

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**EFEITOS DA HIPERACETILAÇÃO DE HISTONAS NA
DIFERENCIAÇÃO *IN VITRO* DE CÉLULAS TRONCO
EMBRIONÁRIAS MURINAS**

**Mestranda: Clara Slade Oliveira
Orientador: Prof. Dr. Joaquim Mansano Garcia**

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária (Reprodução Animal)

**Jaboticabal - São Paulo - Brasil
- 2009 -**

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

CLARA SLADE OLIVEIRA – nascida no município do Rio de Janeiro, RJ, aos 27 dias do mês de novembro de 1981, concluiu o curso colegial no “Colégio pH”, na cidade do Rio de Janeiro, RJ, em dezembro de 1999. Ingressou em agosto de 2000 no curso de graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal Fluminense, UFF, no município de Niterói, RJ; foi bolsista PROAC (Pró-Reitoria Acadêmica) de Monitoria de Genética e Melhoramento Animal de março de 2003 a fevereiro de 2004; obteve bolsa PROEX (Pró-Reitoria de Extensão) da disciplina Doenças Infecciosas no período de março a dezembro de 2004, ocasião na qual desenvolveu atividades de Iniciação Científica na PESAGRO (Empresa de Pesquisa Agropecuária do Estado do Rio de Janeiro). Concluiu, em agosto de 2005, o curso superior em Medicina Veterinária. Ingressou em novembro de 2005 na Empresa Ronald de Carvalho Agropecuária, onde atuou como Médica Veterinária até agosto de 2006. Em agosto de 2006, obteve bolsa de Treinamento Técnico nível III da FAPESP, na UNESP Jaboticabal. Ingressou, em março de 2007, no programa de Pós-Graduação, ao nível de mestrado, sob orientação do Prof. Dr. Joaquim Mansano Garcia, no Programa de Medicina Veterinária, Área de Concentração em Reprodução Animal, na FCAV – UNESP de Jaboticabal, com bolsa de mestrado da FAPESP.

Horizonte

O Mar anterior a nós, teus medos
Tinham coral e praias e arvoredos.
Desvendadas a noite e a cerração,
As tormentas passadas e o mistério,
Abria em flor o Longe, e o Sul sidéreo
Esplendia sobre as naus da iniciação.

Linha severa da longínqua costa --
Quando a nau se aproxima ergue-se a encosta
Em árvores onde o Longe nada tinha;
Mais perto, abre-se a terra em sons e cores:
E, no desembarcar, há aves, flores,
Onde era só, de longe a abstrata linha.

O sonho é ver as formas invisíveis
Da distância imprecisa, e, com sensíveis
Movimentos da esperança e da vontade,
Buscar na linha fria do horizonte
A árvore, a praia, a flor, a ave, a fonte --
Os beijos merecidos da Verdade.

Fernando Pessoa

AGRADECIMENTOS

À **vida**. Pela oportunidade de crescimento e aprendizado que ela oferece.

À minha família, por todo o apoio e incentivo oferecido na minha trajetória profissional. Sem vocês, certamente este trabalho não teria sido desenvolvido. Obrigada **Mãe, Pai, Ana e Fernando**, por todo o carinho, confiança e ensinamentos.

Ao orientador **Joaquim Mansano Garcia**, por toda a confiança depositada quando me ofereceu esta oportunidade e pela forma como sempre esteve disposto a contribuir e acreditar nas idéias propostas. Por ao invés de conduzir-me por seu caminho, me ter permitido encontrar outros caminhos, aprendendo a formular hipóteses e propor estudos.

À colega **Naiara Zoccal Saraiva**, pela participação ativa na elaboração, execução, discussão e redação deste trabalho, e por toda a amizade que se desenvolveu ao longo destes dois anos. Obrigada amiga, sem a sua ajuda certamente esta tarefa não seria possível.

À Pesquisadora **Luciana Romão**, obrigada pela disponibilidade, bom humor e por toda a assistência no fornecimento de suplementos e discussão de técnicas de imunocitoquímica.

À amiga **Roberta Vantini**, pela excessiva assistência oferecida durante todo este período na execução das técnicas, sempre presente e disposta a ajudar.

Ao companheiro **Daniel Beduschi**, pelo carinho, compreensão e dedicação nos momentos corridos. Seu apoio certamente tornou a conclusão deste trabalho uma

etapa bem mais fácil e prazerosa. Aos seus pais, **Luis Carlos e Lucia Beduschi**, pela amizade, apoio e presença familiar.

Aos amigos queridos conquistados em Jaboticabal, **Carla Martins, Letícia Zoccolaro, Bruno, Mario Benincasa, Paula Braga, Stael Pedroso, Aline Godoy** e todos os muitos outros, pela presença e apoio que tornaram a adaptação na cidade uma tarefa tão fácil e prazerosa.

Aos irmãos **Bornai, Aline, Rodrigo Norberto, Rubia da Silva** e todos os seguintes integrantes da República Misto-Quente, por terem sido tão acolhedores na chegada à Jaboticabal.

Aos colegas de laboratório, **Ana Paula Perini, Aline Lucio, Danilas de Melo, Eliandra, Fabio Monteiro, Juliana Borges, Juliana Pieroni, Kellen Oliveira, Marcela Souza, Marina, Mabel Cordeiro, Marcelo Bezerra, Maria Emília Oliveira, Max Resende, Michelly Macedo e Tatiane Tetzner**, pela companhia, assistência e amizade.

Aos colegas que passaram por Jaboticabal, **Simone Méo Niciura, Christina Ferreira e Felipe Perecin**, pelo apoio e auxílio na elaboração deste e de outros trabalhos.

Aos pesquisadores do ICB, UFRJ: à **MS Jasmin** e seus orientadores **Rosalia Mendez Otero e Antonio Carlos Campos de Carvalho**; ao **Professor Stevens Rehen e toda a equipe do Laboratório de Neurogênese e Diferenciação Celular**; e ao **PhD Fabio Mendes**. Obrigada pelas oportunidades de treinamento, discussão de técnicas e fornecimento de suplementos essenciais ao desenvolvimento deste trabalho.

Aos membros da banca do exame de qualificação, **Gisele Zoccal Mingoti e Rosângela Zacarias Machado**, e aos membros da banca de defesa, **Irina Kerkis e Lygia V. Pereira**, pelas excelentes sugestões e contribuições na correção deste trabalho.

Aos professores do Departamento de Reprodução Animal: **César Esper, Paulo Franceschini, Francisco Leite, Wilter Vicente e Vera Hossepian de Lima**, pela disponibilidade e ensinamentos.

Aos funcionários do Departamento de Reprodução Animal: **Edson, Ivo e Isabel**, pelo apoio no desenvolvimento deste trabalho.

À **FAPESP**, pelo apoio financeiro.

Este projeto foi financiado pela **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP**, sob processos nº. 06/54781-0, 06/59305-1, e 07/55968-9, de agosto de 2006 a março de 2009.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS.....	XII
LISTA DE FIGURAS.....	XIII
ABREVIATURAS.....	XV
RESUMO.....	XVII
1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	01
2 OBJETIVOS.....	03
3 REVISÃO DE LITERATURA.....	04
3.1 Células tronco embrionárias (CTE)	04
3.1.1 Introdução	04
3.1.2 Histórico	05
3.1.3 Desenvolvimento embrionário inicial	07
3.1.4 Cultivo de CTE e diferenciação celular	09
3.1.4.1 Linhagens derivadas do mesoderma	11
3.1.4.1.1 Diferenciação de células musculares estriadas cardíacas	12
3.1.4.2 Linhagens derivadas do endoderma	14
3.1.4.3 Linhagens derivadas do ectoderma	15
3.1.4.3.1 Diferenciação de células neurais	15
3.2 Regulação da expressão gênica em CTE	17
3.2.1 Epigenética	17
3.2.1.1 Acetilação de histonas	20
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	22
4.1 Cultivo de CTE pluripotentes	22
4.1.1 Descongelamento dos fibroblastos primários murinos (FPM)	23

4.1.2 Preparo de monocamada mitoticamente inativada	23
4.1.3 Descongelamento das CTE	24
4.1.4 Repique celular	25
4.1.5 Cultivo das CTE na ausência de FPM	25
4.1.6 Congelação	26
4.2 Cultivo em suspensão para a diferenciação das CTE	26
4.3 Cultivo aderente de corpos embrióides (CE)	27
4.3.1 Troca de meio	28
4.3.2 Avaliação da presença de focos de células contráteis	28
4.4 Avaliação da presença de proteínas específicas para tipos celulares diferenciados por imunocitoquímica	28
4.4.1 Anticorpos	28
4.4.2 Preparo das colônias e adição do anticorpo primário	30
4.4.3 Reação com anticorpo secundário e avaliação da reação	32
4.5 Captura e análise das imagens	32
4.6 Delineamento Experimental	35
4.6.1 Experimento 1: Caracterização <i>in vitro</i> da linhagem de CTE H106	35
4.6.2 Experimento 2: Efeitos da TSA sobre a morte celular e apoptose de CTE em diferenciação	35
4.6.2.1 Teste de TUNEL	36
4.6.2.2 Teste de integridade de membrana	37
4.6.3 Experimento 3: Dinâmica da acetilação de histonas H3 em CTE tratadas com TSA	38
4.6.3.1 Experimento 3(a): Dinâmica da acetilação de histonas H3 em CTE pluripotentes tratadas com TSA	38
4.6.3.2 Experimento 3(b): Dinâmica da acetilação de histonas H3 em CTE em diferenciação tratadas com TSA no d5 e no d13	39
4.6.4 Experimento 4: Efeitos da TSA na diferenciação <i>in vitro</i> neural de CTE	39
4.6.4.1 Experimento 4(a): Efeitos da TSA na diferenciação <i>in vitro</i> inicial de CTE em precursores ectodérmicos	39

4.6.4.2 Experimento 4(b): Efeitos da TSA na diferenciação <i>in vitro</i> tardia de CTE em neurônios	40
4.6.5 Experimento 5: Efeitos da TSA na diferenciação <i>in vitro</i> muscular de CTE	41
4.6.5.1 Experimento 5(a): Efeitos da TSA na diferenciação <i>in vitro</i> inicial de CTE em precursores mesodérmicos	41
4.6.5.2 Experimento 5(b): Efeitos da TSA na diferenciação <i>in vitro</i> tardia de CTE em células musculares estriadas	41
4.7 Estatística	42
5 RESULTADOS.....	43
5.1 Experimento 1: Caracterização <i>in vitro</i> da linhagem de CTE H106	42
5.2 Experimento 2: Efeitos da TSA sobre a morte celular e apoptose de CTE em diferenciação	46
5.2.1 Efeitos da TSA na formação de CE	46
5.2.2 Teste de toxicidade da TSA	48
5.2.3 Efeitos da TSA nas taxas de apoptose	49
5.3 Experimento 3: Dinâmica da acetilação de histonas H3 em CTE tratadas com TSA	52
5.3.1 Experimento 3(a): Dinâmica da acetilação de histonas H3 em CTE pluripotentes tratadas com TSA	52
5.3.1.1 Alterações morfológicas durante o tratamento com TSA	55
5.3.2 Experimento 3(b): Dinâmica da acetilação de histonas H3 em CTE em diferenciação tratadas com TSA no d5	57
5.4 Experimento 4: Efeitos da TSA na diferenciação <i>in vitro</i> neural de CTE	60
5.4.1 Experimento 4(a): Efeitos da TSA na diferenciação <i>in vitro</i> inicial de CTE em precursores ectodérmicos	62
5.4.2 Experimento 4(b): Efeitos da TSA na diferenciação <i>in vitro</i> tardia de CTE em neurônios	63
5.5 Experimento 5: Efeitos da TSA na diferenciação <i>in vitro</i> muscular de CTE	64

5.5.1 Experimento 5(a): Efeitos da TSA na diferenciação <i>in vitro</i> inicial de CTE em precursores mesodérmicos	66
5.5.2 Experimento 5(b): Efeitos da TSA na diferenciação <i>in vitro</i> tardia de CTE em células musculares estriadas	68
6 DISCUSSÃO.....	71
6.1 Experimento 1: Caracterização <i>in vitro</i> da linhagem de CTE H106	71
6.2 Experimento 2: Efeitos da TSA sobre a morte celular e apoptose de CTE em diferenciação	72
6.2.1 Efeitos da TSA na formação de CE	73
6.2.2 Toxicidade de TSA	73
6.2.3 Efeitos da TSA nas taxas de apoptose	74
6.3 Experimento 3: Dinâmica da acetilação de histonas H3 em CTE tratadas com TSA	76
6.3.1 Padrão de acetilação de CTE não tratadas com TSA	76
6.3.2 Padrão de acetilação de CTE tratadas com TSA	78
6.3.3 Alterações morfológicas observadas em decorrência do tratamento com TSA	79
6.4 Experimento 4: Efeitos da TSA na diferenciação <i>in vitro</i> neural de CTE	80
6.5 Experimento 5: Efeitos da TSA na diferenciação <i>in vitro</i> muscular de CTE	83
7 CONCLUSÕES.....	86
8 IMPLICAÇÕES.....	88
9 REFERÊNCIAS.....	89
10 APÊNDICES.....	102
Apêndice A	102

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Descrição dos anticorpos utilizados para as reações de imunocitoquímica	p.31
Tabela 2 Descrição dos grupos propostos para o experimento 2(TUNEL)	p.37
Tabela 3 Descrição dos grupos propostos para o experimento 2 (Int. de memb.)	p.38
Tabela 4 Descrição dos grupos propostos para o experimento 3(a)	p.38
Tabela 5 Descrição dos grupos propostos para o experimento 3(b)	p.39
Tabela 6 Descrição dos grupos propostos para o experimento 4(a)	p.40
Tabela 7 Descrição dos grupos propostos para o experimento 4(b)	p.41
Tabela 8 Percentuais de células vivas obtidos pelo teste de integridade de membrana em CTE em diferenciação (d5 e d13) tratadas com diferentes concentrações de TSA 0 a 700nM	p.49
Tabela 9 Percentual de células em processo de apoptose (TUNEL positivas) nos grupos 0nM (controle) e 15nM ao d5 de cultivo em suspensão	p.51
Tabela 10 Percentual de células em processo de apoptose (TUNEL positivas) nos grupos 0nM (controle), 50nM, 100nM e 150nM 24hs após o início do tratamento com TSA (d6 e d14)	p.52
Tabela 11 Percentuais de área acetilada em núcleos de CTE em diferenciação tratadas com TSA por 24hs(0nM,50nM,100nM e 150nM) em 12,24,36 e 48hs	p.59
Tabela 12 Relação de células nestina-positivas nos diferentes grupos	p.62
Tabela 13 Relação entre a fração de área total das células nestina-positivas e a fração de área total dos núcleos totais nos diferentes grupos	p.63
Tabela 14 Relação de células α III tubulina-positivas nos diferentes grupos	p.64
Tabela 15 Relação de células desmina-positivas nos diferentes grupos	p.66
Tabela 16 Relação entre a fração de área total das células desmina-positivas e a fração de área total dos núcleos totais nos diferentes grupos	p.67
Tabela 17 Relação de células e núcleos troponina I positivos nos diferentes grupos	p.68
Tabela 18 Relação de CE que apresentaram focos contráteis nos diferentes grupos	p.69

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Modelo comparativo dos estádios iniciais do desenvolvimento embrionário e de CTE/CE (KELLER, 2005)	p.9
Figura 2 Esquema cronológico de cultivo das CTE pluripotentes	p.22
Figura 3 Esquema ilustrativo do preparo do cultivo em suspensão <i>Hanging Drop</i> ,	p.27
Figura 4 Esquema ilustrativo do plaqueamento de CE para início do cultivo aderente	p.27
Figura 5 Mensuração da área dos CE no <i>software</i> AxioVision	p.34
Figura 6 Mensuração da área positiva dos cultivos no <i>software</i> ImageJ	p.34
Figura 7 Cronograma de observação de tipos celulares obtidos a partir da diferenciação <i>in vitro</i> de CTE H106	p.43
Figura 8 Imagens do cultivo de CTE	p.44
Figura 9 Tipos celulares observados no cultivo de CTE em diferenciação	p.44
Figura 10 Reações de imunocitoquímica para caracterização da linhagem H106	p.45
Figura 11 Comparação dos CE dos grupos 0nM (controle) e 15nM ao d5 de cultivo em suspensão	p.46
Figura 12 Corpos embrióides no 5º dia de cultivo em suspensão dos grupos 0nM (controle) (a) e 15nM (b)	p.47
Figura 13 Percentuais de células vivas após 24hs de tratamento com diferentes concentrações de TSA em células no d6 e d14 de diferenciação	p.48
Figura 14 Teste de integridade de membrana	p.50
Figura 15 Teste TUNEL	p.50
Figura 16 Percentual de células em processo de apoptose (TUNEL positivas) nos grupos 0nM (controle) e 15nM ao d5 de cultivo em suspensão	p.49
Figura 17 Percentual de células em processo de apoptose (TUNEL positivas) nos grupos 0nM (controle), 50nM, 100nM e 150nM 24hs após o início do tratamento com TSA(d6 e d14)	p.51

Figura 18 Reações de imunocitoquímica para AcLys9H3 em CTE d0-2 tratadas com TSA na presença de LIF	p.53
Figura 19 Reações de imunocitoquímica para AcLys9H3 em CTE d0-2 tratadas com TSA na ausência de LIF	p.53
Figura 20 Níveis de AcLys9H3 presentes nos diferentes grupos do d0 ao d2 de diferenciação em 12, 24, 36 e 48hs	p.54
Figura 21 Morfologia das células nos cultivos LIF+ e LIF- tratados com TSA em 12, 24, 36 e 48hs	p.56
Figura 22 Reações de imunocitoquímica para AcLys9H3 em CTE tratadas com TSA do d5-7 e d13-15 de diferenciação	p.58
Figura 23 Níveis de AcLys9H3 presentes nos diferentes grupos de CTE do d5-7(A) e d13-15(B) de diferenciação em 0, 12, 24, 36 e 48 horas	p.59
Figura 24 Reações de imunocitoquímica para marcadores neurais	p.61
Figura 25 Relação percentual de células nestina positivas nos diferentes grupos	p.62
Figura 26 Razão CY3/HOECHST de nestina nos diferentes grupos	p.63
Figura 27 Relação percentual de células α III tubulina positivas nos diferentes grupos	p.64
Figura 28 Reações de imunocitoquímica para marcadores de células musculares Estriadas	p.65
Figura 29 Relação percentual de células desmina-positivas nos diferentes grupos	p.66
Figura 30 Razão CY3/HOECHST de desmina nos diferentes grupos	p.67
Figura 31 Relação percentual de células e núcleos troponina I positivos nos diferentes grupos	p.69
Figura 32 Relação de CE que apresentaram focos contráteis nos diferentes grupos	p.70

ABREVIATURAS

AcLys9H3	Lisina 9 acetilada na histona H3
AFP	Alfa feto proteína
ANP	<i>atrial natriuretic protein</i>
AR	Ácido retinóico
BMP2,4	<i>Bone morphogenetic protein</i>
BSA	<i>Bovine serum albumine</i>
° C	Graus Celsius
CE	Corpo(s) embrióide(s)
CO ₂	Dióxido de carbono
CT	Células tronco
CTE	Células tronco embrionárias
CTEm	Células tronco embrionárias murinas
Cy3	<i>Cyanine 3</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>
FGF	<i>Fibroblast growth factor</i>
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FPM	Fibroblastos primários murinos
Foxd3	<i>Forkhead box D3</i>
HDAC	Histona desacetilase
H106	Linhagem de CTE
IgG	Imunoglobulina
Irx3	<i>Iroquois related homeobox 3</i>
LIF	<i>Leukemia inhibitory factor</i>
Mash1	<i>Achaete-scute complex homolog 1 (Ascl1)</i>
MCI	Massa celular interna
MG	Miligramas
MHC	<i>Myosin heavy chain</i>
MLC	<i>Myosin light chain</i>
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
Msx1	<i>Msh homeobox 1</i>
Nanog	<i>Nanog homeobox</i>
Nkx2.5,2.9	<i>NK2 transcription factor related, locus 5/9</i>
N ₂	Nitrogênio

OCT 3/4	<i>Organic cation transporter, member 3/4</i>
Pax3,6	<i>Paired box gene 3,6</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PBS-L	PBS livre de cálcio e magnésio
Rex-1	<i>RNA exonuclease 1 homolog</i>
RNA	Ácido ribonucleico
SFB	Soro fetal bovino
SIRT	<i>Silent mating type information regulation</i>
TGFbeta	Transforming growth factor
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethane
TSA	Tricostatina A
Utf1	<i>Undifferentiated embryonic stem cell transcription factor 1</i>
µg	Microgramas
µL	Microlitro
µM	Micromol

RESUMO

O estudo dos processos de diferenciação em células tronco embrionárias (CTE) representa uma importante ferramenta para o entendimento das vias moleculares que os regem, apresentando grande aplicação tanto na ciência básica quanto na engenharia de tecidos e medicina regenerativa. Pouco é conhecido sobre as marcas epigenéticas existentes na cromatina destas células, e de que forma a regulação da expressão gênica ocorre no momento da diferenciação. O presente trabalho teve como objetivo o estudo dos efeitos da hiperacetilação das histonas causada pela droga tricostatina A (TSA), uma inibidora das enzimas histona desacetilases, sobre a diferenciação destas células em estádios iniciais e avançados. Para tanto, a hiperacetilação induzida pela droga foi estimada por reações de imunocitoquímica para AcLys9H3. Os efeitos anti-proliferativos da TSA foram mensurados pelo teste de TUNEL e contagem de células. Ainda, foram conduzidos experimentos de diferenciação *in vitro* de CTE e análise da expressão de proteínas características de linhagens celulares diferenciadas por reações de imunocitoquímica (Oct3/4, nestina, α III tubulina, desmina e troponina I), em cultivos tratados com TSA em diferentes concentrações e em diferentes momentos. Desta forma, foi estimada a população de tipos celulares oriundos dos folhetos embrionários ectodérmico e mesodérmico, como neurônios, e células musculares, quando foi promovida a hiperacetilação das histonas nas CTE, em diferentes momentos da diferenciação celular *in vitro*. A TSA induziu apoptose em níveis superiores aos do grupo controle, e retardou/inibiu a divisão celular. Promoveu hiperacetilação dose-dependente nos períodos estudados, e estimulou a diferenciação de precursores mesodérmicos (50nM d5) e ectodérmicos (15nMd0-5 e 50nMd5), cardiomiócitos (50nMd5 e 100nMd13) e neurônios (15nMd0-5, 50nMd5, 100nMd5, 100nMd13).

