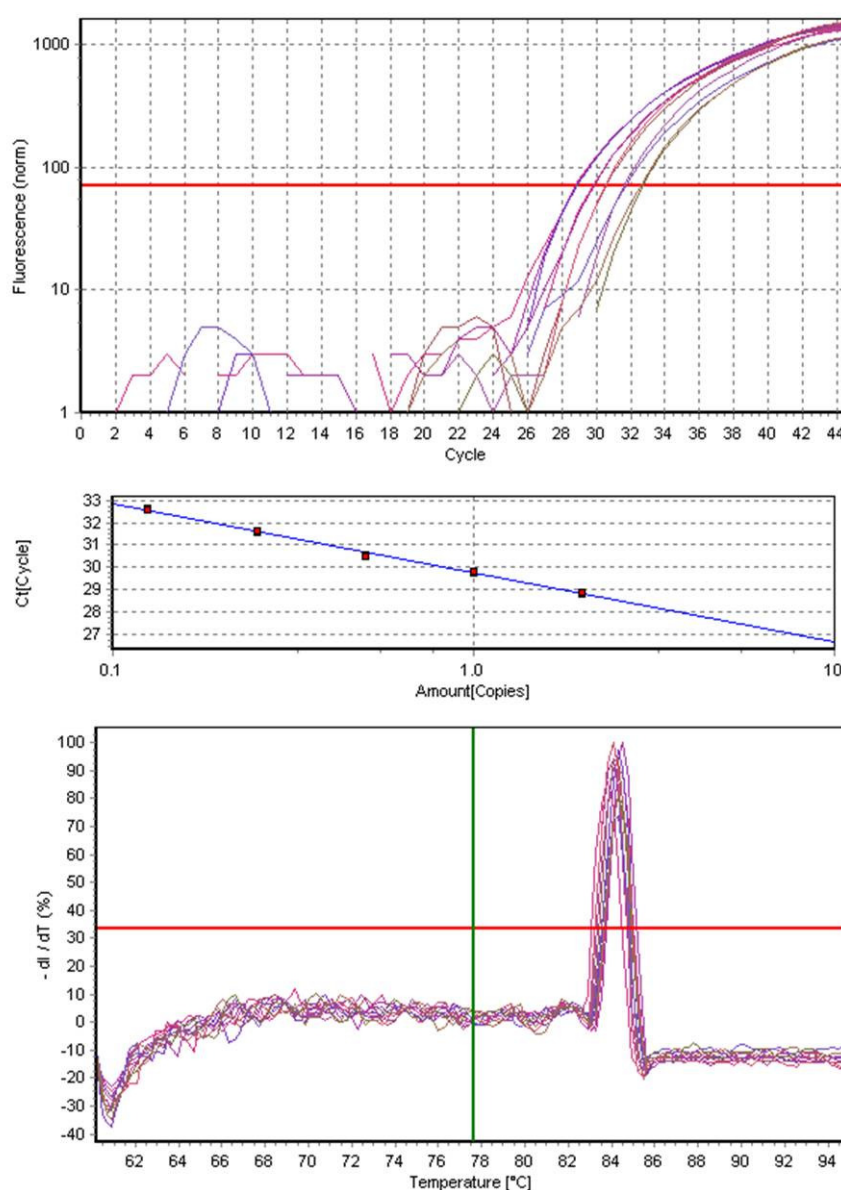


Figura 12 - Curvas de eficiência e dissociação do gene GAPDH em reação de PCR em tempo real com cDNA de blastocistos suínos.