Palavras-chave: células tronco embrionárias, diferenciação, hiperacetilação de histonas, cardiomiócitos, neurônios.

ABSTRACT

Studies on embryonic stem cells (ESC) differentiation represents an important tool leading to understanding of its molecular pathways, with many applications both on basic research and tissue engineering / regenerative medicine. Little is known about epigenetic marks on ESC chromatin, and how gene expression occurs at differentiation time. The aim of this work was to study effects of histone hiperacetylation, induced by cell treatment with trichostatin A (TSA), an histone deacetylase inhibitor, on both initial and late differentiation. For that, drug-induced hyperacetylation was studied by AcLys9H3 immunocytochemistry. TSA anti-proliferative effects were analysed by TUNEL test and cell counts. Experiments on ESC in vitro differentiation and immunocytochemistry for specific cell types proteins (Oct3/4, nestin, α III tubulin, desmin and troponin I) were performed, in treated and control groups, at different moments. This analysis showed specific cell types populations derived from embryonic ectodermal and mesodermal, such as neurons and cardiomyocytes, when histone hyperacetylation were induced, on both initial and late differentiation. Our results showed that TSA induces apoptosis and inhibits cellular proliferation. Also, TSA promoted dose-dependent histone hyperacetylation at studied moments, and stimulated mesodermal (50nM d5) and ectodermal (15nMd0-5 e 50nMd5) precursors, cardiomyocytes (50nMd5 e 100nMd13) and neurons (15nMd0-5, 50nMd5, 100nMd5, 100nMd13) differentiation.

Key-words: embryonic stem cells, differentiation, histone hyperacetylation, trichostatin A, cardiomyocytes, neurons.

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

As células tronco embrionárias (CTE) são células pluripotentes oriundas de embriões em estádios iniciais de desenvolvimento. Apresentam inúmeras possibilidades de aplicação na medicina e na ciência, tais como a terapia celular, estudos na área básica dos eventos de diferenciação de linhagens, a manipulação de características genéticas desejáveis ou não e a produção de animais transgênicos, além de constituírem um importante modelo *in vitro* para o estudo da embriogênese e seus eventos moleculares.

A elucidação dos processos que regem a diferenciação de CTE e o conseqüente domínio destes eventos é objetivo de numerosos estudos na área de biologia celular e molecular. No entanto, permanecemos ainda distantes do entendimento pleno do processo de diferenciação celular.

Sabemos que a acessibilidade dos fatores de transcrição ao DNA depende da forma de organização da cromatina local, que quando compactada dificulta ou impossibilita a transcrição de genes. Esta organização da cromatina, determinada por eventos epigenéticos, se deve em parte a modificações nas proteínas histonas (GOODSELL, 2003).

Quando ocorre a diferenciação das CTE, alterações morfológicas e no padrão de expressão gênica das mesmas se tornam evidentes (KELLER, 2005). Durante a diferenciação inicial de CTE, os níveis de transcrição de diversos genes são fortemente alterados temporalmente, de forma tecido-específica. Ocorrem modificações nas marcas epigenéticas, que relaxam ou contraem a cromatina, alterando o acesso dos fatores de transcrição ao DNA. Tais alterações são creditadas por participarem da regulação da expressão gênica local e global por modificações pós-traducionais nas histonas (HUEBERT e BERNSTEIN, 2005).

Uma das mais conhecidas modificações pós-traducionais encontradas em histonas é a adição do grupamento acetil. Quando ocorre, a interação da cauda da histona com o nucleossomo é enfraquecida, liberando o DNA local para a transcrição. Assim, a acetilação de histonas pode aumentar o acesso de fatores de

transcrição ao DNA, e desta forma, altos níveis de acetilação podem levar a aumentos significativos na transcrição gênica (VERDONE, CASERTA & DI MAURO, 2005).

A tricostatina A é uma droga inibidora das enzimas histona desacetilases, que promove hiperacetilação global das histonas, e é utilizada em estudos envolvendo alterações epigenéticas. Outras drogas, como o ácido valpróico, também induzem a hiperacetilação de histonas. A escolha da TSA foi realizada em função de seu uso em experimentos recentes de clonagem, que demonstrado incrementos significativos na produção de embriões (ZHANG et al., 2007), umas das linhas de pesquisa de nosso grupo.

Nas CTE, o uso da tricostatina A induz modificações rápidas de ordem morfológica no perfil de expressão gênica, semelhantes às ocorridas na diferenciação inicial das CTE induzida pela retirada do LIF (McCOOL et al., 2007). Portanto, a droga vem sendo utilizada para avaliar o comportamento da diferenciação das CTE na presença de hiperacetilação das histonas, buscando a identificação dos eventos moleculares que regulam a perda do estado indiferenciado e o comprometimento com linhagens específicas. Outros estudos utilizam a TSA buscando incrementos em tipos celulares específicos, objetivando colaborar para o entendimento dos processos de acetilação durante a diferenciação das CTE.

Com o intuito de avaliar os efeitos da hiperacetilação das histonas destas células durante a diferenciação, foram conduzidos experimentos induzindo a diferenciação celular *in vitro* na presença de diferentes concentrações da droga TSA e em diferentes momentos. Os cultivos foram destinados a estudos de imunocitoquímica, objetivando estimar os níveis de acetilação de histonas H3 em CTE tratadas com TSA; e a caracterização de tipos celulares oriundos dos folhetos ectodérmico e mesodérmico.

2 OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos da droga tricostatina A sobre a diferenciação de células tronco embrionárias murinas (linhagem H106).

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Avaliar o comportamento de diferenciação *in vitro* da linhagem H106 de CTE.
- 2) Estudar os efeitos da TSA sobre a morte celular e apoptose na diferenciação de CTE.
- 3) Estudar os efeitos de diferentes concentrações de TSA sobre a acetilação das histonas H3 em CTE pluripotentes e em processo de diferenciação inicial e tardia.
- 4) Avaliar os efeitos do tratamento com TSA na diferenciação inicial e tardia das CTE sobre a derivação de precursores ectodérmicos e neurônios.
- 5) Avaliar os efeitos do tratamento com TSA na diferenciação inicial e tardia das CTE sobre a derivação de precursores mesodérmicos e células musculares estriadas.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Células tronco embrionárias (CTE)

3.1.1 Introdução

O termo “células tronco” (CT) refere-se a um grupo de células indiferenciadas que possuem a capacidade de se especializarem em diferentes tipos celulares do organismo (THE PRESIDENT’S COUNCIL ON BIOETHICS, 2004). As CT contribuem para o repovoamento de células perdidas durante processos normais de envelhecimento celular e injúrias (ODORICO et al., 2001). Podem ser isoladas a partir de embriões (células tronco embrionárias); do cume gonadal (células tronco germinativas); ou derivadas de órgãos e tecidos não-embrionários (células tronco adultas).

As células tronco embrionárias (CTE) são linhas de células pluripotentes isoladas a partir da massa celular interna de blastocistos em desenvolvimento e cultivadas *in vitro* (EVANS e KAUFMAN, 1981; MARTIN, 1981). Sua importância para a biologia moderna e para a medicina reside na capacidade de auto-renovação por longos períodos de tempo sem envelhecimento e na pluripotência, ou habilidade das mesmas em diferenciarem-se em tipos celulares oriundos dos folhetos endodérmico, mesodérmico e ectodérmico (RIPPON & BISHOP, 2004).

Quando retornadas ao ambiente embrionário por transferência a blastocistos receptores, as CTE cultivadas se comportam como células embrionárias normais, interferindo em todas as linhagens celulares, inclusive germinativas (BRADLEY et al., 1984).

Dois fatores de transcrição se mostraram essenciais na manutenção do estado indiferenciado das CTE: *OCT 3/4* (NIWA et al., 2000) e *Nanog* (CHAMBERS et al., 2003; MITSUI et al., 2003).

As CTE consistem em um modelo para estudo dos mecanismos envolvidos na especificação de linhagens durante estádios iniciais do desenvolvimento em mamíferos (DINSMORE et al., 1998). Técnicas de cultivo *in vitro* oferecem uma situação única, permitindo o controle de citocinas extrínsecas ou microambientes

criados por fatores de crescimento para avaliar como tais agentes influenciam a diferenciação celular (SCHULDINER et al., 2000).

Ainda, as CTE podem ser manipuladas geneticamente, e os fenômenos de mutação/inserção podem ser estudados em corpos embrióides ou em células isoladas após a diferenciação *in vitro* (BOHELER e WOBUS, 2002). A inserção de vetores de expressão ao acaso no genoma de mamíferos permite estudos de ganho de função (animais *knock-in*), enquanto eventos dirigidos, com inserção em sítios-alvo, estão normalmente associados a estudos de perda de função (animais *knock-out*). A manipulação gênica e posterior diferenciação *in vitro* das CTE permite modificações no genoma mamífero sem causar preocupações de efeitos adversos no desenvolvimento embrionário como um todo (BOHELER et al., 2002).

Desta forma, as CTE podem ser transformadas e utilizadas para inferir sobre a complexa rede de genes que codificam fatores de transcrição na regulação da expressão gênica tecido-específica, através da comparação de linhagens mutadas *knock-out* e linhagens selvagens (DUNCAN et al., 1998).

Também podem ser aplicadas para a produção de animais domésticos transgênicos, permitindo a transferência de alelos mutantes para o interior do genoma animal. As CTE transformadas podem ser utilizadas na produção de quimeras (STICE et al., 1994; CIBELLI et al., 1998) ou clones transgênicos (KEEFER et al., 1994; WAKAYAMA et al., 1999), visando condições genéticas economicamente favoráveis, como a resistência a doenças e a expressão de proteínas de interesse comercial no leite (MÜLLER e BREM, 1994; WILMUT e WHITELAW, 1994).

3.1.2 Histórico

A primeira linha de células pluripotentes a ser estabelecida consistiu em carcinomas embrionários derivados do compartimento indiferenciado de células germinativas tumorais de murinos e humanos (FINCH e EPHRUSI, 1967). Essas células proliferam continuamente durante o cultivo *in vitro* e são induzíveis à diferenciação dos três folhetos embrionários: mesoderma, ectoderma e endoderma

(KLEINSMITH e COCHRAN, 1964). Apesar de serem extremamente úteis no campo experimental, já que contribuem extensivamente a todos os tecidos normais de camundongos quimeras e possibilitam assim o estudo da diferenciação celular, não podem ser utilizadas para pesquisas clínicas por serem derivadas de tumores (ILLMENSEE e MINTZ, 1976).

O isolamento de CTE em 1981 anunciou a possibilidade do uso das mesmas em pesquisas na área de desenvolvimento embrionário e diferenciação celular (EVANS e KAUFMAN, 1981; MARTIN, 1981). Com o avanço das pesquisas, surgiu a perspectiva de que esse tipo celular poderia ser isolado a partir de blastocistos humanos e diferenciado *in vitro* em qualquer tecido do organismo, possibilitando a exploração da terapia celular, e introduzindo um novo conceito no tratamento de uma extensa gama de doenças nas quais danos em determinados órgãos não podem ser reparados naturalmente pelo organismo (RIPPON e BISHOP, 2004). Em 1998, CTE humanas foram isoladas e diferenciadas *in vitro* (THOMSON et al., 1998), tornando a medicina regenerativa e engenharia de tecidos uma possibilidade real para o tratamento de doenças em seres humanos.

Desta forma, doenças resultantes da destruição ou perda de função de um limitado número de tipos celulares, como a diabetes *mellitus*, na qual as células pancreáticas são seletivamente destruídas, ou o mal de Parkinson, que resulta da destruição de neurônios dopaminérgicos em uma região particular do cérebro, poderiam ser tratadas pelo transplante de células diferenciadas *in vitro* derivadas das CTE (ODORICO et al., 2001). Estudos em modelos animais já demonstraram que a transferência de células derivadas de CTE pode tratar com sucesso doenças crônicas semelhantes às humanas, em modelos experimentais (McDONALD et al., 1999; SORIA et al., 2000).

O primeiro passo para o desenvolvimento de terapias celulares eficazes para doenças humanas seria o estabelecimento de protocolos de diferenciação *in vitro* e purificação destas células da população total. Infelizmente, a natureza heterogênia da diferenciação celular no cultivo *in vitro* tem dificultado o uso das células derivadas de CTE em estudos de transplante (ODORICO et al., 2001).

Raramente fatores de crescimento ou condições de cultivo *in vitro* específicas levaram ao estabelecimento de cultivos contendo apenas um tipo celular (SCHULDINER et al., 2000). Ainda, observa-se uma variação significativa de cultivo para cultivo com relação ao desenvolvimento de um fenótipo particular, mesmo sob condições idênticas (ODORICO et al., 2001).

3.1.3 Desenvolvimento embrionário inicial

Em estádios iniciais do desenvolvimento embrionário murino, a massa celular interna prolifera-se rapidamente e se diferencia para dar origem a uma população de células pluripotentes conhecidas como ectoderma primitivo (KELLER, 2005). Logo após a implantação, a maioria das células internas do ectoderma primitivo sofre apoptose e forma uma cavidade por um processo denominado cavitação (COUCOUVANIS e MARTIN, 1995). As células sobreviventes que envolvem a cavidade se diferenciam para formar um epitélio colunar pseudo-estratificado, que origina uma estrutura denominada epiblasto.

Embora as células do ectoderma primitivo e epiblasto mantenham sua pluripotência, as mesmas podem ser distinguidas das células da MCI, pois apresentam aumento na expressão de *Fgf5* (HAUB e GOLDFARB 1991) e diminuição na expressão de *Rex1* (ROGERS et al., 1991); e pelo fato de que elas não mais contribuem para a formação de quimeras seguindo a injeção das mesmas em blastocistos receptores (ROSSANT, 1977). O epiblasto responde a sinais extrínsecos e origina os folhetos germinativos primordiais (GINSBURG et al., 1990).

Os folhetos germinativos primários são formados no embrião durante o processo de gastrulação, que se inicia aproximadamente no dia embrionário 6,5 no camundongo (TAM e BEHINGER, 1997). No momento da gastrulação, as células epiblasticas da região que formarão a parte posterior do embrião intumescem-se e formam uma estrutura transiente conhecida como linha primitiva ou sulco primitivo.

Durante a gastrulação, as células epiblasticas penetram a linha primitiva e passam por uma transição epitelial-mesenquimal, dando origem ao mesoderma e

ao endoderma definitivo. O desenvolvimento de subpopulações de mesoderma e endoderma não ocorre ao acaso, mas parece ser controlado temporal e espacialmente (KINDER et al., 2000).

As primeiras células mesodérmicas a se desenvolverem são derivadas de células epiblasticas que se movem pela região mais posterior da linha. Este mesoderma coloniza o saco vitelínico em desenvolvimento e dá origem a células hematopoiéticas e vasculares das ilhotas sanguíneas. Células epiblasticas que penetram a linha um pouco mais tarde e numa posição anterior formarão o mesoderma cardíaco, mesênquima da cabeça, e mesoderma paraxial, enquanto as células epiblasticas que se movem pela região mais anterior da linha primitiva darão origem ao endoderma e mesoderma axial, que formará a notocorda (TAM e BEHINGER, 1997).

Células da região mais anterior do epiblasto que não se movem pela linha primitiva formarão o ectoderma. Enquanto os mecanismos de controle de migração epiblastica e indução mesodérmica e endodérmica não são totalmente entendidos no camundongo, análises de expressão gênica e experimentos de *gene targeting* demonstraram que membros da família *TGF β* incluindo *BMP4* (HOGAN, 1996) e *Nodal* (CONLON et al., 1994) tem funções importantes nestes processos.

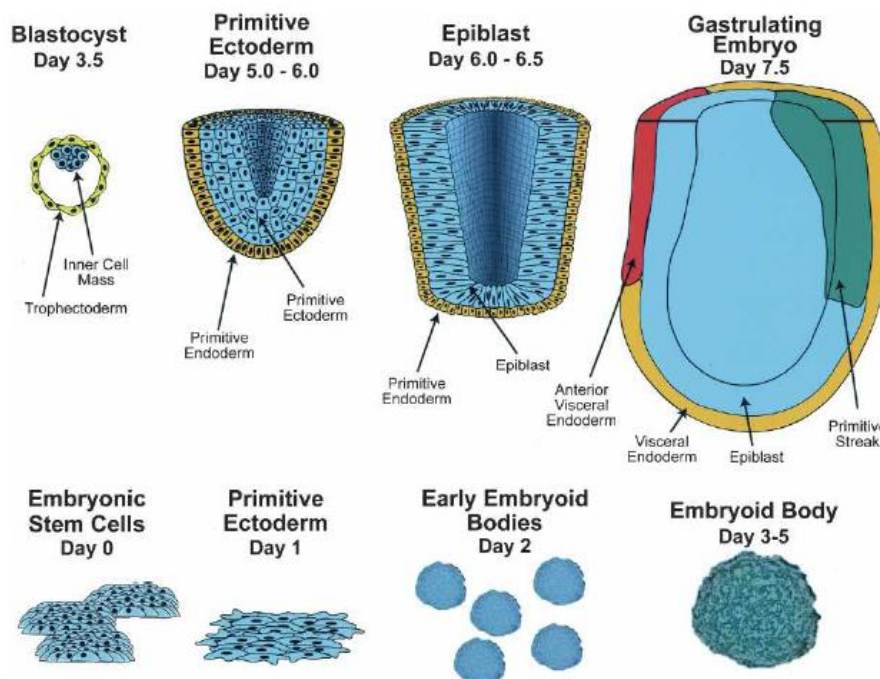


FIGURA 1 Modelo comparativo dos estádios iniciais do desenvolvimento embrionário e de CTE/CE (KELLER, 2005).

3.1.4 Cultivo de CTE e diferenciação celular

Quando cultivadas *in vitro*, as CTE murinas podem propagar-se indefinidamente no estado indiferenciado, na presença do fator inibidor de leucemia e/ou de uma monocamada de fibroblastos embrionários murinos (SMITH, 1998; WILLIAMS et al., 1988), que consiste em um tapete celular mitoticamente inativado, que desintoxica o meio, representa um ponto de fixação e secreta fatores inibidores da diferenciação celular (ROBERTSON, 1987; NICHOLS et al., 1990).

Estudos nos últimos 26 anos trouxeram o desenvolvimento de condições apropriadas de cultivo e protocolos para a produção de um largo espectro de linhagens diferenciadas *in vitro*, incluindo tipos celulares embrionários e adultos de todos os três folhetos embrionários, como cardiomiócitos (DOETSCHMAN et al., 1985), progenitores hematopoiéticos (DOETSCHMAN et al., 1985), saco vitelínico (DOETSCHMAN et al., 1985), células musculares esqueléticas (BAKER e LYONS,

1996), células musculares lisas (BAKER e LYONS, 1996), adipócitos (POLIARD et al., 1995), condrócitos (POLIARD et al., 1995), osteócitos (POLIARD et al., 1995), neurônios (BAIN et al., 1995), células pancreáticas (SORIA et al., 2000), endoderma primitivo (ABE et al., 1996), entre outros. As CTE murinas não se diferenciam em trofotoderma em cultivo, refletindo o potencial de sua população embrionária originária, a MCI (KELLER, 2005).

Destes experimentos, se torna claro que as CTE induzidas a diferenciar-se em cultivo *in vitro* seguem vários estádios de desenvolvimento cruciais encontrados no embrião normal, e são capazes de dar origem a tipos celulares pós-mitóticos, em estádios terminais do processo de diferenciação, dependendo das condições e de fatores de crescimento particulares (ODORICO et al., 2001).

Três estratégias gerais são utilizadas para iniciar a diferenciação das CTE. A primeira consiste no cultivo em suspensão, permitindo a formação de agregados de colônias tridimensionais de células diferenciadas e indiferenciadas, denominados corpos embrióides (CE), que lembram embriões recém-implantados (DOETSCHMAN et al., 1985). O segundo método seria o cultivo das CTE em células estromais, que regulam a diferenciação pelo contato entre ambas (NAKANO et al., 1994). A terceira estratégia envolve a diferenciação das CTE em monocamada sobre proteínas matrizes extracelulares (NISHIKAWA et al., 1998).

Os corpos embrióides oferecem a vantagem de um sistema tridimensional, numa estrutura que enriquece as interações celulares que podem ser importantes em determinados programas de desenvolvimento. Por outro lado, sua complexidade pode ser uma desvantagem pela produção de citocinas e fatores indutores que podem dificultar interpretações em experimentos (KELLER, 2005).

Infelizmente, os mecanismos indutores precisos que regulam o padrão de formação embrionário ainda estão sendo elucidados e ainda não podem ser reproduzidos confiavelmente *in vitro* (ODORICO et al., 2001). A diferenciação *in vitro* é consistentemente desorganizada, e freqüentemente variável de um corpo embrióide para outro do mesmo cultivo. Características normais de arquitetura tecidual reproduzidas no cultivo de CTE *in vivo* são menos pronunciadas no cultivo

in vitro, como a exibição de polaridade pelo epitélio; o envelopamento do tecido por membrana basal; e o envolvimento por mesênquima, culminando com a formação de tecidos complexos como folículos pilosos, dente, e intestino (ODORICO et al., 2001).

Por outro lado, estudos demonstraram que células derivadas de CTE murinas *in vitro*, como cardiomiócitos e neurônios dopaminérgicos, exibem um fenótipo fisiologicamente maturo, terminalmente diferenciado, e exibem funcionamento fisiológico normal *in vivo* e *in vitro* (BAIN et al., 1995; SORIA et al., 2000; WOBUS et al., 1991).

SCHULDINER et al. (2000) demonstrou que tanto CTE indiferenciadas quanto CE diferenciados expressam receptores para uma série de fatores de crescimento com efeitos estabelecidos em processos do desenvolvimento *in vivo*. A adição de cada um destes fatores ao meio de cultivo alterou o padrão de expressão de uma gama de genes tecido-específicos. No entanto, nenhum dos fatores de crescimento direciona a diferenciação exclusivamente para um tipo celular particular. Desta forma, um melhor entendimento dos eventos epigenéticos que regulam o comprometimento celular com uma linhagem e sua diferenciação, devem permitir o uso focado de fatores de crescimento solúveis para atingir-se uma diferenciação linhagem-restrita (ODORICO et al., 2001).