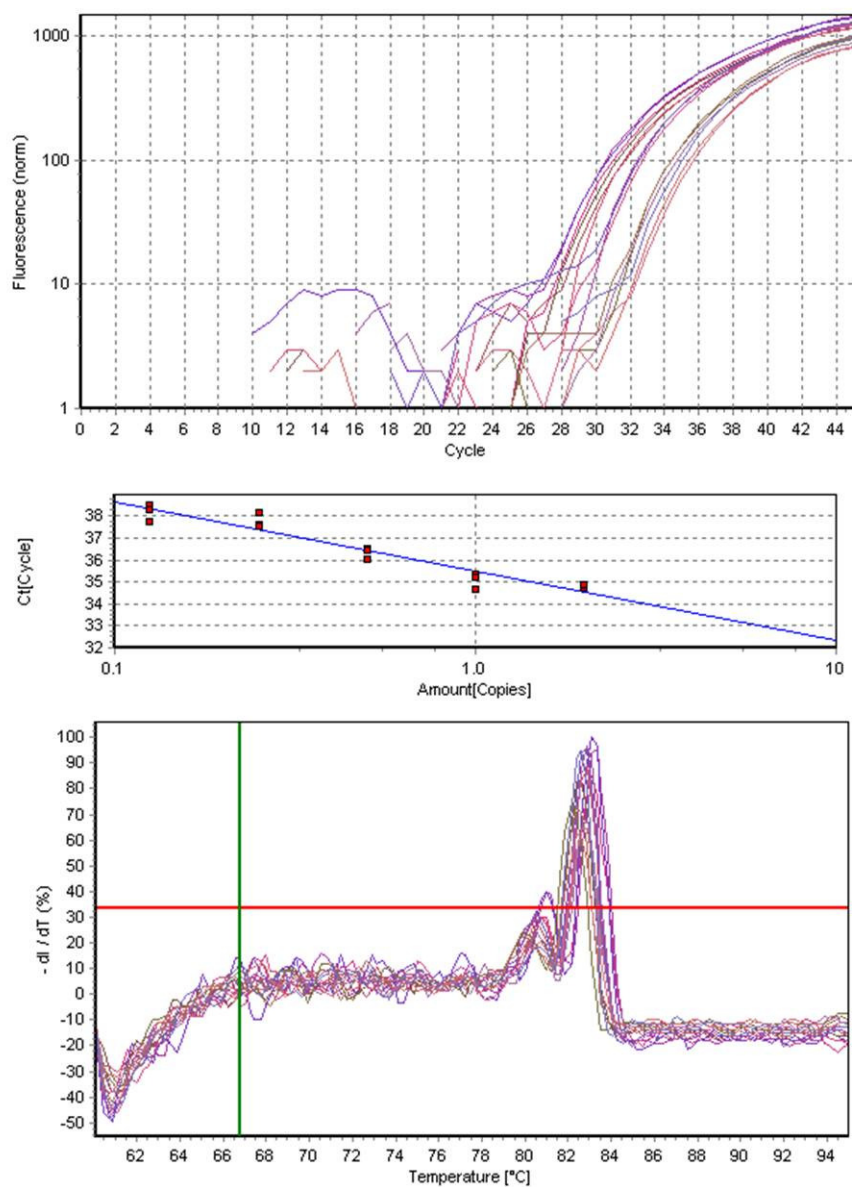


Figura 13 - Curvas de eficiência e dissociação do gene Nanog em reação de PCR em tempo real com cDNA de blastocistos suínos.