3.1.4.1 Linhagens derivadas do mesoderma

As linhagens derivadas do mesoderma incluem linhagens hematopoiéticas, vasculares e cardíacas, e estão entre as mais facilmente derivadas das CTE. Têm sido estudadas minuciosamente e, das mesmas, o desenvolvimento hematopoiético é o melhor caracterizado (KELLER, 2005). Ainda, foi demonstrado o potencial *in vitro* das CTE em diferenciar-se em músculo esquelético (BAKER e LYONS, 1996), tecido osteogênico (POLIARD et al., 1995), condrogênico (POLIARD et al., 1995) e adipogênico (POLIARD et al., 1995).

3.1.4.1.1 Diferenciação de células musculares estriadas cardíacas

Células murinas de carcinoma embrionário (SKERJANC, 1999), células tronco germinativas (ROHWEDEL et al., 1996) e CTE (DOETSCHMAN et al., 1985) já foram utilizadas para originar células musculares estriadas cardíacas *in vitro*.

Alguns parâmetros influenciam especificamente o potencial de diferenciação das CTE em cardiomiócitos *in vitro*: o número inicial de células no CE; o meio de cultivo, SFB e suplementos, como fatores de crescimento e aditivos; linhas celulares; e o tempo de plaqueamento do CE (WOBUS et al., 2002).

No CE em desenvolvimento, os cardiomiócitos estão localizados entre a camada epitelial e basal das células mesenquimais (HESCHELER et al., 1997). São facilmente detectáveis pelo aparecimento de focos de células contráteis que apresentam características de cardiomiócitos, dentro de 1 a 4 dias após o plaqueamento dos CE. Conforme a diferenciação celular progride, o número de focos contráteis aumenta, e a taxa de contração em cada CE também aumenta rapidamente, seguindo-se uma diminuição na média de pulsações com a maturação celular (BOHELER et al., 2002).

A maturação da linhagem nos cultivos está associada a modificações no tamanho e formato das células, que progridem de pequenas e arredondadas no estágio inicial, para células alongadas com sarcômeros e miofibrilas bem desenvolvidos (BOHELER et al., 2002). Aferições eletrofisiológicas de células em diferentes tempos de cultivo sugerem que a população de cardiomiócitos se modifique de estádios iniciais, com atividade tipo *pace-maker*, para células terminalmente diferenciadas, atriais e ventriculares (MALTSEV et al., 1993). Tais modificações se correlacionam com mudanças observadas na morfologia celular, característica de cada tipo celular. Cardiomiócitos terminalmente diferenciados normalmente param de contrair, mas podem ser mantidos em cultivo por várias semanas (HESCHELER et al., 1997).

Proteínas sarcoméricas dos cardiomiócitos derivados de CTE se estabelecem ao longo do desenvolvimento, em função do tempo de diferenciação, semelhantemente ao desenvolvimento miocárdico normal, na seguinte ordem: titina

(disco Z), α -actinina, miomesina, titina (banda M), MHC, α -actina, troponina cardíaca T, e proteína M (BOHELER e WOBUS, 2002). Cardiomiócitos com características semelhantes às de fetos ou neonatos roedores expressam isoformas da troponina I de músculo esquelético lento, enquanto cardiomiócitos que contraem mais rapidamente expressam preferencialmente a troponina I cardíaca.

Um padrão de expressão de genes cardíacos ordenado é observado nos cultivos em diferenciação, com expressão dos fatores de transcrição *Gata-4* e *Nkx2.5*, que são requeridos para o desenvolvimento da linhagem, precedendo a expressão de genes como *atrial natriuretic protein (ANP)*, *myosin light chain (MLC)-2v*, *α -myosin heavy chain (α -MHC)*, *β -myosin heavy chain (β -MHC)*, e *conexin 43*, que são indicativos de estádios distintos de maturação da organogênese *in vivo* (HESCHELER et al., 1997).

A acetilação das histonas está envolvida na diferenciação de células musculares estriadas. As HDAC classe II são altamente expressas no músculo esquelético e cardíaco (revisado por FISCHLE et al., 2001), e interagem com fatores enriquecedores de miócitos 2 (MEF2s) inativando-os. Por isso, são utilizadas clinicamente para reprimir a hipertrofia cardíaca, sendo a atividade repressora das HDAC classe II sobre a cardiomiogênese conhecida clinicamente.

Estudos demonstram que o tratamento de células P19 com TSA induz a entrada de células da linhagem mesodérmica na linhagem muscular cardíaca de forma dose-dependente, demonstrada pelo aumento dos transcritos *Nkx-2*, *MEF2C*, *GATA4* e actina cardíaca (KARAMBOULAS et al., 2006). Os autores sugerem que as HDAC4 regulam a especificação de células mesodérmicas em cardiomiócitos por inibirem a expressão de *GATA4* e *Nkx2-5*. Portanto, o aumento da expressão de HDAC4 inibe a cardiomiogênese, diminuindo a expressão de genes relacionados ao músculo cardíaco. Desta forma, o bloqueio da atividade das HDAC pela TSA é suficiente para aumentar a cardiomiogênese no estágio inicial.

Embora muitos dos fatores que regulam o desenvolvimento cardíaco das CTE tenham sido identificados, o estágio preciso no qual eles agem e suas

relações uns com os outros ainda permanecem por ser elucidados. Ainda, os estudos deste tipo celular são realizados em cultivos heterogêneos de CTE em diferenciação, nos quais os cardiomiócitos representam uma minoria da população como um todo (KAWAI et al., 2004).

3.1.4.2 Linhagens derivadas do endoderma

Os tecidos de maior interesse derivados deste folheto embrionário consistem em células â-pancreáticas e hepatócitos, devido a sua potencial aplicação para o tratamento de diabetes tipo 1 e doenças hepáticas, respectivamente (ODORICO et al., 2001).

Pouco progresso tem sido obtido nesta área, devido a fatores como o fato de vários genes marcadores utilizados para endoderma definitivo, fígado inicial e pâncreas inicial também serem expressos em endoderma visceral, e uma população de células endodérmicas extra-embrionária, que funciona em caráter regulatório mas não contribui diretamente para a formação de qualquer órgão adulto. (GARDNER e ROSSANT, 1979).

Outra dificuldade encontrada é a falta de indutores específicos desta linhagem (KUBO et al. 2004). Além disso, linhagens endodérmicas, como pâncreas e fígado, são morfologicamente menos distintas e mais difíceis de discernir em cultivos de CTE do que células sanguíneas ou cardíacas (ODORICO et al., 2001). Esse é um dos fatores que inibe sua detecção entre a progênie de CTE.

Apesar de tais obstáculos, já foi demonstrado que CTE murinas são capazes de ativar genes pancreáticos e endodérmicos *in vivo* e *in vitro* (ABE et al., 1996; GOSSLER et al., 1989).

Portanto, evidências de tipos celulares oriundos deste folheto estão presentes, como células pancreáticas (SORIA et al., 2000), hepatócitos (HAMAZAKI et al., 2001), tirócitos (LIN et al., 2003), células pulmonares (ALI et al., 2002), e células intestinais (YAMADA et al., 2002).

3.1.4.3 Linhagens derivadas do ectoderma

A diferenciação ectodérmica de CTE murinas é bem estabelecida, com numerosos estudos documentando e caracterizando o comprometimento neuroectodérmico e a diferenciação neural. Uma das grandes expectativas de utilidade clínica da terapia celular reside em doenças neurodegenerativas, como a substituição de neurônios dopaminérgicos em pacientes que sofrem do mal de Parkinson.

3.1.4.3.1 Diferenciação de células neurais

Diversos protocolos foram desenvolvidos, como o tratamento de corpos embrióides estimulados com SFB e ácido retinóico (BAIN et al., 1995), cultivo seqüencial de corpos embrióides em SFB seguido de meio livre de SFB (OKABE et al., 1996), diferenciação de CTE em monocamada em meio livre de SFB (TROPEPE et al., 2001), e diferenciação de CTE diretamente em células estromais na ausência de SFB (KAWASAKI et al., 2000).

Da mesma forma que nas linhagens mesodérmica e endodérmica, o desenvolvimento de linhagens ectodérmicas na diferenciação de CTE parece recapitular seu desenvolvimento no embrião inicial (BARBERI et al., 2003).

O comprometimento neuroectodérmico parece ser rápido e eficiente, pois a maioria das células que se desenvolvem nestes cultivos apresenta características de células neurais. Os três principais tipos celulares neurais do sistema nervoso central podem ser derivados: neurônios, astrócitos e oligodendrócitos (OKABE et al., 1996). Além da possibilidade de derivação de neurônios, alguns protocolos buscam com sucesso a derivação de subtipos específicos, como neurônios dopaminérgicos (KIM et al., 2002), colinérgicos, serotoninérgicos e GABAérgicos (BARBERI et al., 2003).

O modelo de CTE tem sido utilizado para investigar estádios iniciais de desenvolvimento neural. Quando cultivadas em baixa densidade em meio livre de SFB e na presença de LIF, as CTE originam uma população denominada células tronco primitivas neurais (TROPEPE et al., 2001). Tais células foram caracterizadas por sua habilidade em gerar colônias semelhantes à neuroesferas,

compostas de células que expressam o marcador nestina, característico de precursores neurais (LENDAHL et al., 1990).

Irx3, *Msx1* e *Nkx2.9* são exemplos de fatores de transcrição expressos na subespecificação de progenitores neurais (JESSELL, 2000), e *Pax3* e *Pax6* são expressos em progenitores no tubo neural embrionário (WALTHER e GRUSS, 1991; GOULDING et al., 1991); quando terminantemente diferenciados, neurônios pós-mitóticos exibem o fator de transcrição NeuroD (PERRY et al., 2004).

Estudos demonstram que a desacetilação de histonas está envolvida com a repressão de genes neuronais em células que seguem especificações diferentes dos neurônios; as HDAC 1 e 2 se combinam com os co-repressores CoREST, N-CoR e mSin3A e são recrutados pelo REST (também conhecido como NRSF - *neuron-restrictive silencer factor*) (CHONG et al., 1995). O REST bloqueia a transcrição de genes neuronais se ligando ao NRSE - *neuron-restrictive silencer element* -, presente em regiões regulatórias de vários genes neuronais. Desta forma, a acetilação das histonas inibe a atuação do REST, e anula este bloqueio na diferenciação neuronal.

Além disso, o fator de transcrição neurogênico (NeuroD – *neurogenic differentiation transcription factor*) se mostrou aumentado em estudos utilizando células progenitoras do hipocampo de ratos adultos, mediante o tratamento com inibidores de HDACs, culminando com a diferenciação neuronal (HSIEH et al., 2004). O aumento da população de neurônios após tratamento com TSA ocorre pela diminuição da população de astrócitos diferenciados, segundo observações de Marin-Husstege et al. (2002), que descrevem a atividade das HDAC como necessária para a progressão de células progenitoras iniciais de oligodendrócitos em células maduras.

Além da diferenciação neuroectodérmica, as CTE podem dar origem a células epiteliais, fenômeno que parece ser controlado por BMP4, que quando adicionado ao meio de cultivo parece estimular o desenvolvimento epitelial e inibir a diferenciação neural (KAWASAKI et al., 2000). Ainda, células germinativas já foram obtidas a partir da diferenciação de CTE, culminando com a formação de

estruturas semelhantes à oócitos e espermatogônias (HUBNER et al., 2003; TOYOOKA et al., 2003).

3.2 Regulação da expressão gênica em CTE

3.2.1 Epigenética

O desenvolvimento do organismo de um mamífero requer o estabelecimento de centenas de tipos celulares diferentes, derivados a partir de uma célula totipotente indiferenciada. Para tanto, cada célula diferenciada possui o mesmo material genético, mas apresenta um padrão de expressão gênica específico, que é atingido pelo silenciamento gênico e pela ativação de determinados genes tecido-específicos (LI, 2002).

Este mecanismo de diversificação na expressão de genes contidos na mesma fita de DNA pode ser explicado graças à epigenética. Esta forma de herança, baseada não na sequência de DNA, mas sim na organização da cromatina celular, permite a modulação das atividades de expressão gênica em resposta a sinais externos (ZHAO et al., 2008).

Nas células eucarióticas, aproximadamente 6 milhões de pares de bases de DNA estão presentes, que codificam em torno de 30.000 proteínas diferentes. No entanto, a maior parte da fita de DNA permanece armazenada, sob uma forma de organização de cromatina compactada que dificulta ou impossibilita a transcrição de genes (GOODSELL, 2003). Desta forma, apenas uma parte do DNA é utilizado para expressão de genes em cada tecido.

Esta organização da cromatina é estabelecida por modificações epigenéticas que incluem: a metilação do DNA, modificações pós-traducionais das histonas, o remodelamento da cromatina e os RNAs não codificantes (BERNSTEIN e ALLIS, 2005). No desenvolvimento de mamíferos e estabelecimento de linhagens, a metilação do DNA e as modificações pós-traducionais de histonas são processos que vem sendo consistentemente estudados (LI, 2002).

O DNA das células eucarióticas é disposto em uma estrutura altamente organizada denominada cromatina, na qual o nucleossomo consiste na unidade

básica. O nucleossomo é composto por 147 pares de base de DNA organizados ao redor de quatro proteínas histonas centrais: H2A, H2B, H3 e H4 (VAN HOLDE, 1988).

Cada histona apresenta um domínio global, e um domínio caudal longo e flexível, que se estende além do nucleossomo, e que pode ser modificado pela adição de grupamentos acetil, fosfato, metil, entre outros (GOODSELL, 2003).

Tais modificações covalentes têm funções fundamentais na condensação da cromatina, replicação, reparo do DNA, e regulação transcricional. Algumas destas modificações são associadas à eucromatina (acetil-lisina9, mono-, di- e tri-metil lisina 4 na histona H3 e histona h4 acetilada) e outras são associadas à heterocromatina (mono-,di-, tri-metil lisina 9 e tri-metil lisina 27 na H3) (KOUZARIDES, 2007).

Entre estas modificações pós-traducionais, a acetilação e a metilação são as mais estudadas. A acetilação das histonas está relacionada a domínios genômicos transcripcionalmente ativos, e o grau de modificação se correlaciona com o nível de transcrição (SCHUBELER et al., 2004); já a metilação das histonas pode ter diferentes efeitos na expressão gênica, dependendo de qual resíduo está modificado (MARTIN e ZHANG, 2005). Modificações *locus*-específicas em histonas são propostas para a descrição de um código que define o estado transcripcional potencial de uma célula – o código das histonas (revisado por TURNER, 2002).

Quando modificações pós-traducionais das histonas são bloqueadas, o desenvolvimento adequado não ocorre. Um exemplo consiste na mutação da enzima histona desacetilase-1 em camundongos, que provoca letalidade embrionária no dia 10,5 (LAGGER et al., 2002). Da mesma forma, a depleção de genes responsáveis pela metilação da lisina 9 da histona H3, pela *de novo* metilação ou pela manutenção da metilação também resultam em morte embrionária (TACHIBANA et al., 2002; OKANO et al., 1999; LEI et al., 1996).

O mecanismo adotado pelas modificações de histonas para regular a transcrição e organização da cromatina não está claramente definido. Uma hipótese plausível é que fatores epigenéticos, incluindo enzimas modificadoras e

fatores remodeladores, poderiam potencialmente induzir a cromatina a mediar interações *cis* e *trans* (YANG e KURODA, 2007). Mudanças de conformação poderiam até ser mediadas por complexos protéicos específicos recrutados por tais modificações. Estas interações causariam mudanças estruturais do relacionado DNA e cromatinas, alterando propriedades físicas das cromatinas e afetando suas estruturas de ordem maior. Desta forma, poderiam ter consequências em vários aspectos das funções genômicas (XU et al., 2006). Portanto, a organização nuclear e as interações espaciais e suas implicações nos processos epigenéticos estão emergindo como um mecanismo de regulação gênica (YANG e KURODA, 2007).

A diferenciação de CTE consiste em um excelente modelo para o estudo de modificações na cromatina durante o estabelecimento de linhagens celulares, em regiões do DNA reguladas ao longo do desenvolvimento (GOLOB et al., 2008). Neste período, os níveis de transcrição de diversos genes são fortemente alterados de forma temporal, e modificações pós-traducionais nas histonas são creditadas por participar na regulação da expressão gênica local e global (HUEBERT e BERNSTEIN, 2005).

Quando pluripotentes, as CTE apresentam domínios de cromatina com caudas de histonas apresentando modificações tanto transcripcionalmente ativas quanto inativas (BERNSTEIN et al., 2006). A arquitetura nuclear se apresenta globalmente descondensada e a condensação ocorre novamente durante a diferenciação, quando os níveis de acetilação das histonas H3 e H4 diminuem e a metilação da lisina 9 na histona H3 aumenta (MESHORER e MISTELI, 2006).

Ao examinar-se genes específicos, foi observado que regiões de genes relacionados ao estado pluripotente, como *Oct4*, *Nanog*, *Utf1*, *Foxd3*, *Cripto* e *Rex1* apresentam maior acessibilidade nas células indiferenciadas, e estão associadas à cromatina condensada após a diferenciação. Ao contrário, genes tecido-específicos como *Pax3*, *Pax6*, *Irx3*, *Nkx2.9* e *Mash1* no caso de comprometimento neural, se apresentam transcripcionalmente inativos nas células pluripotentes e são ativados após a diferenciação de forma tecido-específica (PERRY et al., 2004).

3.2.1.1 Acetilação de histonas

A acetilação das histonas, ou mais precisamente de seus aminoácidos lisina, faz com que a carga positiva das mesmas seja neutralizada, e ocorra o enfraquecimento da interação da cauda da histona com o DNA local carregado negativamente, induzindo abertura local das estruturas da cromatina (ZUPKOVITZ et al., 2006). Desta forma, o DNA local é exposto, aumentando o acesso de fatores de transcrição e promovendo aumentos significativos na transcrição gênica (VERDONE et al., 2005).

Duas enzimas controlam a acetilação. A histona acetil-transferase adiciona grupamentos acetil à cauda da histona, neutralizando-a e enfraquecendo sua ligação com os nucleossomos. A histona desacetilase (HDAC), ao contrário, remove grupamentos acetil e causa compactação da cromatina e silenciamento do segmento de DNA neste local (JOHNSTONE, 2002).

Na última década, mais de uma dúzia de HDACs foram identificadas nas células de mamíferos. Baseado em suas semelhanças seqüenciais, as HDACs foram divididas em 4 classes funcionais: classe I (HDAC1, HDAC2, HDAC3 e HDAC8), classe II (HDAC4, HDAC5, HDAC6, HDAC7, HDAC9 e HDAC10), classe III (SIRT1 a SIRT7), e classe IV (HDAC11 e enzimas relacionadas) (GROZINGER e SCHREIBER, 2002).

Em células de camundongo, a expressão do gene HDAC1 é estimulada por fatores de crescimento (BARTL et al., 1997) e controlada por seu próprio produto, por mecanismo de feedback negativo (HAUSER et al., 2002). A HDAC1 tem um importante papel em diversos processos biológicos, como a progressão do ciclo celular, a proliferação celular e a diferenciação, sendo essencial para o desenvolvimento embrionário normal. O camundongo *knock-out* HDAC1 também revelou a função essencial desta enzima no desenvolvimento embrionário (LAGGER et al., 2002).

A tricostatina A é uma molécula que inibe as enzimas histona desacetilases em concentrações nano molares, agindo sobre a maioria das HDACs de classe I e II (ZUPKOVITZ et al., 2006). Estudos de cristalografia indicam que a droga se

encaixa no sítio catalítico da enzima, que possui uma estrutura tubular com íon zinco em sua base (MARKS et al., 2001). Assim, a droga promove uma hiperacetilação do DNA, que se torna excessivamente ativo na produção de proteínas. Em células tumorais, normalmente este evento induz a diferenciação das mesmas, que se modificam para células que não mais se proliferam (MARKS et al., 2001). Em alguns casos, a hiperacetilação das histonas pode levar a parada no ciclo celular, parada no crescimento ou até induzir a apoptose (GOODSELL, 2003). No entanto, pouco se conhece sobre as funções individuais das desacetilases de mamíferos no controle transcripcional e as enzimas alvo relevantes para os inibidores HDAC como drogas antitumorais (ZUPKOVITZ et al., 2006).

O tratamento com a tricostatina A tem sido utilizado para avaliar os efeitos da acetilação das histonas na expressão gênica antes e após a diferenciação celular, buscando a identificação dos eventos moleculares que regulam a perda do estado indiferenciado e o comprometimento com linhagens específicas (LEE et al., 2004; MCCOOL et al., 2007; HATTORI et al., 2004; HOSSEINKHANI et al., 2007; BAQIR e SMITH, 2006; GREGORY et al., 2002).

4 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram desenvolvidos nos laboratórios do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, *Campus* de Jaboticabal.

Avaliamos a capacidade da linhagem H106 de células tronco embrionárias murinas (CTEm) em diferenciar-se em tipos celulares oriundos folhetos embrionários endodérmico, mesodérmico e ectodérmico, com o intuito de comprovar sua pluripotência. Posteriormente, estudamos os efeitos da droga modificadora epigenética tricostatina A (TSA) na acetilação de histonas H3 e na diferenciação celular das CTEm, em períodos iniciais e avançados, em tipos celulares oriundos dos folhetos embrionários mesodérmico e ectodérmico.

A linhagem H106 foi obtida em projetos anteriores (GARCIA e SMITH, 1998) e se encontrava estocada em criotubos imersos em nitrogênio líquido.

O cultivo de CTE foi realizado em três etapas, que compreenderam o cultivo de CTE pluripotentes (d-9 a d0), para expansão das células; o cultivo em suspensão (d0 a d5), para diferenciação inicial das CTE; e o cultivo aderente (d5 a d22), para desenvolvimento das estruturas diferenciadas.

A descrição dos suplementos utilizados encontra-se no Apêndice A.

4.1 Cultivo de CTE pluripotentes

O cronograma de cultivo de CTE pluripotentes está descrito na Figura 2.

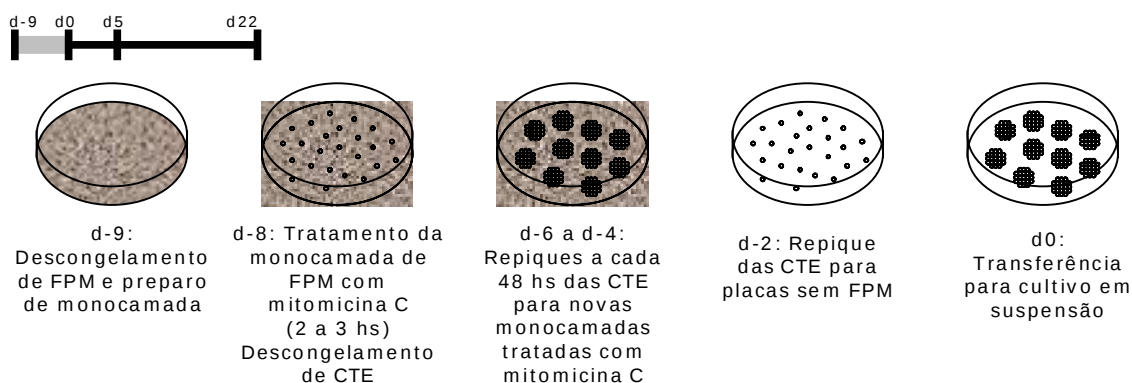


FIGURA 2 Esquema cronológico de cultivo das CTE pluripotentes.

4.1.1 Descongelamento dos fibroblastos primários murinos (FPM)

Placas de poliestireno de 35 ou 60mm de diâmetro eram banhadas com solução de gelatina de pele de suíno (SIGMA Cat. G-1890) a 0,1% em PBS-L, deixando-as em repouso sob refrigeração (4°C) por 30 minutos. Decorrido este período, o excesso de gelatina era removido, deixando-se a tampa da placa levemente aberta no interior do fluxo laminar para a secagem da gelatina e formação de uma película de adesão para posterior semeio e fixação das células.

Os criotubos contendo os fibroblastos eram descongelados em água a 37°C, por 2 minutos. Após, seu conteúdo era depositado em tubo cônico de 15mL, preenchido com 2mL de meio DMEM FPM (Item A.2, Apêndice A), e o tubo era centrifugado por 5 minutos a 1800 RPM. O conteúdo do tubo era retirado com pipeta *Pasteur* acoplada à bomba de vácuo, restando apenas o *pellet* de células na base do tubo. O *pellet* era então ressuspensionado em 5mL de meio DMEM FPM. Este procedimento é necessário para retirar-se o crioprotetor (DMSO) presente no meio de congelamento das células, por sua toxicidade.

Parte da suspensão era depositada em uma placa de poliestireno de 60mm, pré-tratada com gelatina de suíno 0,1%, e o restante era transferido para uma garrafa de cultivo pequena. Ambas eram incubadas em estufa de CO₂ (37°C e 5% de CO₂).

Após 24 horas o meio era removido e adicionado meio DMEM FPM fresco. As trocas subsequentes de meio eram realizadas a cada 48 a 72 horas.

4.1.2 Preparo de monocamada mitoticamente inativada

A mitomicina C é um antibiótico produzido por *Streptomyces caespitosus*. Atua inibindo a síntese de ácidos nucleicos, e a replicação do DNA; reage covalentemente formando pontes entre fitas de DNA complementares. Tal interação impede a separação das fitas de DNA complementares, promovendo parada de ciclo celular (UEDA e KOMANO, 1984).

No dia seguinte à descongelamento dos FPM, o meio da placa de 60mm era removido e 2mL de solução de mitomicina C (Item A.13, Apêndice A) era

adicionado, e permanecia em estufa por 2 a 3 horas. Após este tempo, a solução de mitomicina C era removida e a placa lavada por duas vezes com PBS-L (Item A.9, Apêndice A), e uma vez com meio DMEM FPM. As células tratadas eram imediatamente utilizadas ou permaneciam em estufa por até uma semana, para posterior uso.

O tratamento da monocamada de FPM com mitomicina-C promove inativação mitótica da mesma, e desta forma os FPM podem ser eliminados do cultivo de CTE em algumas passagens.

No momento do tratamento com mitomicina C, as monocamadas de células apresentavam a concentração de aproximadamente:

- 600×10^3 células (para placas de 35mm);
- $1,2 \times 10^6$ células (para placas de 60mm);
- $1,7 \times 10^6$ células (para placas de 100mm).

4.1.3 Descongelamento das CTE

As CTE da linhagem H106 foram obtidas em experimentos anteriores (GARCIA e SMITH, 1998). Foram isoladas a partir da MCI de blastocistos, obtidos pelo cruzamento de fêmeas NZB e machos C57/Bl.6. Os blastocistos foram colhidos 3.5 dias após o coito, por lavagem uterina, e dissecados em microscópio estereoscópio para separação da MCI. Posteriormente, a mesma foi cultivada em monocamada de FPM inativada e após sucessivos repiques, as CTE foram congeladas e estocadas em criotubos.

As CTE eram descongeladas da mesma maneira que os fibroblastos, porém ressuspensas em meio DMEM CTE (Item A.3, Apêndice A). O conteúdo de cada criotubo era distribuído em uma placa de 60mm contendo monocamada de FPM inativados.

4.1.4 Repique celular

O procedimento de repique era semelhante para os FPM e para as CTE. As garrafas ou placas, respectivamente, eram manipuladas em fluxo laminar, onde o meio era removido com pipeta *Pasteur* acoplada à bomba de vácuo, e realizava-se a lavagem das placas com PBS-L por duas vezes.

Para a remoção das células, era adicionada solução de tripsina 0,025% (Item A.11, Apêndice A) em volume adequado ao tamanho da garrafa (1mL para garrafas pequenas e placas de 60mm), sendo acompanhado o processo de desagregação e desprendimento celular por microscopia óptica em microscópio invertido (aumento de 100 ou 200 vezes) aproximadamente por 2 minutos. Quando ocorria o desprendimento de aproximadamente 80 a 90% das células, a tripsina era neutralizada pela adição de meio DMEM contendo soro, numa proporção de no mínimo 1:1, e as células eram sucessivamente pipetadas até o total desprendimento da camada celular.

A seguir, a suspensão celular era colocada em um tubo cônico de 15mL e centrifugada por 5 minutos a 1800 RPM. O sobrenadante era desprezado e o sedimento ressuspenso no meio adequado, em volume apropriado ao tamanho das garrafas ou placas a serem utilizadas.

No dia seguinte ao repique dos FPM para três placas de 60mm, as mesmas eram tratadas com mitomicina C para inativação. Posteriormente, as CTE eram repicadas para estas novas placas.

4.1.5 Cultivo das CTE na ausência de FPM

Dois dias após o repique, as CTE eram novamente tripsinizadas e o conteúdo de seis placas era transferido para 12 placas de 60mm pré-tratadas com gelatina de suíno 0,1%, sem FPM. Este procedimento visava purificar as CTE, uma vez que os FPM inativados não se proliferavam e senesciam até que as CTE fossem transferidas para o cultivo em suspensão.

Os FPM e as CTE não utilizadas eram congelados para posterior uso.

4.1.6 Congelação

Após tripsinização e centrifugação conforme processo de repique celular, o *pellet* era ressuspensionado em meio de congelação (Item A.8, Apêndice A). A concentração era ajustada, através da contagem em câmara de Neubauer, para 1×10^6 células/mL.

Após a identificação dos criotubos e prévia refrigeração (4°C), 1mL da suspensão contendo as células era depositado em cada criotubo. Os criotubos eram depositados na posição vertical em um recipiente de isopor que era levado ao freezer -80° C, onde permaneciam por uma noite, sendo depois imersos em N₂ líquido e estocados em botijões.

4.2 Cultivo em suspensão para a diferenciação de CTE

Para induzir a diferenciação celular *in vitro*, as CTE eram transferidas por procedimento de tripsinização para cultivo em suspensão, 48 horas após o repique para placas sem FPM. De acordo com o método *Hanging Drop* (HOPFL et al., 2004), o sedimento resultante da centrifugação era ressuspensionado em meio DMEM CTE SFB (Item A.4, Apêndice A), e a concentração de células era determinada por contagem em câmara de *Neubauer* e corrigida para 100.000 células por mL.

Para tanto, o *pellet* era ressuspensionado em 1mL de meio, e 15µL eram utilizados para preencher a câmara. Desta, quatro quadrados grandes eram contados, e o número resultante multiplicado por 2,5 e 1.000 (ajuste da câmara) e dividido por 100.000 (concentração final desejada). O resultado correspondia ao total de meio que deveria diluir o *pellet* no tubo cônico.

Em seguida, aproximadamente 90 gotas de 20µL da suspensão de células eram feitas na parte interna da tampa de uma placa de cultivo celular de poliestireno de 100 mm, e posteriormente as placas eram preenchidas com 15mL de água ultrapura (milli-Q) e fechadas com a tampa, de forma que as gotas contendo as CTE ficavam pendentes (Figura 3). As placas eram incubadas em estufa com temperatura de 37°C e atmosfera de 5% de CO₂ em ar por 4 a 5 dias.

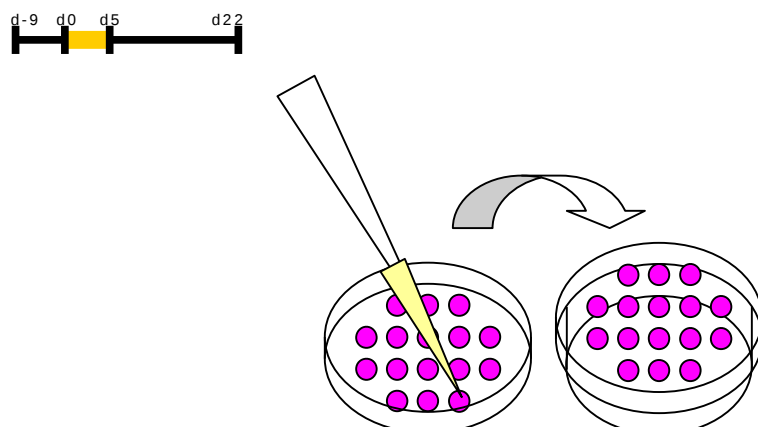


FIGURA 3 Esquema ilustrativo do preparo do cultivo em suspensão *Hanging Drop*.

4.3 Cultivo aderente de corpos embrióides (CE)

Os CE formados eram transferidos para placas de poliestireno de 96 poços, na concentração de uma estrutura por poço (figura 4), e seu desenvolvimento era acompanhado diariamente, observando-se alterações morfológicas decorrentes da diferenciação.

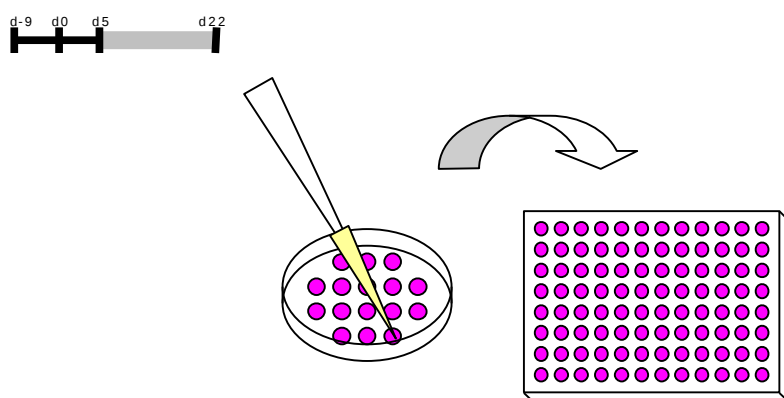


FIGURA 4 Esquema ilustrativo do plaqueamento de CE para início do cultivo aderente.

4.3.1 Troca de meio

Após leve agitação, as garrafas ou placas eram abertas e o meio era aspirado com pipeta *Pasteur* acoplada à bomba de vácuo, seguido pela reposição de meio fresco no volume adequado. Após, as garrafas ou placas eram retornadas à estufa. Todo o procedimento era realizado em fluxo laminar.

Antes de cada troca de meio, as garrafas eram devidamente inspecionadas sob microscopia óptica, no intuito de verificar-se a presença de contaminação bacteriana (aumento de 200 vezes) ou fúngica (aumento de 40 vezes).

4.3.2 Avaliação da presença de focos de células contráteis

A avaliação era realizada entre os dias 14 e 17 após o plaqueamento dos CE. Cada CE era avaliado individualmente, sob microscópio invertido em aumento de 200 vezes.

4.4 Avaliação da presença de proteínas específicas para tipos celulares diferenciados por imunocitoquímica

4.4.1 Anticorpos

A descrição dos anticorpos utilizados e suas diluições encontram-se na Tabela 1.

Oct 3/4: Consiste em um fator de transcrição expresso por células de embriões em estádios iniciais de desenvolvimento e células germinativas. É essencial para a identidade pluripotente, e em células tronco embrionárias sua expressão é necessária para sustentar a capacidade de auto-renovação celular, sendo o aumento ou diminuição de sua expressão responsáveis por divergentes programas de diferenciação (NICHOLS et al., 1998). O oct 3/4 foi avaliado para estimar a pluripotência das colônias antes da indução de diferenciação.

AFP: É expressa no fígado fetal ao longo do desenvolvimento, sendo utilizada como marcador para células edodérmicas (STEFANOVA, 1988).

Desmina: Os filamentos intermediários de citoesqueleto constituem um grupo diverso de proteínas que são expressas de uma maneira tecido-específica. A desmina, um filamento intermediário classe III, é expressa durante o desenvolvimento muscular, e forma ligações entre o disco Z terminal e proteínas associadas à membrana para formar um sistema transmissor (LI et al., 1989). O anticorpo foi utilizado para a detecção de células mesodérmicas em estádios iniciais da diferenciação.

Nestina: É o filamento intermediário predominante nas células progenitoras do sistema nervoso central (LEND AHL et al., 1990). Foi utilizado para a detecção de células ectodérmicas em estádios iniciais de diferenciação.

Troponina I: A actina e a miosina são proteínas altamente conservadas expressas por células eucarióticas. Filamentos de actina são componentes cruciais do aparato contrátil das células musculares. As miosinas interagem com as actinas para gerar a força para diversos movimentos celulares, e a interação das mesmas é facilitada pela proteína cardíaca troponina I, que está envolvida com a regulação da excitação e contração das células musculares cardíacas (PARMACEK e LEIDEN, 1989). A troponina I foi avaliada para estimar a presença de células musculares estriadas nos cultivos de CE.

âIII-Tubulina: Consiste em uma proteína que forma heterodímeros, originando filamentos dos microtúbulos. Está presente em axônios e dendritos de neurônios (HOFFMAN, 1988). O anticorpo foi utilizado para a detecção da proteína em neurônios diferenciados presentes nos cultivos de CE.

AcLys9H3: A lisina 9 consiste em um dos principais locais de inserção de grupamentos acetil, em histonas. O anticorpo utilizado evidenciou os níveis de acetilação em histonas H3, em diferentes fases da diferenciação.

Anticorpos secundários: Permitem a visualização da reação, por se ligarem ao anticorpo primário e apresentarem fluorescência conferida pelo corante Cy3 e FITC.

4.4.2 Preparo das colônias e adição do anticorpo primário

Os corpos embrióides aderidos eram fixados para processamento pela técnica de imunocitoquímica, no dia determinado para cada experimento. Para tanto, o meio de cultivo era retirado com auxílio de bomba de vácuo, as placas eram lavadas com PBS-L por duas vezes, e posteriormente era adicionada solução de paraformaldeído a 4% em PBS por 20 minutos para a fixação das células. As placas eram armazenadas a 4° C por até uma semana.

O protocolo utilizado para a reação de imunocitoquímica foi proposto por REHEN et al. (2006), com modificações. Todas as etapas eram realizadas em câmara úmida protegida de luminosidade.

No momento da reação, as placas eram lavadas mais uma vez com PBS-L, e posteriormente incubadas em câmara úmida por 5 minutos em solução de triton X-100 (Sigma) a 0,5%, para promover aumento de permeabilidade das membranas celulares e permitir a penetração do anticorpo. Após, a solução de triton X-100 era retirada com o auxílio de uma bomba de vácuo, e as placas eram incubadas em câmara úmida com solução de BSA (SIGMA Cat. A-9647) 5% em água milli-Q por uma hora, para promover a neutralização de possíveis anticorpos inespecíficos existentes, evitando resultados falso-positivos.

A solução de BSA era retirada com auxílio de bomba de vácuo e o anticorpo primário adicionado, o qual permanecia por uma noite reagindo com as células. O diluente utilizado em todos os casos foi solução de BSA a 1% em água milli-Q. Foi utilizado o volume de 40µL de anticorpo diluído por poço da placa de 96 poços. As especificações dos anticorpos utilizados encontram-se resumidas na Tabela 1.

TABELA 1 Descrição dos anticorpos utilizados para as reações de imunocitoquímica.

ANTICORPO	ESPECIFICAÇÃO	DILUIÇÃO	FABRICANTE
OCT3/4	Anticorpo monoclonal (IgG _{2b}) produzido em camundongo. Reage com os aminoácidos 1-134 de Oct-4 de humanos, camundongos e ratos.	1:200 (1µg/ml)	Santa Cruz (Cat. SC-5279)
ACLYS9H3	Anticorpo monoclonal (IgG ₁) anti-acetil-histona H3 (lisina9) produzido em camundongo. Reage com aminoácidos 7-20 da lisina9 acetilada da parte n-terminal da histona H3 de humanos, camundongos, ratos, bovinos, aves, anfíbios, <i>Drosophila</i> e <i>C.elegans</i> .	1:100 (2µg/ml)	Sigma (Cat. H0913)
AFP	Anticorpo policlonal (IgG) de coelho. Reage com aminoácidos 171-310 de região interna da AFP de humanos, camundongos e ratos.	1:200 (1µg/ml)	Santa Cruz (Cat. SC-15375)
DESMINA	Anticorpo policlonal (IgG) de coelho. Reage com aminoácidos 15-90 da desmina, na região n-terminal de humanos, camundongos e ratos.	1:200 (1µg/ml)	Santa Cruz (Cat. SC-14026)
NESTINA	Anticorpo policlonal (IgG) de coelho. Reage com aminoácidos 235-320 da nestina de humanos, camundongos e ratos.	1:200 (1µg/ml)	Santa Cruz (Cat. SC-20978)
TROPONINA	Anticorpo policlonal (IgG) de coelho. Reage com aminoácidos 40-210 da troponina I muscular cardíaca de humanos, camundongos e ratos.	1:100 (2µg/ml)	Santa Cruz (Cat. SC-15368)
αIII TUBULINA	Anticorpo monoclonal (IgG ₁) de camundongo. Reage com a região c-terminal da αIII tubulina de humanos e ratos. Reação cruzada com a maioria das espécies de mamíferos.	1:1000 (1µg/ml)	Promega (Cat. G7121)
ANTI-COELHO	Anticorpo IgG (molécula inteira, fração F(ab') ₂) anti-coelho desenvolvido em ovelha, conjugado a Cy3.	1:500 (2µg/ml)	Sigma (Cat. C2306)
ANTI-CDG CY3	Anticorpo IgG (molécula inteira, fração F(ab') ₂) anti-camundongo desenvolvido em ovelha, conjugado a Cy3.	1:1000 (1µg/ml)	Sigma (Cat. C2181)
ANTI-CDG FITC	Anticorpo IgG (balanceado quanto aos isotipos) anti-camundongo desenvolvido em jumento, conjugado a FITC.	1:200 (1µg/ml)	Santa Cruz (Cat. SC2099)

4.4.3 Reação com anticorpo secundário e avaliação da reação

No dia seguinte, o anticorpo primário era retirado e as colônias lavadas 3 vezes com PBS-L. O anticorpo secundário previamente diluído era adicionado e permanecia por duas horas em contato com as colônias, em câmara úmida e protegido da luz. Posteriormente, o anticorpo secundário era retirado e o corante HOECHST 33342 adicionado por 10 minutos, para a coloração do núcleo das células. O HOECHST 33342 era retirado e as colônias lavadas por três vezes com PBS-L.

As placas eram avaliadas sob fluorescência em microscópio óptico invertido Olympus IX-70, para a presença de células positivas, em objetiva de 20x. Os filtros utilizados foram WV (340-380nm) para HOECHST 33342, WG para Cy3 (450-580nm) e WIB para FITC (478-495nm). Em cada placa, foram reservados poços para a realização do controle negativo, nos quais apenas o anticorpo secundário era adicionado.

4.5 Captura e análise das imagens

As placas foram avaliadas sob fluorescência em microscópio óptico invertido Olympus IX-70, sob os filtros WV (340-380nm) para HOECHST 33342, WG para CY3 (450-580nm) e WIB para FITC (478-495nm).

Os experimentos 3(a), 4 e 5 foram realizados utilizando o sistema de captação de imagens *Kontron Elektronik Imaging System (Software KS-300 3.0, Zeiss)*. Para os experimentos 2 e 3(b), as imagens foram capturadas utilizando o *software AxioVision 4.7.1 (Zeiss)*, e a câmera Carl Zeiss AxioCam MRc (Zeiss).

Após a captura das imagens, estas foram processadas no *software AxioVision 4.7.1* para cálculo das áreas dos CE (experimento 2); e no *software ImageJ1.40g (Java Corporation)*, para os demais experimentos.

No programa ImageJ1.4g, as imagens foram transformadas em *8bit* e o programa determinou um *threshold* para as áreas positivas, que foi ajustado manualmente baseado na imagem original. Após, as áreas positivas foram contabilizadas pelo programa, que fornecia o dado percentual de área positiva, que

foi utilizado nos experimentos 2, 3, 4(a) e 5(a). Cada imagem obtida de cada filtro (correspondente ao HOECHST, CY3 ou FITC) foi analisada separadamente.

A partir destes parâmetros, foram gerados os resultados:

- Área de núcleos: utilizada no experimento 2, corresponde à fração de área das imagens onde haviam núcleos (HOECHST 33342).

- Área positiva/área de núcleos: corresponde ao percentual da área positiva (CY3 ou FITC), somado de cada imagem processada, dividido pelo percentual da área dos núcleos (HOECHST 33342), também somada em cada imagem processada. Assim, obtemos uma razão correspondente à relação entre as áreas coradas por CY3 ou FITC e HOECHST, que nos fornece uma idéia da proporção entre a proteína e o total de células.

Exemplos do processamento de imagens pelos software AxioVision 4.0 e ImageJ 1.4 estão dispostos nas Figuras 5 e 6.