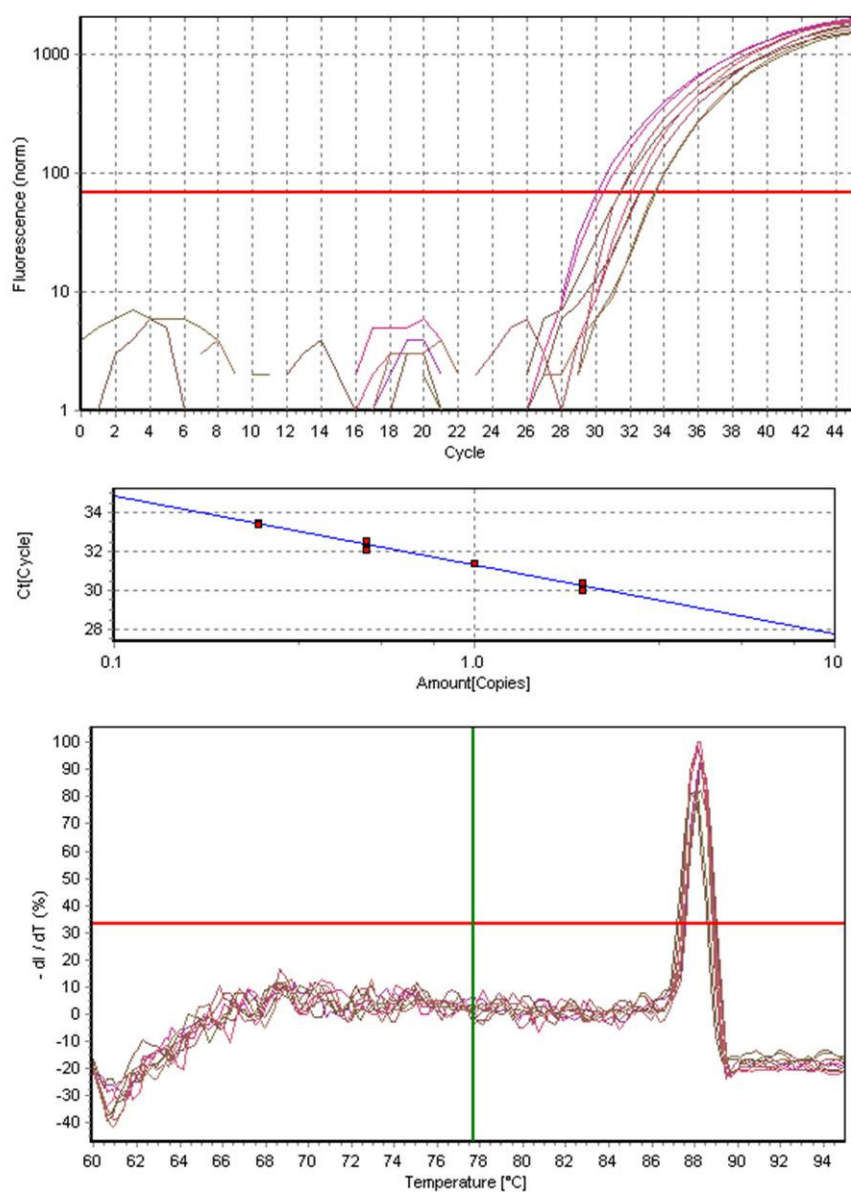


Figura 14 - Curvas de eficiência e dissociação do gene Sox2 em reação de PCR em tempo real com cDNA de blastocistos suínos.