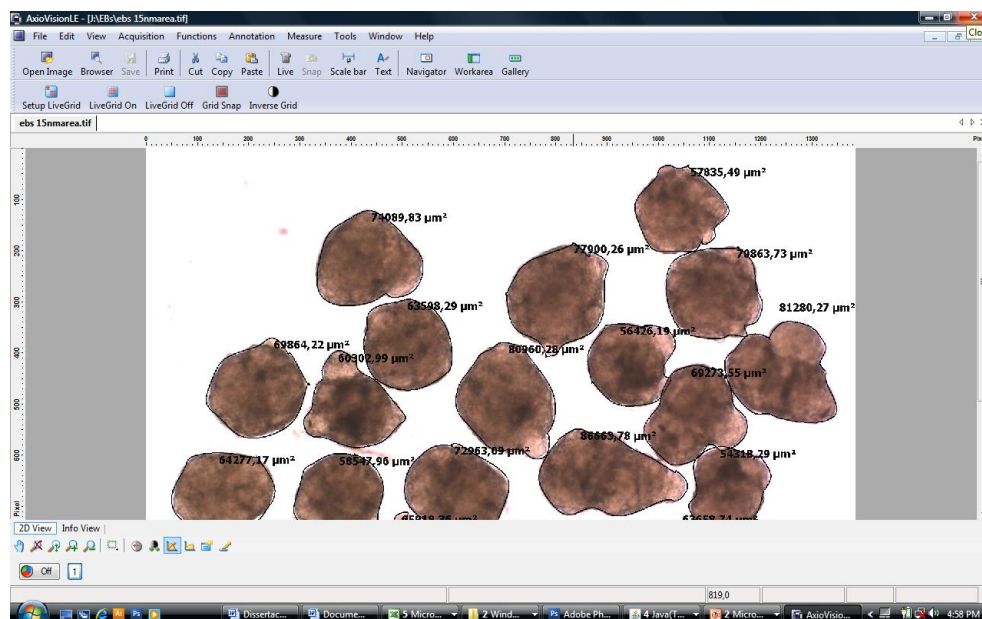


FIGURA 5 Mensuração da área dos CE no *software* AxioVision.

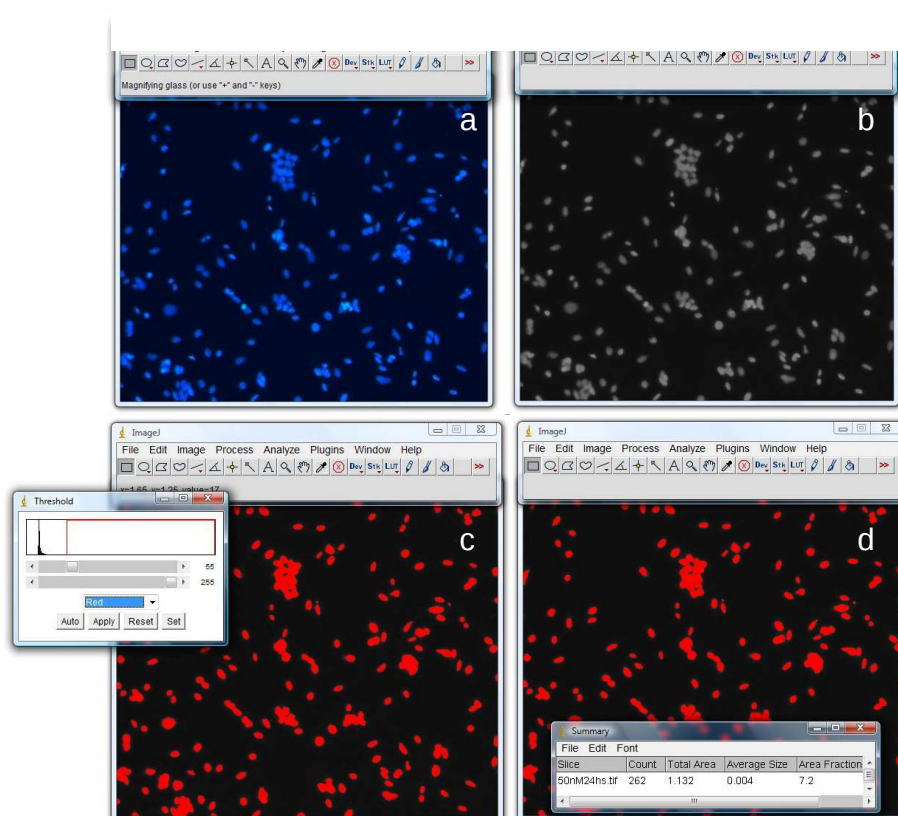


FIGURA 6 Mensuração da área positiva dos cultivos no *software* ImageJ. Imagem original (a); transformação em 8bit (b); determinação do *threshold* (c); dados obtidos após análise (d).

4.6 Delineamento Experimental

4.6.1 Experimento 1: Caracterização *in vitro* da linhagem de CTE H106

O objetivo do presente experimento foi avaliar o padrão de diferenciação espontânea *in vitro* de CTE da linhagem H106. Durante o cultivo pluripotente, reações de imunocitoquímica para Oct 3/4 foram realizadas. Corpos embrióides foram fixados no dia 4, para reações de imunocitoquímica para AFP. Os cultivos em diferenciação foram observados diariamente, buscando-se o aparecimento de tipos celulares morfologicamente distinguíveis, até o dia 33, quando foi realizada a fixação dos cultivos e reações de imunocitoquímica para troponina I e α III tubulina.

4.6.2 Experimento 2: Efeitos da TSA sobre a morte celular e apoptose de CTE em diferenciação

No experimento 2 foram observados os efeitos de diferentes concentrações de TSA em CTE do 5º ao 7º dia e do 13º ao 15º dia de diferenciação, avaliando-se a toxicidade da droga, pelo teste de integridade de membrana; e o percentual de células aderidas em processo de apoptose pelo teste TUNEL.

No 5º dia de cultivo em suspensão, 20 estruturas foram coletadas dos grupos 0nM (controle) e 15nM TSA d0-d5, para captura de imagens e cálculo da área de cada estrutura, a fim de comparar os tamanhos dos CE tratados com os controle. Outras 20 estruturas foram tripsinizadas e a suspensão resultante teve sua população estimada por contagem em câmara de *Neubauer*.

Cada experimento foi realizado em três repetições, com exceção do teste de integridade de membrana (2 repetições). Doze horas anteriormente ao início do tratamento com a droga, os cultivos de cada grupo foram tripsinizados em conjunto, formando uma suspensão de células individualizadas que foi replaqueada.

4.6.2.1 Teste de TUNEL

O protocolo utilizado para o teste de TUNEL (*Terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labeling assay*) foi descrito por PAULA-LOPES e HANSEN, 2002, e sofreu pequenas modificações.

O kit utilizado (*In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein* - ROCHE Applied Science®) detecta quebras duplas e simples na fita de DNA, que ocorrem em estádios iniciais da apoptose. Nele, a enzima TdT catalisa a adição de dUTPs fluorescentes nos pontos de grupamentos 3'-OH livres. Assim, estes pontos podem ser visualizados e as células em processo de apoptose identificadas.

Para a realização do teste, os cultivos foram imersos em solução de triton X-100 (Sigma) a 0,5% em citrato de sódio 0,1% por 30 minutos à temperatura ambiente. Após, o controle positivo era incubado em solução de DNase (50UI/mL de água milli-Q) por 1 hora a 37°C, e os demais cultivos permaneciam em PBS-L.

A mistura enzima e tampão (contidos no kit), na proporção 1:9, era adicionada aos cultivos, por uma hora a 37° C em câmara úmida protegida da luz. O controle negativo era incubado sem a enzima.

Após, os cultivos eram incubados em solução de RNase A (50µg/mL de água milli-Q) por uma hora a temperatura ambiente.

Por último, os cultivos eram corados com HOECHST 33342 por 20 minutos, e lavados três vezes (10 minutos cada) com PBS-L. A visualização da reação era realizada em microscópio óptico invertido Olympus IX-70, para a presença de células positivas – que apresentavam pontos verdes no núcleo –. Os filtros utilizados foram WV (340-380nm) para HOECHST 33342 e WIB para visualização da dUTP fluorescente (478-495nm).

Os grupos avaliados pelo teste de TUNEL estão descritos na Tabela 2.

TABELA 2 Descrição dos grupos propostos para o experimento 2 (TUNEL).

GRUPO	CULTIVO (EM SUSPENSÃO)
0nM (Controle)	DMEM CTE SFB
15nM TSA d0-d5	DMEM TSA 15nM*

GRUPO	CULTIVO 0-24hs
0nM d5 (Controle)	DMEM CTE SFB
0nM d13 (Controle)	DMEM CTE SFB
50nM TSA d5	DMEM TSA 50nM*
50nM TSA d13	DMEM TSA 50nM*
100nM TSA d5	DMEM TSA 100nM*
100nM TSA d13	DMEM TSA 100nM
150nM TSA d5	DMEM TSA 150nM
150nM TSA d13	DMEM TSA 150nM
Controle positivo	H2O

*A diluição da TSA nos meios encontra-se disposta no Item A.5 do Apêndice A.

4.6.2.2 Teste de integridade de membrana

Para a realização desta avaliação, foi utilizado o protocolo de coloração descrito por ZÚCCARI, 1998, com pequenas modificações. Neste teste, dois corantes fluorescentes são utilizados: o diacetato de carboxifluoresceína (DIC) e o iodeto de propídeo (IP). O primeiro cora membranas celulares, e o IP se liga ao núcleo de células mortas, pois não consegue penetrar a membrana de células vivas.

Após tratamento com a TSA, o meio com células mortas em suspensão foi coletado e armazenado em eppendorf. Após, os cultivos foram lavados com PBS-L e tripsinizados, e a suspensão foi adicionada ao eppendorf. O conteúdo foi homogeneizado e adicionou-se 15µL de solução DIC/IP (Item A.21, Apêndice A) a cada amostra. Após 15 minutos as células foram observadas em microscópio de fluorescência, em filtro WV (340-380nm), para contagem de células vivas, coradas pelo DIC, e mortas, coradas por IP.

As concentrações utilizadas estão descritas na Tabela 3, e foram aplicadas a células no 5º e 13º dia de diferenciação.

TABELA 3 Descrição dos grupos propostos para o experimento 2 (Integridade de Membrana).

CONCENTRAÇÕES DE TSA	D5	D13
0nM (Controle)	d5 0nM	d13 0nM
100nM	d5 100nM	d13 100nM
200nM	d5 200nM	d13 200nM
300nM	d5 300nM	d13 300nM
400nM	d5 400nM	d13 400nM
500nM	d5 500nM	d13 500nM
600nM	d5 600nM	d13 600nM
700nM	d5 700nM	d13 700nM
H2O	Controle positivo	-

4.6.3 Experimento 3: Dinâmica da acetilação de histonas H3 em CTE tratadas com TSA

4.6.3.1 Experimento 3(a): Dinâmica da acetilação de histonas H3 em CTE pluripotentes tratadas com TSA

Para a realização deste experimento, CTE foram cultivadas em placas tratadas com gelatina na ausência de FPM, em meio DMEM CTE na presença ou ausência de LIF. Em seguida, CTE foram cultivadas grupos descritos na Tabela 4.

TABELA 4 Descrição dos grupos propostos para o experimento 3(a).

GRUPOS	LIF	MEIO DE CULTIVO 0-24hs	MEIO DE CULTIVO 24-48hs
CONTROLE LIF	PRESENTE	DMEM CTE	DMEM CTE
CONTROLE SEM LIF	AUSENTE	DMEM CTE	DMEM CTE
15nM TSA LIF	PRESENTE	DMEM TSA 15nM	DMEM CTE
15nM TSA	AUSENTE	DMEM TSA 15nM	DMEM CTE
50nM TSA LIF	PRESENTE	DMEM TSA 50nM	DMEM CTE
50nM TSA	AUSENTE	DMEM TSA 50nM	DMEM CTE
100nM TSA LIF	PRESENTE	DMEM TSA 100nM	DMEM CTE
100nM TSA	AUSENTE	DMEM TSA 100nM	DMEM CTE

*A diluição da TSA nos meios encontra-se disposta no Item A.5 do Apêndice A.

Em todos os grupos, amostras foram fixadas 0, 12, 24, 36 e 48 horas após a adição da droga para realização de reação de imunocitoquímica para lisina 9 acetilada em histonas H3.

4.6.3.2 Experimento 3(b): Dinâmica da acetilação de histonas H3 em CTE em diferenciação tratadas com TSA no d5 e no d13

Para a realização deste experimento, amostras fixadas em 12,24,36 e 48 horas dos grupos experimentais descritos na Tabela 5 foram submetidas à reação de imunocitoquímica para lisina 9 acetilada em histonas H3.

TABELA 5 Descrição dos grupos propostos para o experimento 3(b).

GRUPO	CULTIVO 0-24hs	CULTIVO 24-48hs
0nM d5 (Controle)	DMEM CTE SFB	DMEM CTE SFB
0nM d13 (Controle)	DMEM CTE SFB	DMEM CTE SFB
50nM TSA d5	DMEM TSA 50nM*	DMEM CTE SFB
50nM TSA d13	DMEM TSA 50nM*	DMEM CTE SFB
100nM TSA d5	DMEM TSA 100nM*	DMEM CTE SFB
100nM TSA d13	DMEM TSA 100nM	DMEM CTE SFB
150nM TSA d5	DMEM TSA 150nM	DMEM CTE SFB
150nM TSA d13	DMEM TSA 150nM	DMEM CTE SFB

*A diluição da TSA nos meios encontra-se disposta no Item A.5 do Apêndice A.

4.6.4 Experimento 4: Efeitos da TSA na diferenciação *in vitro* neural de CTE

4.6.4.1 Experimento 4(a): Efeitos da TSA na diferenciação *in vitro* inicial de CTE em precursores ectodérmicos

No experimento proposto, foi avaliada a capacidade da TSA em influenciar o comprometimento das células tronco embrionárias com linhagens ectodérmicas. A TSA foi adicionada nas concentrações e nos momentos descritos na Tabela 6.

TABELA 6 Descrição dos grupos propostos para o experimento 4(a).

GRUPOS	CULTIVO EM SUSPENSAO	CULTIVO ADERENTE (d5) (24 hs)	CULTIVO ADERENTE (d6)
0nM TSA (Controle)	DMEM CTE SFB	DMEM CTE SFB	DMEM CTE SFB
15nM TSA d0-d5	DMEM TSA 15nM	DMEM CTE SFB	DMEM CTE SFB
50nM TSA d5	DMEM CTE SFB	DMEM TSA 50nM	DMEM CTE SFB
100nM TSA d5	DMEM CTE SFB	DMEM TSA 100nM	DMEM CTE SFB

*A diluição da TSA nos meios encontra-se disposta no Item A.5 do Apêndice A.

No d6, os CE aderidos (30 por grupo) foram tripsinizados e replaqueados. Após aderência (3 a 6 horas), os cultivos foram lavados com PBS-L e fixados em solução de paraformaldeído 4%. Quatro repetições foram realizadas.

As células fixadas foram submetidas à reação de imunocitoquímica para a proteína nestina, presente em precursores ectodérmicos. Aproximadamente 600 células por grupo foram avaliadas quanto à presença da proteína, em cada repetição, totalizando 2.400 células.

Utilizando o programa ImageJ1.40g (Java), as imagens referentes a cada grupo foram processadas. No total, 40 imagens foram analisadas para cada grupo, compreendendo 10 imagens de cada pool.

4.6.4.2 Experimento 4(b): Efeitos da TSA na diferenciação *in vitro* tardia de CTE em neurônios

Neste experimento, foi avaliada a capacidade da TSA em influenciar a diferenciação das células tronco embrionárias em neurônios. Para tanto, a TSA foi adicionada nas concentrações e nos momentos descritos na Tabela 7.

TABELA 7 Descrição dos grupos propostos para o experimento 4(b).

GRUPOS	CULTIVO EM SUSPENSAO	CULTIVO ADERENTE (d5-24 hs)	CULTIVO ADERENTE (d13-24hs)
0nM TSA (Controle)	DMEM CTE SFB	DMEM CTE SFB	DMEM CTE SFB
15nM TSA d0-d5	DMEM TSA 15nM	DMEM CTE SFB	DMEM CTE SFB
50nM TSA d5	DMEM CTE SFB	DMEM TSA 50nM	DMEM CTE SFB
100nM TSA d5	DMEM CTE SFB	DMEM TSA 100nM	DMEM CTE SFB
50nM TSA d13	DMEM CTE SFB	DMEM CTE SFB	DMEM TSA 50nM
100nM TSA d13	DMEM CTE SFB	DMEM CTE SFB	DMEM TSA 100nM

No d22, os CE aderidos (20 por grupo) foram tripsinizados e replaqueados. Após 24 horas, no d23, os cultivos foram lavados com PBS-L e fixados em paraformaldeído 4%. Quatro repetições foram realizadas.

As células fixadas foram submetidas à reação de imunocitoquímica para a proteína α III tubulina. Aproximadamente 500 células por grupo em cada repetição foram avaliadas quanto à presença da proteína, totalizando 2000 células.

4.6.5 Experimento 5: Efeitos da TSA na diferenciação *in vitro* muscular de CTE

4.6.5.1 Experimento 5(a): Efeitos da TSA na diferenciação *in vitro* inicial de CTE em precursores mesodérmicos

No presente experimento, foi avaliada a capacidade da TSA em influenciar o comprometimento das células tronco embrionárias com linhagens mesodérmicas. Para tanto, foi utilizada a mesma metodologia do experimento 4(a), porém as reações de imunocitoquímica foram realizadas para a proteína desmina, presente em precursores mesodérmicos.

4.6.5.2 Experimento 5(b): Efeitos da TSA na diferenciação *in vitro* tardia de CTE em células musculares estriadas

No presente experimento, foi avaliada a capacidade da TSA em influenciar a diferenciação de células tronco embrionárias em miócitos estriados. Para tanto, foi

utilizada a mesma metodologia do experimento 4(b), com pequenas alterações: as reações de imunocitoquímica foram realizadas para a proteína troponina I, após tripsinização das células no d27 e fixação das mesmas no d28. Ainda, foi realizada avaliação da contratilidade dos CE isoladamente, no d14.

4.7 Estatística

Os resultados referentes a percentuais de células positivas, vivas (integridade de membrana) e apoptóticas (TUNEL) foram agrupados (todas as repetições) e analisados pelo teste de Qui-Quadrado (χ^2), no programa estatístico MINITAB® Release 14.1.

Os resultados referentes às razões obtidas das somas das frações de áreas do corante CY3/HOECHST; as médias das áreas dos CE, e os níveis de acetilação de histonas, foram submetidos à ANOVA *One-way* com o teste de comparação de médias de Tukey, no software GraphPad Prism 4.0. Para todas as análises, foi estabelecido nível de significância de 5%.

5 RESULTADOS

5.1 Experimento 1: Caracterização *in vitro* da linhagem de CTE H106

As reações de imunocitoquímica para Oct 3/4 foram positivas, nas áreas dos núcleos de colônias pluripotentes (Figura 10).

As colônias de CTE pluripotentes foram transferidas para cultivo em suspensão, e deram origem a 82 CE. Oito dias após o início dos cultivos, foram observadas células semelhantes a fibroblastos em aproximadamente 90% dos cultivos. No dia 11, foram observados focos de células contráteis em 50% das estruturas. No dia 14, células semelhantes a neurônios foram identificadas em aproximadamente 80% dos cultivos. Células morfolologicamente semelhantes a adipócitos foram evidenciadas no dia 21 em aproximadamente 30% dos cultivos. No dia 31, fibras contráteis estriadas foram observadas em aproximadamente 20% dos cultivos. Foram fixadas 15 estruturas no dia 4 (durante o cultivo em suspensão) e 82 estruturas no dia 33, para reação de imunitoquímica para AFP e troponina I e α III tubulina, respectivamente. Os resultados encontrados estão descritos na Figura 7; imagens do cultivo de CTE se encontram na Figura 8 e tipos celulares evidenciados no experimento estão ilustrados na Figura 9.

Reações de imunocitoquímica para AFP, troponina I e α III tubulina se apresentaram positivas (Figura 10).

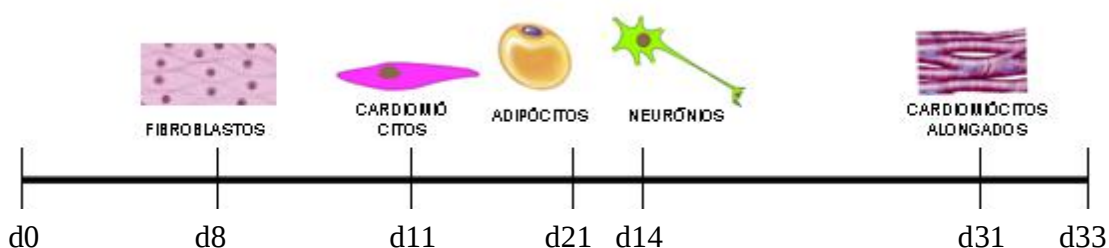


FIGURA 7 Cronograma de observação de tipos celulares obtidos a partir da diferenciação *in vitro* de CTE H106.

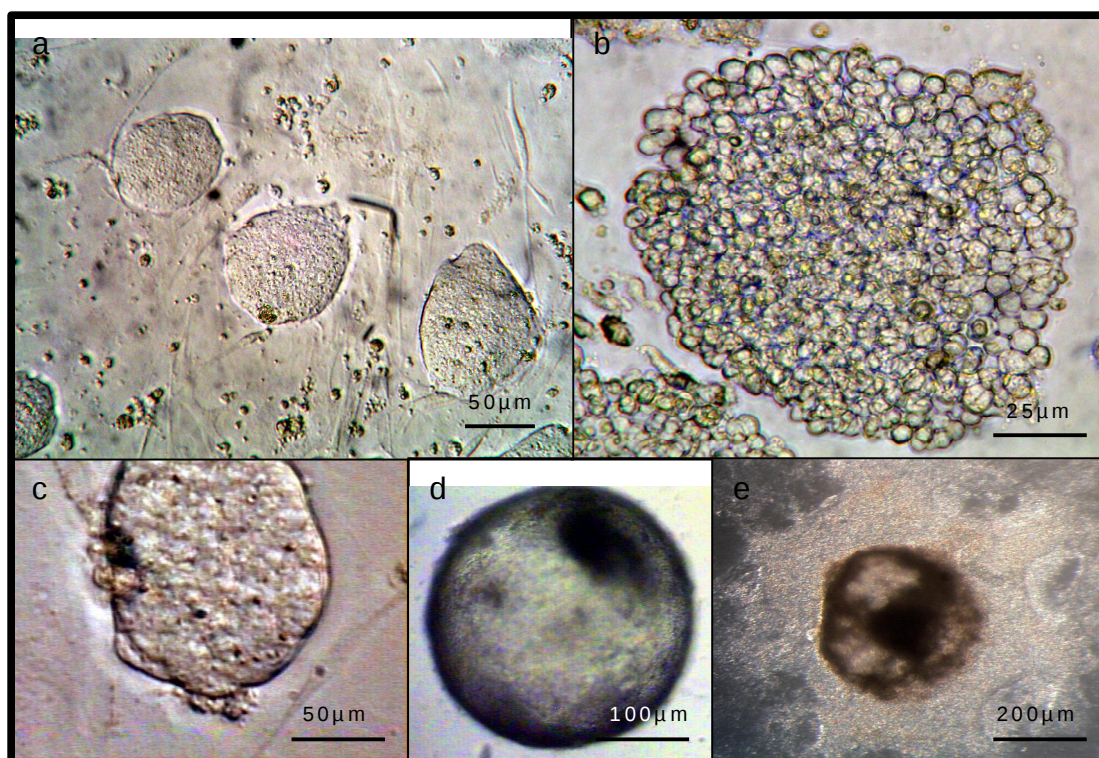


FIGURA 8 Imagens do cultivo de CTE. Colônias pluripotentes sobre monocamada de FPM inativada (a,c). Colônia pluripotente durante o procedimento de tripsinização (b). CE no d5 em suspensão (d) e aderido no d13 (e).

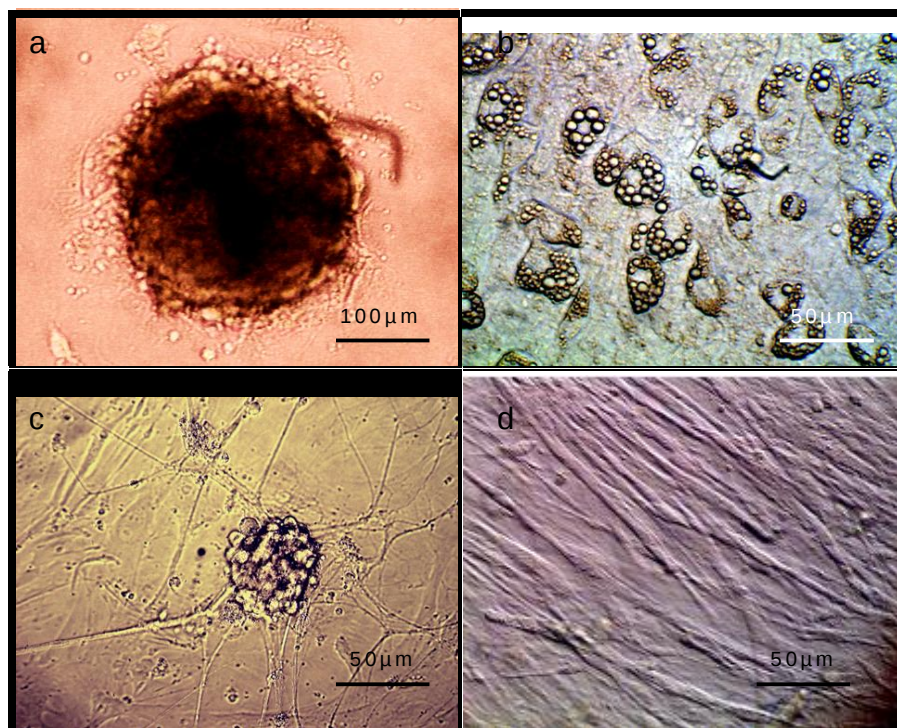


FIGURA 9 Tipos celulares observados no cultivo de CTE em diferenciação. Células morfológicamente semelhantes a fibroblastos envolvendo o CE (a). Células morfológicamente semelhantes a adipócitos (b). Células morfológicamente semelhantes a neurônios (c). Células morfológicamente semelhantes a cardiomiócitos alongados (d).

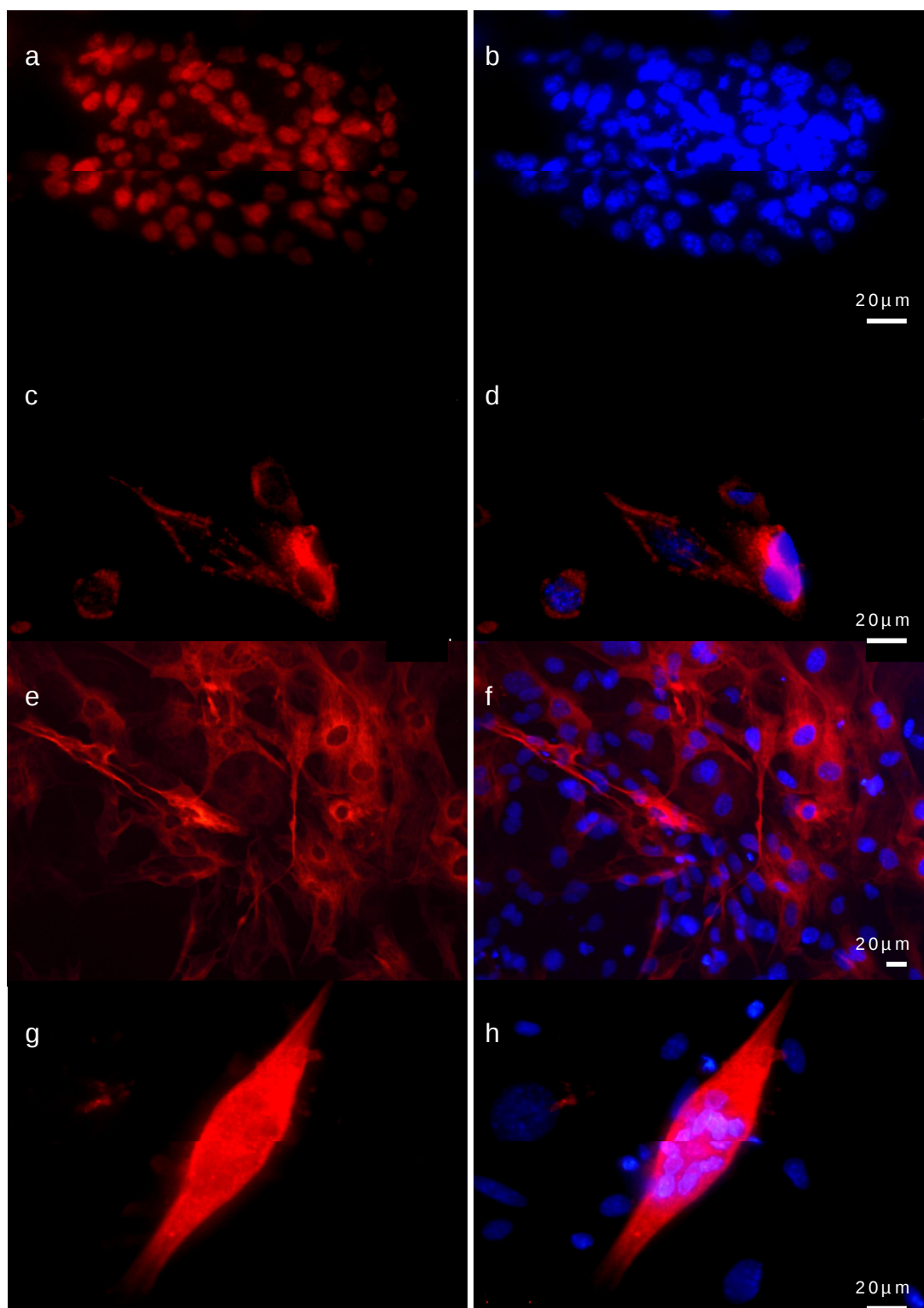


FIGURA 10 Reações de imunocitoquímica para caracterização da linhagem H106. Região corada por CY3 (vermelho) indicando a presença do fator de transcrição OCT3/4 (a,b), da proteína AFP (c,d), da proteína α III tubulina (e,f) e da proteína troponina I (e,g). À direita, imagens sobrepostas aos núcleos, corados por HOECHST 33342 (azul) (b,d,f,h).

5.2 Experimento 2: Efeitos da TSA sobre a morte celular e apoptose de CTE em diferenciação

5.2.1 Efeitos da TSA na formação de CE

Quando utilizada durante o cultivo em suspensão, a TSA provocou diminuição dramática do tamanho dos CE, de 2.3 vezes na área das estruturas e 3,3 vezes no número de células (Figuras 11 e 12).

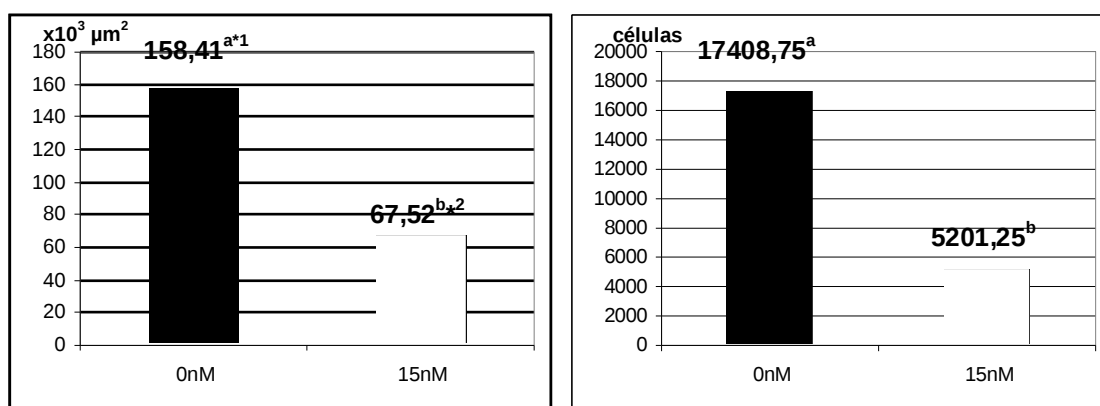


FIGURA 11 Comparação dos CE dos grupos 0nM (controle) e 15nM ao d5 de cultivo em suspensão. Em A, a área média dos CE e em B o número médio de células presentes nos CE.

^{a,b}: Valores com sobrescritos diferentes nas colunas diferem entre si ($p < 0.05$) (ANOVA).

*1: desvio padrão = 16,414; *2: desvio padrão = 9,311.

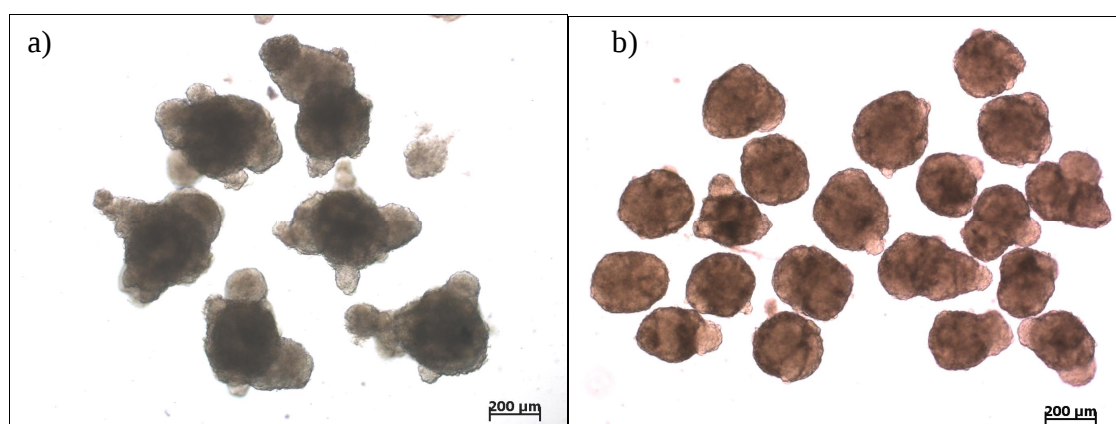


FIGURA 12 Corpos embrióides no 5º dia de cultivo em suspensão dos grupos 0nM (controle) (a) e 15nM (b).

5.2.2 Teste de Toxicidade da TSA

Em linhas gerais, as células tratadas com a TSA no d13 apresentaram percentuais numéricos menores de células vivas quando comparados aos de células tratadas no d5, exceto nas concentrações 600 e 700nM (Figura 13 e Tabela 8).

O percentual de células vivas no d6 declinou significativamente em relação ao controle a partir da concentração de 400nM, e se manteve até a concentração de 700nM.

No caso de células tratadas no d13, na concentração de 300nM já houve declínio significativo em relação ao controle, e a partir da concentração de 400nM foi observado um declínio mais acentuado, que se manteve até a concentração de 700nM.

A concentração de 300nM, portanto, apresentou efeitos mais tóxicos na população de células no d14 do que no d6.

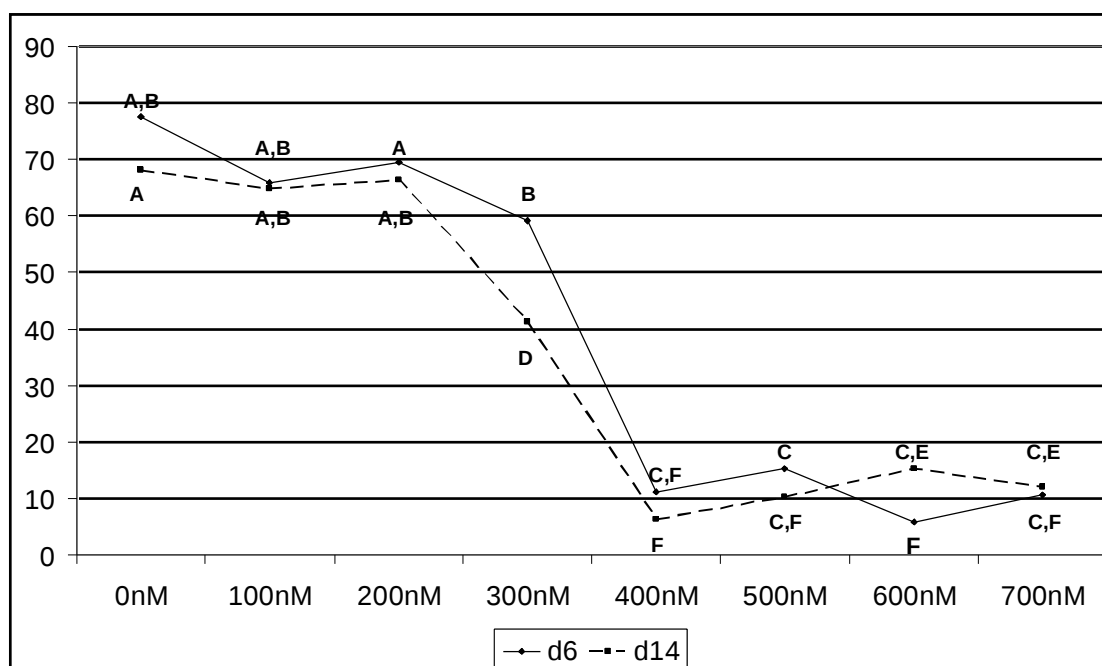


FIGURA 13 Percentuais de células vivas após 24 horas de tratamento com diferentes concentrações de TSA em células no d6 e d14 de diferenciação.

a,b,c,d,e,f,: Valores com sobrescritos diferentes nas colunas diferem entre si ($p < 0.05$) (Qui-quadrado).

TABELA 8 Percentuais de células vivas obtidos pelo teste de integridade de membrana em CTE em diferenciação (d5 e d13) tratadas com concentrações de TSA 0 a 700nM.

GRUPOS	d6			d14		
	CÉLULAS	CÉLULAS	%	CÉLULAS	CÉLULAS	%
	VIVAS	MORTAS		VIVAS	MORTAS	
0nM	202	58	77,69 ^{AB}	190	89	68,1 ^A
100nM	147	76	65,91 ^{AB}	190	103	64,84 ^{AB}
200nM	153	67	69,54 ^A	160	81	66,39 ^{AB}
300nM	112	77	59,25 ^B	122	173	41,35 ^D
400nM	23	183	11,16 ^{CF}	12	179	6,28 ^F
500nM	46	256	15,23 ^C	25	216	10,37 ^{CF}
600nM	11	178	5,82 ^F	24	132	15,38 ^{CE}
700 nM	23	194	10,59 ^{CF}	28	204	12,06 ^{CE}

^{a,b}: Valores com sobrescritos diferentes entre linhas diferem entre si ($p < 0.05$) (QUI-QUADRADO).

Imagens referentes ao teste de integridade de membrana e TUNEL estão dispostas nas Figuras 14 e 15.

5.2.3 Efeitos da TSA nas taxas de apoptose

Na Figura 16 e na Tabela 9, podemos observar que o percentual de células em processo de apoptose ao final do cultivo em suspensão foi 45% maior no grupo 15nM do que no grupo 0nM.

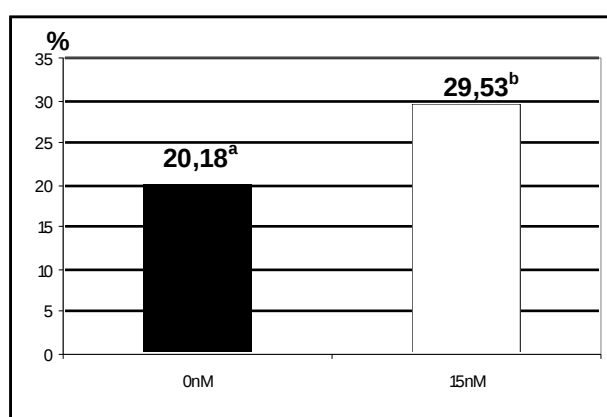


FIGURA 16 Percentual de células em processo de apoptose (TUNEL positivas) nos grupos 0nM (controle) e 15nM ao d5 de cultivo em suspensão.

^{a,b}: Valores com sobrescritos diferentes nas colunas diferem entre si ($p < 0.05$) (Qui-quadrado)

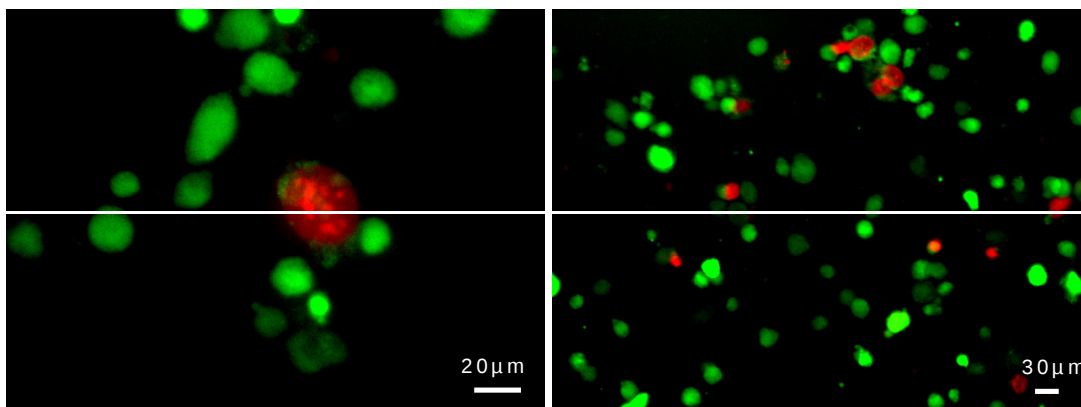


FIGURA 14 Teste de integridade de membrana. Células tronco embrionárias ao sexto dia de diferenciação coradas por iodeto de propídeo – vermelho (mortas) e diacetato de carboxifluoresceína – verde (vivas).

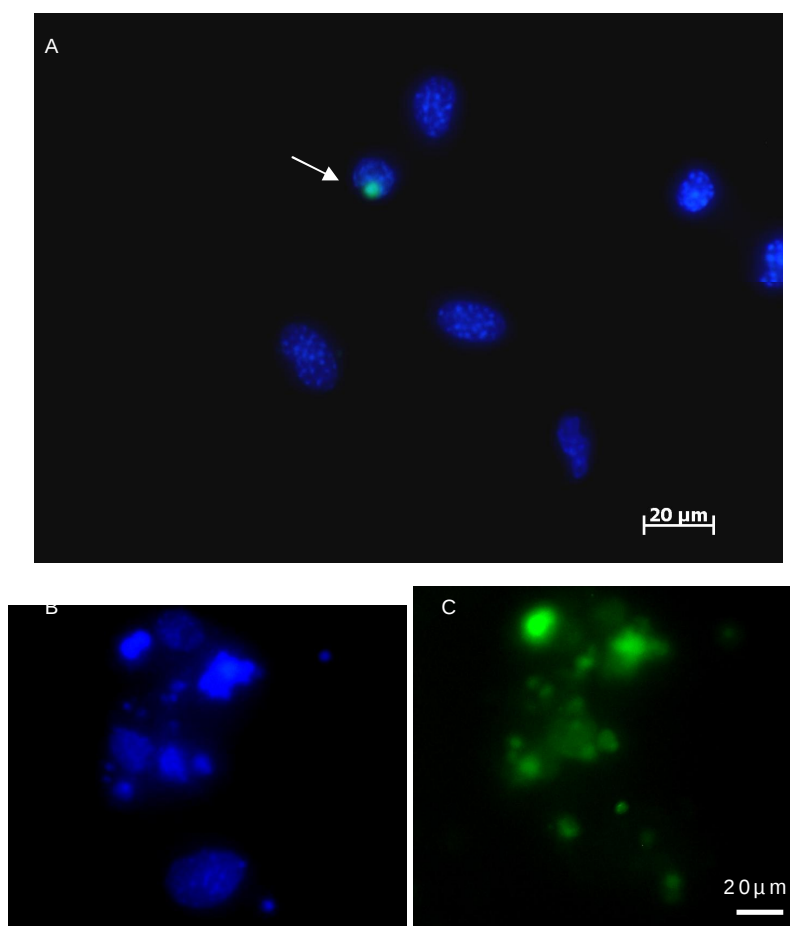


FIGURA 15 Teste TUNEL. Células tronco embrionárias no sexto dia de diferenciação coradas por HOECHST; a) célula apoptótica apresentando reatividade para o teste de TUNEL (ponto verde). B,C) Células apoptóticas - controle positivo.

TABELA 9 Percentual de células em processo de apoptose (TUNEL positivas) nos grupos 0nM (controle) e 15nM ao d5 de cultivo em suspensão.

GRUPOS	CÉLULAS TUNEL+	CÉLULAS TOTAIS	%
0nM TSA (Controle)	89	441	20,18 ^a
15nM TSA d0-5	114	386	29,53 ^b

^{a,b}: Valores com sobrescritos diferentes entre linhas diferem entre si ($p < 0.05$)

Da mesma forma, após 24hs de tratamento com TSA (Figura 17 e Tabela 10), os grupos tratados apresentaram maior percentual de células apoptóticas em relação ao grupo controle.

Os níveis de apoptose foram estatisticamente superiores a partir da concentração de 100nM em células no d5 (2,2 vezes maior que 0nM) e no d13 (1,3 vezes maior que 0nM).