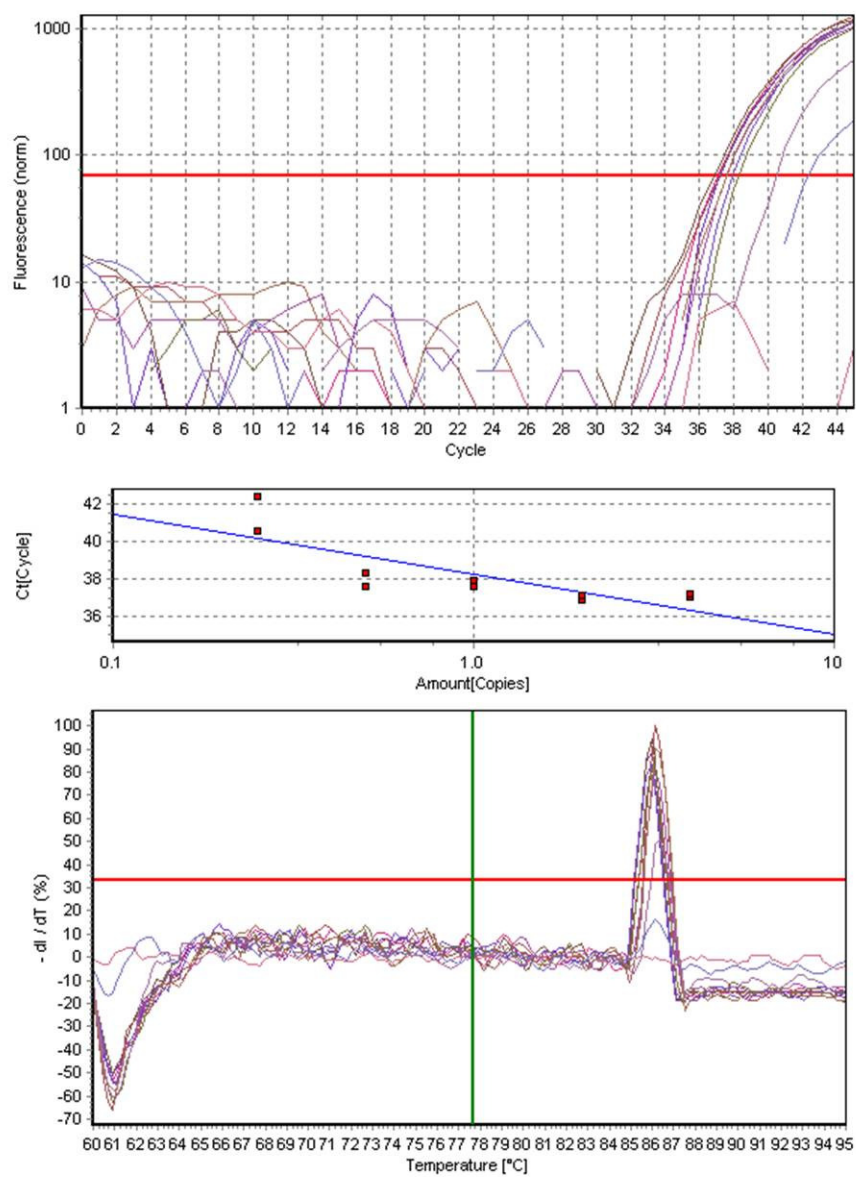


Figura 15 - Curvas de eficiência e dissociação do gene FoxD3 em reação de PCR em tempo real com cDNA de blastocistos suínos.

## APÊNDICE C – ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE PARA VERIFICAÇÃO DOS TAMANHOS DOS FRAGMENTOS AMPLIFICADO POR PCR EM TEMPO REAL

Foi realizada eletroforese em gel de agarose 1% para verificação das massas moleculares dos fragmentos amplificados pela reação de PCR em tempo real dos genes GAPDH, Nanog, Sox2 e FoxD3 (Figura 16).

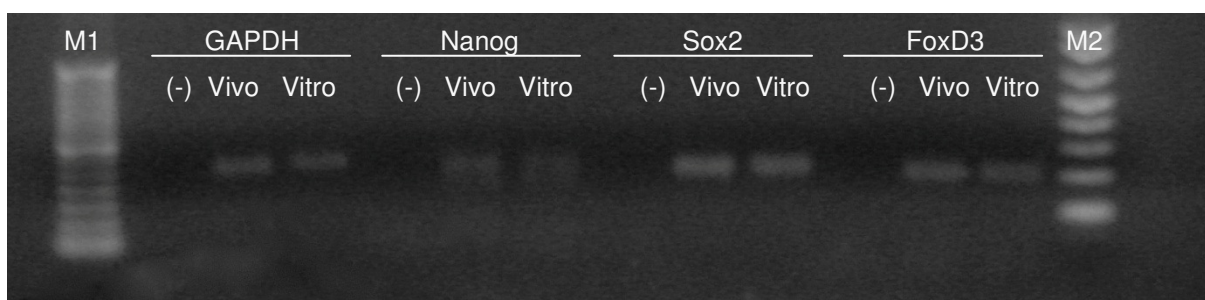


Figura 16 – M1= Marcador de peso molecular de 50 pb; (-) controle negativo da reação dos genes GAPDH, Nanog, Sox2 e FoxD3; vivo= blastocistos produzidos *in vivo*; vitro= blastocistos produzidos *in vitro*; M2= marcador de peso molecular de 1 kb.