Células no d13 de diferenciação apresentaram maiores níveis de apoptose quando comparados aos de células tratadas no d5, nos grupos controle (2,3 vezes), 50nM (1,75 vezes) e 100nM (1,4 vezes).

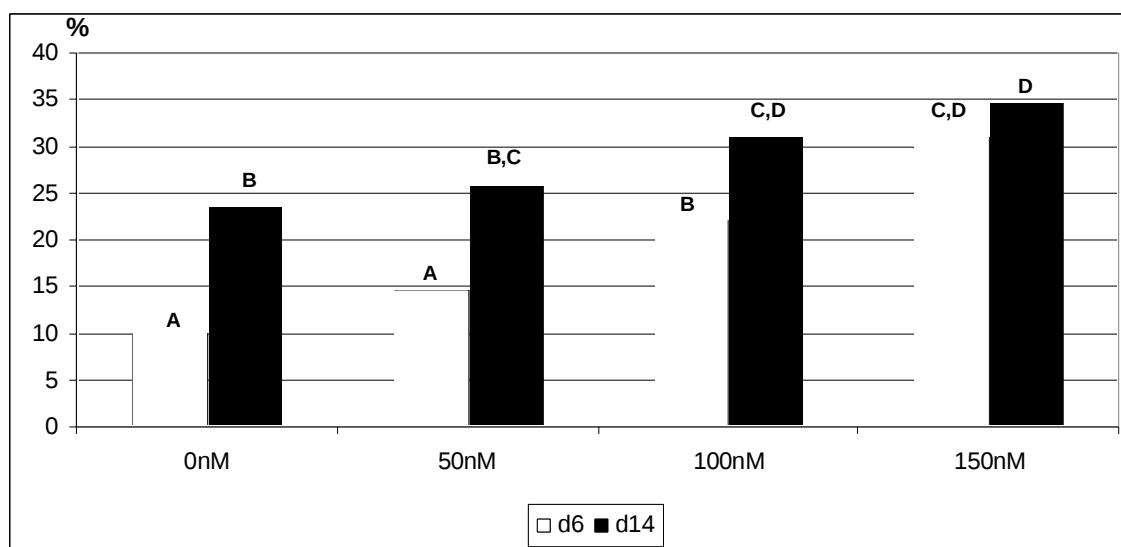


FIGURA 17 Percentual de células em processo de apoptose (TUNEL positivas) nos grupos 0nM (controle), 50nM, 100nM e 150nM 24hs após o início do tratamento com TSA (d6 e d14).

^{a,b,c,d}: Valores com sobrescritos diferentes nas colunas diferem entre si ($p < 0.05$) (Qui-quadrado).

TABELA 10 Percentual de células em processo de apoptose (TUNEL positivas) nos grupos 0nM (controle), 50nM, 100nM e 150nM 24hs após o início do tratamento com TSA (d6 e d14).

GRUPOS	d6			d14		
	CÉLULAS	CÉLULAS	%	CÉLULAS	CÉLULAS	%
	TUNEL +	TOTAIS		VIVAS	MORTAS	
0nM	32	319	10,03 ^A	117	495	23,63 ^B
50nM	53	362	14,64 ^A	141	548	25,73 ^{BC}
100nM	91	411	22,14 ^B	128	411	31,14 ^{CD}
150nM	97	312	31,08 ^{CD}	131	378	34,65 ^D

^{a,b}: Valores com sobrescritos diferentes entre linhas diferem entre si ($p < 0.05$).

5.3 Experimento 3: Dinâmica da acetilação de histonas H3 em CTE tratadas com TSA

5.3.1 Experimento 3(a): Dinâmica da acetilação de histonas H3 em CTE pluripotentes tratadas com TSA

No presente experimento, foram observados os efeitos do tratamento com a TSA em diferentes concentrações em CTE pluripotentes nas reações de AcLys9H3, na presença (Figura 18) e ausência do LIF (Figura 19).

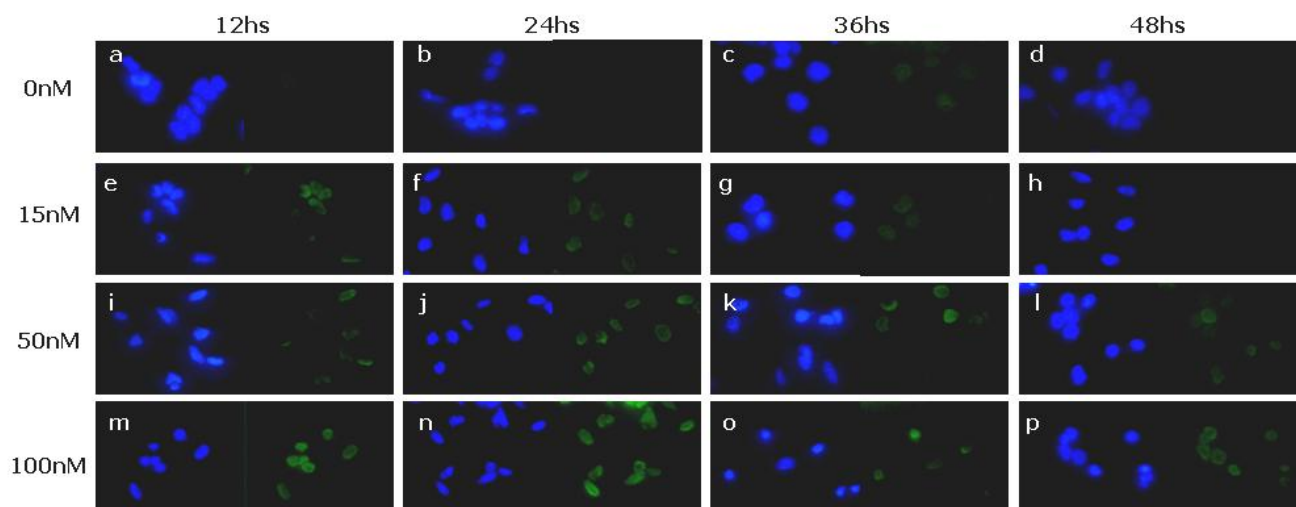


FIGURA 18 Reações de imunocitoquímica para AcLys9H3 em CTE d0-2 tratadas com TSA na presença de LIF. No grupo 0nM (controle), ausência de reatividade em 12(a), 24(b) e 48hs(d), e baixa reatividade em 36hs (c). No grupo 15nM, reatividade moderada em 12(e) e 24hs(f), baixa em 36hs(g) e ausência de reatividade em 48hs(h). No grupo 50nM, reatividade moderada em 12hs(i), alta em 24hs(j), moderada em 36hs(k) e leve em 48hs(l). No grupo 100nM, reatividade máxima em 12(m) e 24hs(n), alta em 36hs(o) e moderada em 48hs(p).

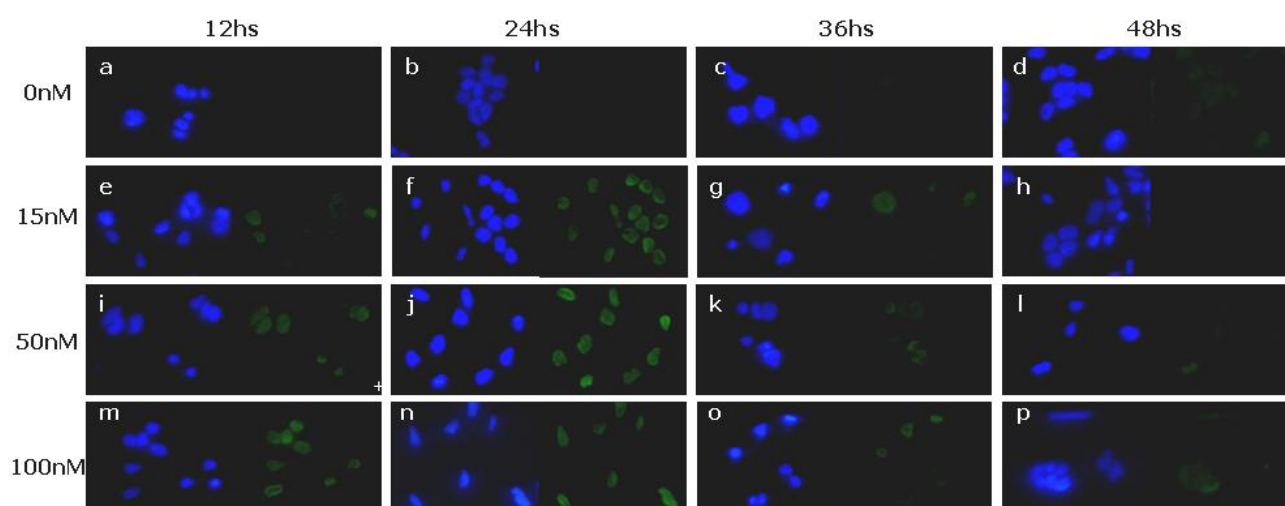


FIGURA 19 Reações de imunocitoquímica para AcLys9H3 em CTE d0-2 tratadas com TSA na ausência de LIF. No grupo 0nM (controle), baixa reatividade em 12(a), 36(c) e 48hs(d), e ausência de reatividade em 24hs(b). No grupo 15nM, reatividade moderada em 12(e), alta em 24hs(f), leve em 36(g) e 48hs(h). No grupo 50nM, reatividade moderada em 12hs(i), alta em 24hs(j), e moderada em 36(k) e 48hs(l). No grupo 100nM, reatividade alta em 12(m) e 24hs(n), e moderada em 36(o) e 48hs(p).

Foram avaliadas as frações correspondentes à área AcLys9H3 positiva dividida pela área dos núcleos, como podemos acompanhar na Figura 20.

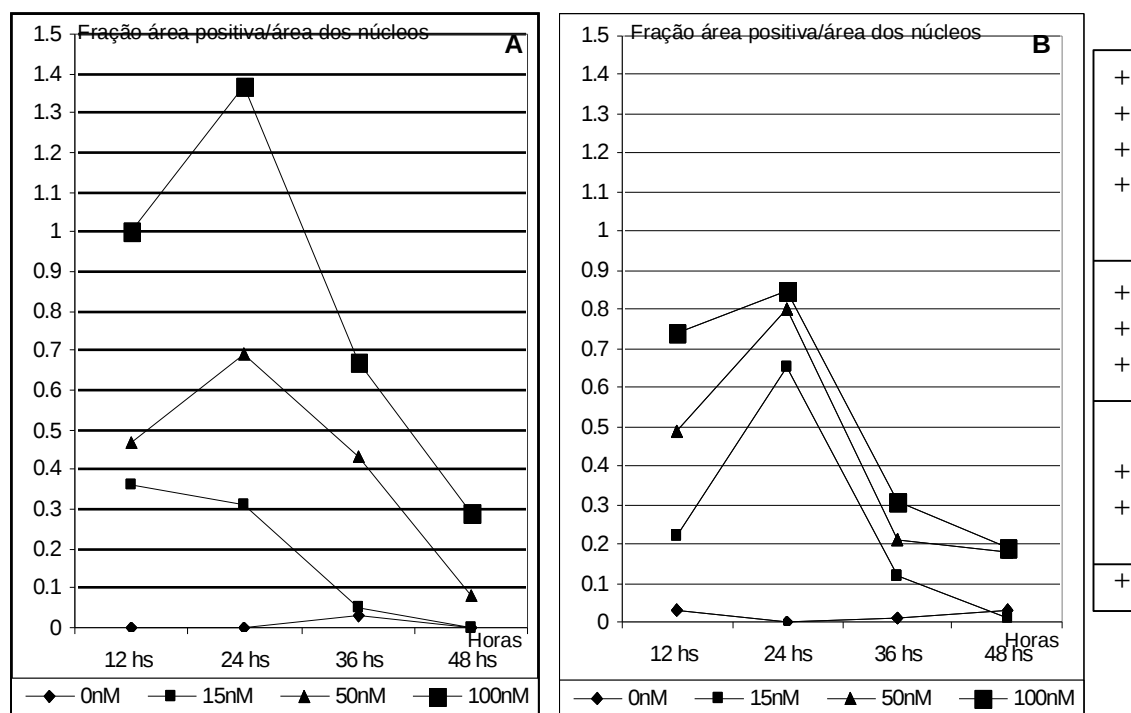


FIGURA 20 Níveis de AcLys9H3 presentes nos diferentes grupos do d0 ao d2 de diferenciação em 12, 24, 36 e 48hs. Valores obtidos a partir da fração área positiva/área dos núcleos nos grupos LIF+ (A) e LIF- (B).

Nos grupos 0nM (controle), na presença do LIF as células apresentaram baixa reatividade em 36hs apenas, e ausência nos demais momentos. Na ausência do LIF, houve baixa reatividade em 12, 36 e 48hs, e nenhuma reatividade em 24hs.

Nos grupos com e sem LIF, a distribuição geral dos valores foi semelhante, observando-se reatividade em 12hs, aumento em 24hs, decréscimo em 36hs e em 48hs. No entanto, no grupo 15nM LIF+, ocorreu decréscimo já em 24hs.

Considerando a concentração da droga, os grupos 100nM foram sempre superiores aos demais, seguidos pelos grupos 50nM e depois 15nM. Apenas na ausência do LIF, os valores obtidos em 48hs foram superiores no grupo 0nM (controle) quando comparados aos do grupo 15nM.

A baixa reatividade ou sua ausência nos grupos controle observada demonstra que o efeito de hiperacetilação da lisina 9 de histonas H3 em CTE pluripotentes observado deve-se à adição da TSA.

5.3.1.1 Alterações morfológicas durante o tratamento com TSA

Alterações morfológicas também foram observadas no presente experimento (Figura 21). As células do grupo 0nM (controle) com LIF se apresentaram estáveis, arredondadas e sem indícios de diferenciação. No grupo 0nM (Controle) sem LIF, os cultivos sofreram o processo de diferenciação celular, apresentando-se morfolologicamente diferenciados em 48hs.

Nos grupos tratados com TSA na presença de LIF, em geral, foram observadas alterações morfológicas que se reverteram quando a droga foi retirada, e as células retornaram a um fenótipo mais semelhante ao indiferenciado.

Nos grupos tratados com TSA na ausência de LIF, observamos que o processo de diferenciação foi acelerado em relação ao grupo controle.

Foi percebida acentuada morte celular nos cultivos tratados com 50nM e principalmente 100nM.

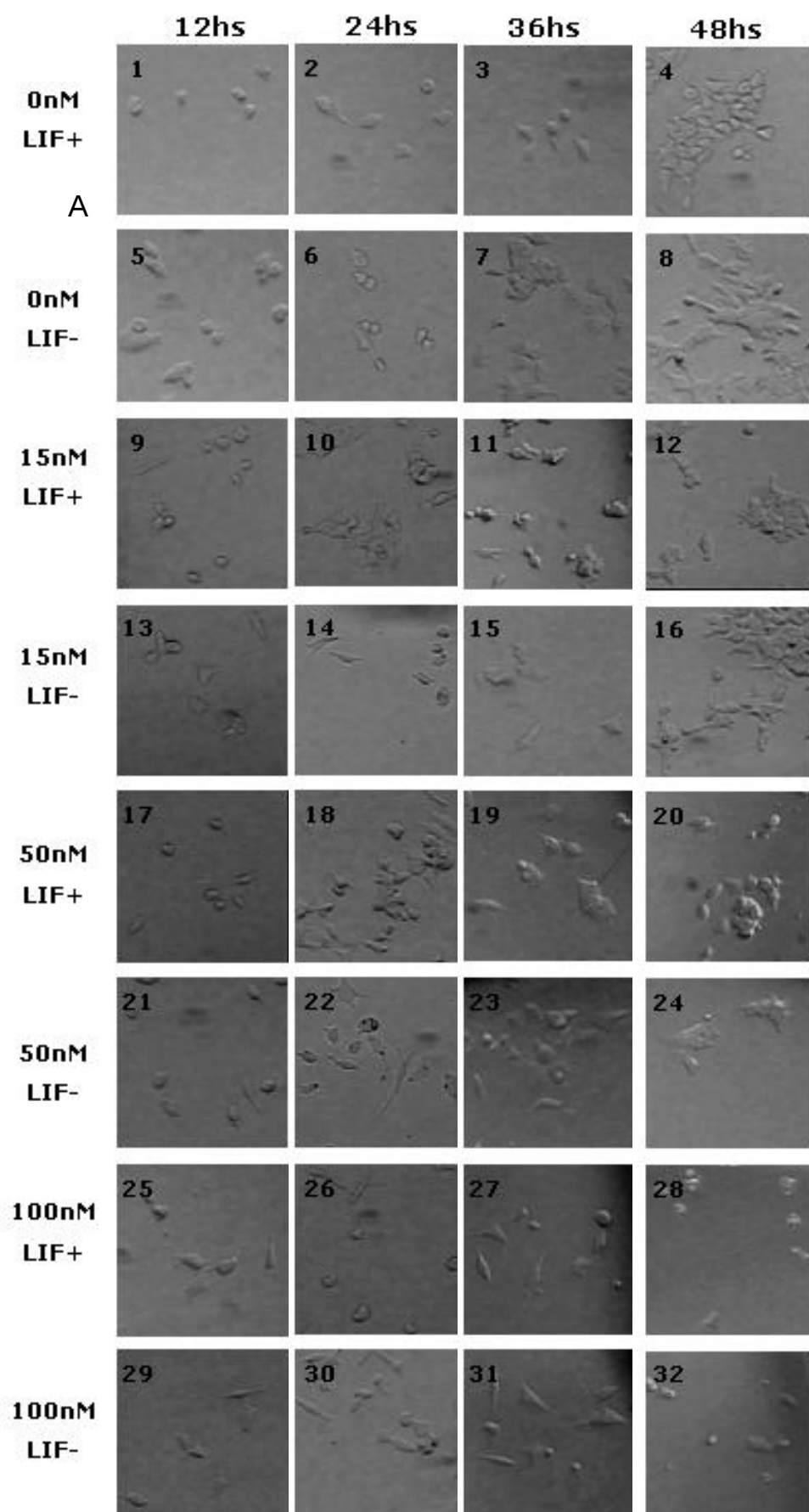
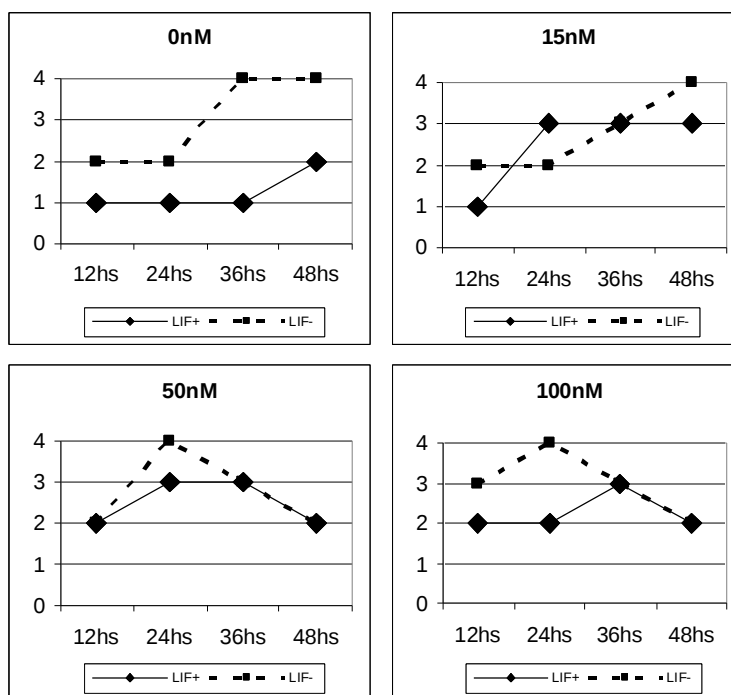


FIGURA 21 A. Morfologia celular dos cultivos LIF+ e LIF- tratados com TSA em 12,24,36 e 48hs. Grupos 0nM LIF+(1-4) e LIF-(5-8); 15nM LIF+ (9-12) e LIF- (13-16); 50nM LIF+(17-20) e LIF- (21-24); 100nM LIF+ (25-28); e LIF- (29-32). Células morfológicamente indiferenciadas (pequenas, arredondadas) foram observadas nos cultivos 1, 2, 3 e 9. Células indiferenciadas em transição (maiores, disformes) podem ser observadas nos cultivos 4, 5, 6, 13, 14, 17, 20, 21, 24, 25, 26, 28 e 32. Células no início de diferenciação (disformes, apresentando prolongamentos citoplasmáticos iniciais) podem ser observadas nos cultivos 10, 11, 12, 15, 18, 19, 23, 27, 29 e 31. Os cultivos 7, 8, 16, 22 e 30 apresentam predominantemente células diferenciadas (disformes, apresentando prolongamentos citoplasmáticos evidentes). **B.** Gráficos representativos do estágio de diferenciação celular de cada cultivo nos diferentes momentos (1=células morfológicamente indiferenciadas; 2=células indiferenciadas em transição para a diferenciação; 3=células no início da diferenciação; 4=células diferenciadas predominantes).

B



5.3.2 Experimento 3(b): Dinâmica da acetilação de histonas H3 em CTE tratadas com TSA no d5 e no d13 de diferenciação

No presente experimento, foram observados os efeitos do tratamento com a TSA em diferentes concentrações em CTE do d5 ao d7 e do d13 ao d15 de diferenciação nas reações de AcLys9H3 (Figuras 22 e 23 e Tabela 11).