## ANEXOS

### ANEXO A – MEIO DE LAVAGEM

#### Meio Hepes buffered Tyrode's (HbT)

- NaCl..... 113,7 mM
- NaHCO<sub>3</sub>..... 2 mM
- Na Lactate ..... 12,95 mM
- Na Pyruvate ..... 0,2 mM
- NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>..... 0,34 mM
- KCl..... 3,22 mM
- CaCl<sub>2</sub> 2H<sub>2</sub>O..... 2,04 mM
- MgCl<sub>2</sub> 6H<sub>2</sub>O ..... 0,5 mM
- Hepes ..... 10 mM
- BSA V ..... 3 mM
- SFB..... 10%
- Phenol Red..... 0,027 mM

## ANEXO B – MEIOS DE MATURAÇÃO

### Com hormônio

- Piruvato de Sódio ..... 0,91 mM
- Cisteína ..... 0,57 mM
- D-Glucose..... 3,05 mM
- EGF ..... 50 UI/mL
- hCG ..... 10 UI/mL
- eCG ..... 10 UI/mL
- Gentamicina ..... 50 UI/mL
- Fluido Folicular Suíno..... 10%

### Sem hormônio

- Piruvato de Sódio ..... 0,91 mM
- Cisteína ..... 0,57 mM
- D-Glucose..... 3,05 mM
- EGF ..... 50 UI/mL
- Gentamicina ..... 50 UI/mL
- Fluido Folicular Suíno..... 10%

## ANEXO C – MEIO DE FECUNDAÇÃO

### Meio Tris Buffered Medium modificado (mTBM)

- NaCl..... 113,7 mM
- KCl..... 3 mM
- CaCl<sub>2</sub>..... 7,5 mM
- D-Glucose..... 11 mM
- Piruvato de Sódio ..... 5 mM
- Tris..... 20 mM
- Cafeína ..... 2 mM
- Cisteína ..... 0,57 mM
- BSA FAF..... 2 mM

## ANEXO D – PERCOLL

## Percoll 90%

- Percoll..... 0,9 mL
- Solução 10x..... 100  $\mu$ L
- $\text{NaHCO}_3$ ..... 0,0021 g
- Ácido Láctico (xarope) ..... 3,7  $\mu$ L
- $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (0,1M) ..... 3,9  $\mu$ L
- $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (1M) ..... 2  $\mu$ L

## Percoll 45%

Percoll 90% diluído em TALP Sêmen (1:1).

## TALP Sêmen (Solução Estoque de 50 mL)

- $\text{NaCl}$ ..... 0,2910 g
- $\text{KCl}$ ..... 0,0115 g
- $\text{MgCl}_2$ ..... 0,0040 g
- $\text{NaHCO}_3$ ..... 0,00175 g
- $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ..... 0,1050 g
- Phenol Red..... 0,0005 g
- Ácido Láctico (Xarope) ..... 155  $\mu$ L
- Hapes ..... 0,1190 g

## ANEXO E – MEIO DE CULTIVO

- NaCl..... 108 mM
- KCl..... 10 mM
- Ca Lactato ..... 2 mM
- $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ..... 0,35 mM
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  ..... 0,40 mM
- $\text{NaHCO}_3$ ..... 25,07 mM
- Glutamina ..... 1 mM
- Hipotaurina ..... 5 mM
- Gentamicina ..... 50UI/mL
- BSA ..... 3mg/mL
- Aminoácidos Essenciais (Sigma M7145).....20mL/L
- Aminoácidos não-essenciais (Sigma B6766) .. 10mL/L

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)



[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)