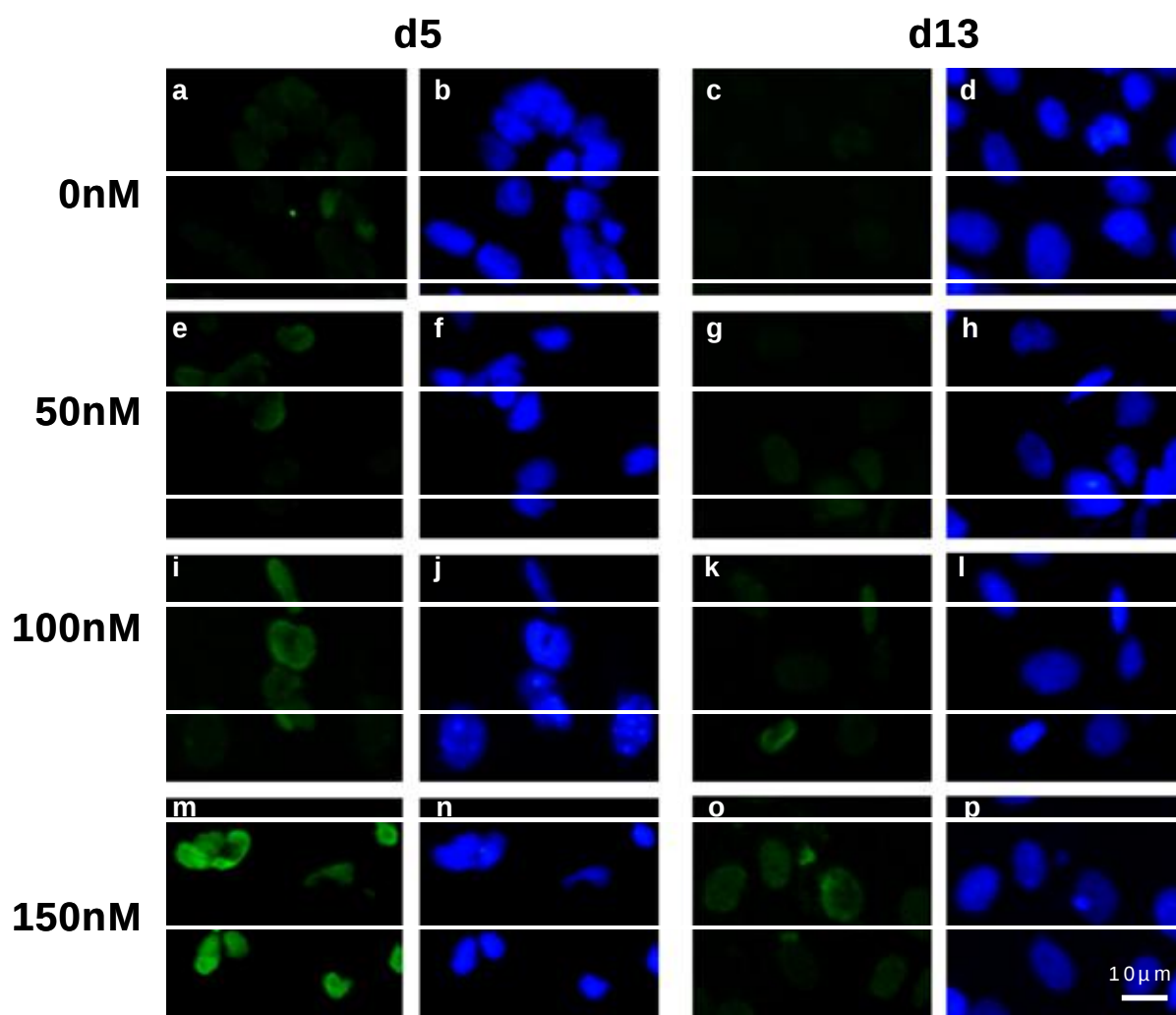


FIGURA 22 Reações de imunocitoquímica para AclLys9H3 em CTE tratadas com TSA do d5-7 e d13-15 de diferenciação. Imagens de 24 horas. No grupo 0nM (controle), reatividade baixa em d5(a,b) e muito baixa em d13(c,d). No grupo 50nM observamos reatividade moderada em d5(e,f) e em d13(g,h). No grupo 100nM, reatividade alta em d5(i,j), e moderada em d13(k,l). No grupo 150nM, reatividade máxima em d5(m,n), e alta em d13(o,p). Imagens à esquerda coradas por FITC e à direita núcleos corados por HOECHST 33342.

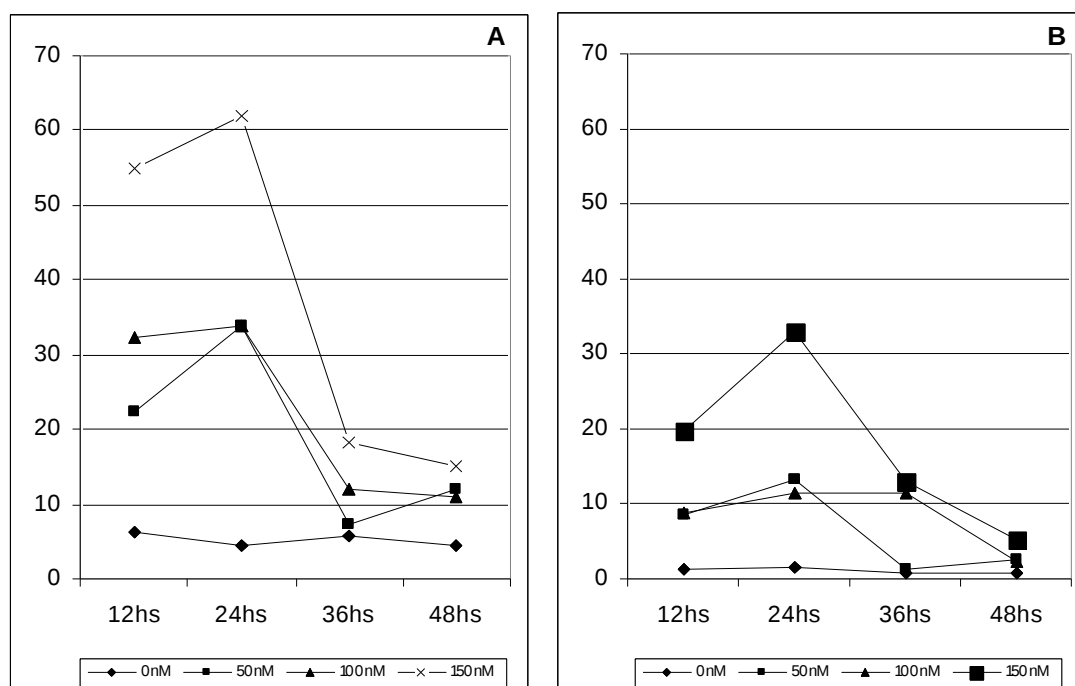


FIGURA 23 Níveis de AcLys9H3 presentes nos diferentes grupos de CTE do d5-7 (A) e d13-15 (B) de diferenciação em 12, 24, 36 e 48 horas. Valores percentuais referentes à área acetilada dos núcleos.

TABELA 11 Percentuais de área acetilada em núcleos de CTE em diferenciação tratadas com TSA por 24hs (0nM, 50nM, 100nM e 150nM) em 12, 24, 36 e 48 horas.

GRUPOS	D6				D14			
	12hs	24hs	36hs	48hs	12hs	24hs	36hs	48hs
0nM	6,24 ($\pm 3,1$) ^{AB}	4,34 ($\pm 6,6$) ^{AB}	5,79 ($\pm 1,3$) ^{AB}	4,33 ($\pm 0,7$) ^A	1,33 ($\pm 0,7$) ^A	1,55 ($\pm 0,4$) ^A	0,86 ($\pm 0,8$) ^A	0,84 ($\pm 0,8$) ^A
50nM	22,49 ($\pm 7,2$) ^{AB}	33,95 ($\pm 26,9$) ^{ABCD}	7,35 ($\pm 1,7$) ^{AB}	12,02 ($\pm 13,4$) ^{AB}	8,65 ($\pm 5,2$) ^{AB}	13,22 ($\pm 12,2$) ^{AB}	1,33 ($\pm 1,1$) ^A	2,58 ($\pm 1,7$) ^A
100nM	32,29 ($\pm 14,2$) ^{ABD}	45,49 ($\pm 16,3$) ^{BCD}	11,97 ($\pm 2,4$) ^{AB}	11,05 ($\pm 8,6$) ^{AB}	8,71 ($\pm 1,8$) ^{AB}	11,48 ($\pm 14,8$) ^{AB}	2,04 ($\pm 2,7$) ^A	2,23 ($\pm 1,3$) ^A
150nM	54,88 ($\pm 18,5$) ^C	61,88 ($\pm 30,6$) ^D	18,26 ($\pm 4,8$) ^{ABC}	15,03 ($\pm 12,7$) ^{AB}	19,77 ($\pm 16,8$) ^{AD}	32,83 ($\pm 41,9$) ^{AD}	12,93 ($\pm 16,6$) ^A	5,06 ($\pm 2,9$) ^A

^{a,b}: Valores com sobrescritos diferentes entre linhas diferem entre si ($p < 0.05$).

O tratamento com a TSA promoveu aumento nos níveis de acetilação, principalmente durante o período de tratamento e na maior concentração. Em relação ao controle, em 12 horas, os níveis foram 8,79 vezes maiores no grupo

150nM d5 e 14,86 vezes no grupo 150nM d13; em 24 horas, os níveis foram 14,25 vezes no grupo 150nM d5 e 21,18 vezes no grupo 150nM d13. Os níveis de acetilação do d5-d7 de diferenciação se mostraram superiores aos do d13-d15 em todos os grupos e em todos os momentos.

O efeito de hiperacetilação de histonas decorrente da TSA se mostrou dose-dependente. Em 24hs, quando os níveis apresentaram maior reatividade, a concentração de 50nM resultou em níveis 7,8 vezes (d5) e 8,5 vezes (d13) maiores do que os do controle; a concentração de 100nM resultou em níveis 10,5 vezes (d5) e 7,4 vezes (d13) maiores do que os do controle; e a concentração de 150nM resultou em níveis 14,2 vezes (d5) e 21,2 vezes (d13) maiores do que os do controle.

No entanto, apesar dos aumentos dos grupos tratados em relação ao controle terem sido semelhantes ou até superiores no período d13, comparando os níveis absolutos dos dois períodos percebemos que estes foram 2,5 vezes (50nM), 3,9 vezes (100nM) e 1,8 vezes (150nM) maiores no período d5 do que no d13.

Os níveis alcançados nas concentrações de 50 e 100nM no d13 foram semelhantes no período de tratamento (até 24hs). A concentração de 50nM, em ambos os momentos, resultou em queda dos níveis de acetilação em 36hs, quando se equivaliam ao grupo 0nM. Nas demais concentrações, alcançaram níveis semelhantes aos do grupo controle em 48hs (d13) e se mantiveram aumentados no período d5.

5.4 Experimento 4: Efeitos da TSA na diferenciação *in vitro* neural de CTE

As imagens referentes às reações de imunocitoquímica do presente experimento encontram-se na Figura 24.

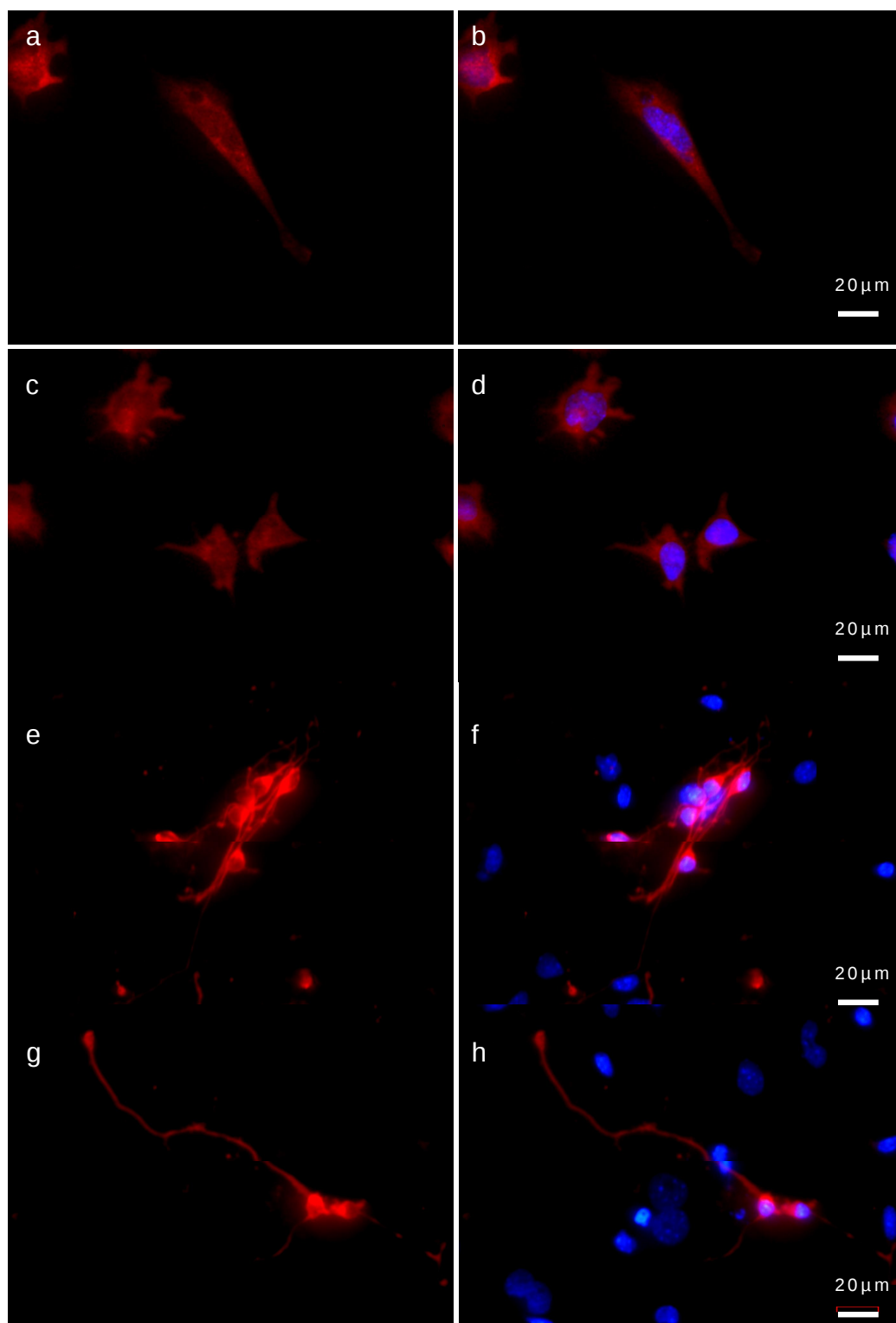


FIGURA 24 Reações de imunocitoquímica para marcadores neuronais. Região corada por CY3 (vermelho) indicando a presença da proteína nestina (a,c) e ̢tubulina (e,g). À direita, imagens sobrepostas aos núcleos, corados por HOECHST 33342 (azul) (b,d,f,h).

5.4.1 Experimento 4(a): Efeitos da TSA na diferenciação *in vitro* inicial de CTE em precursores ectodérmicos

Conforme relatado na Tabela 12 e na Figura 25, as CTE tratadas com as concentrações de 15nM (d0-d5) e 50nM (d5) de TSA apresentaram maiores taxas de células nestina-positivas nas reações de imunocitoquímica. Ao contrário, o tratamento com a concentração de 100nM se mostrou prejudicial à diferenciação neural, apresentando taxas inferiores às observadas no grupo controle.

TABELA 12 Relação de células nestina-positivas nos diferentes grupos.

GRUPOS	CÉLULAS NESTINA-POSITIVAS	TOTAL	%
0nM TSA (Controle)	722	2554	28,2 ^a
15nM TSA d0-5	981	2588	37,9 ^b
50nM TSA d5	1238	3302	37,49 ^b
100nM TSA d5	882	3375	26,13 ^a

^{a,b}: Valores com sobrescritos diferentes entre linhas diferem entre si ($p < 0.05$) (Qui-quadrado).

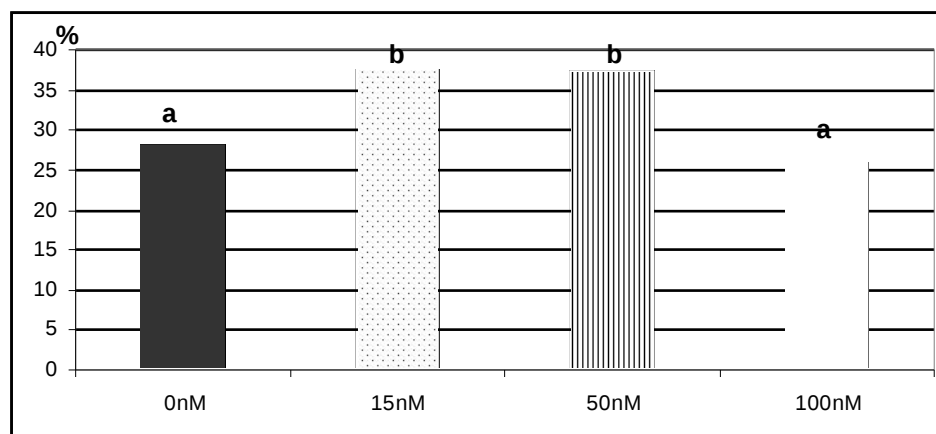


FIGURA 25 Relação percentual de células nestina positivas nos diferentes grupos.

^{a,b}: Valores com sobrescritos diferentes nas colunas diferem entre si ($p < 0.05$)

A distribuição da razão CY3/HOECHST nos grupos, obtida pelas análises do programa ImageJ1.40g (Java Corporation) ocorreu da mesma maneira que a relação percentual entre as células positivas. Assim, o grupo 15nM apresentou-se

superior ao grupo 50nM, que também se mostrou superior ao grupo controle. Ainda, o grupo 100nM apresentou uma ligeira diminuição numérica quando comparado ao grupo controle. No entanto, estes resultados não diferiram significativamente ($p>0,05$), possivelmente devido ao tamanho reduzido das áreas CY3 positivas quando comparado às áreas HOECHST positivas, o que dificulta uma diferença notável (Tabela 13 e Figura 26).

TABELA 13 Relação entre a fração de área total das células nestina-positivas e a fração de área total dos núcleos totais nos diferentes grupos.

GRUPOS	FRAÇÃO DE ÁREA NESTINA-POSITIVA (CY3)	FRAÇÃO DE ÁREA DOS NÚCLEOS (HOECHST)	RAZÃO CY3/HOECHST
0nM TSA (Controle)	37,9	197,9	19,15 ^a
15nM TSA d0-5	46,1	218,5	21,01 ^a
50nM TSA d5	49,4	237,2	20,82 ^a
100 nM TSA d5	50,7	276,5	18,33 ^a

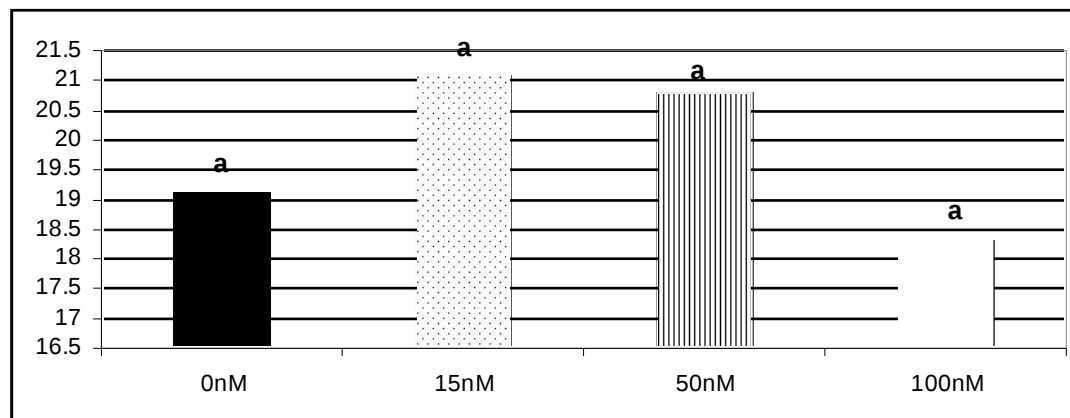


FIGURA 26 Razão CY3/HOECHST de nestina nos diferentes grupos.

5.4.2 Experimento 4(b): Efeitos da TSA na diferenciação *in vitro* tardia de CTE em neurônios

Conforme descrição apresentada na Tabela 14 e na Figura 27, os maiores índices de células α III tubulina positivas nas reações de imunocitoquímica foram alcançados nos grupos tratados no d5, que não diferiram entre si.

O tratamento das células no período avançado da diferenciação com 50nM não resultou em maiores níveis de células α III tubulina positivas em relação ao grupo controle. No entanto, o tratamento com 100nM no d13 foi superior ao grupo controle, embora tenha sido inferior aos grupos tratados no d5.

TABELA 14 Relação de células α III tubulina-positivas nos diferentes grupos.

GRUPOS	CÉLULAS α III TUB.-POSITIVAS	TOTAL	%
0nM TSA (Controle)	53	1601	3,31 ^a
15nM TSA d0-5	165	2192	7,52 ^b
50nM TSA d5	149	1970	7,56 ^b
100nM TSA d5	120	1557	7,7 ^b
50nM TSA d13	86	2702	3,18 ^a
100nM TSA d13	96	1831	5,24 ^c

^{a,b}: Valores com sobrescritos diferentes entre linhas diferem entre si ($p < 0.05$) (Qui-quadrado).

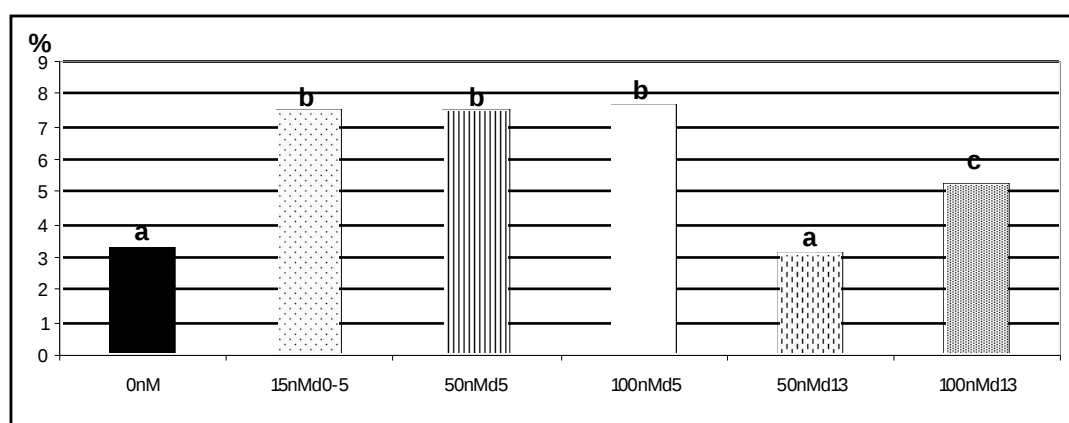


FIGURA 27 Relação percentual de células α III tubulina positivas nos diferentes grupos.

^{a,b}: Valores com sobrescritos diferentes nas colunas diferem entre si ($p < 0.05$)

5.5 Experimento 5: Efeitos da TSA na diferenciação *in vitro* muscular de CTE

As imagens referentes às reações de imunocitoquímica do presente experimento encontram-se na Figura 28.

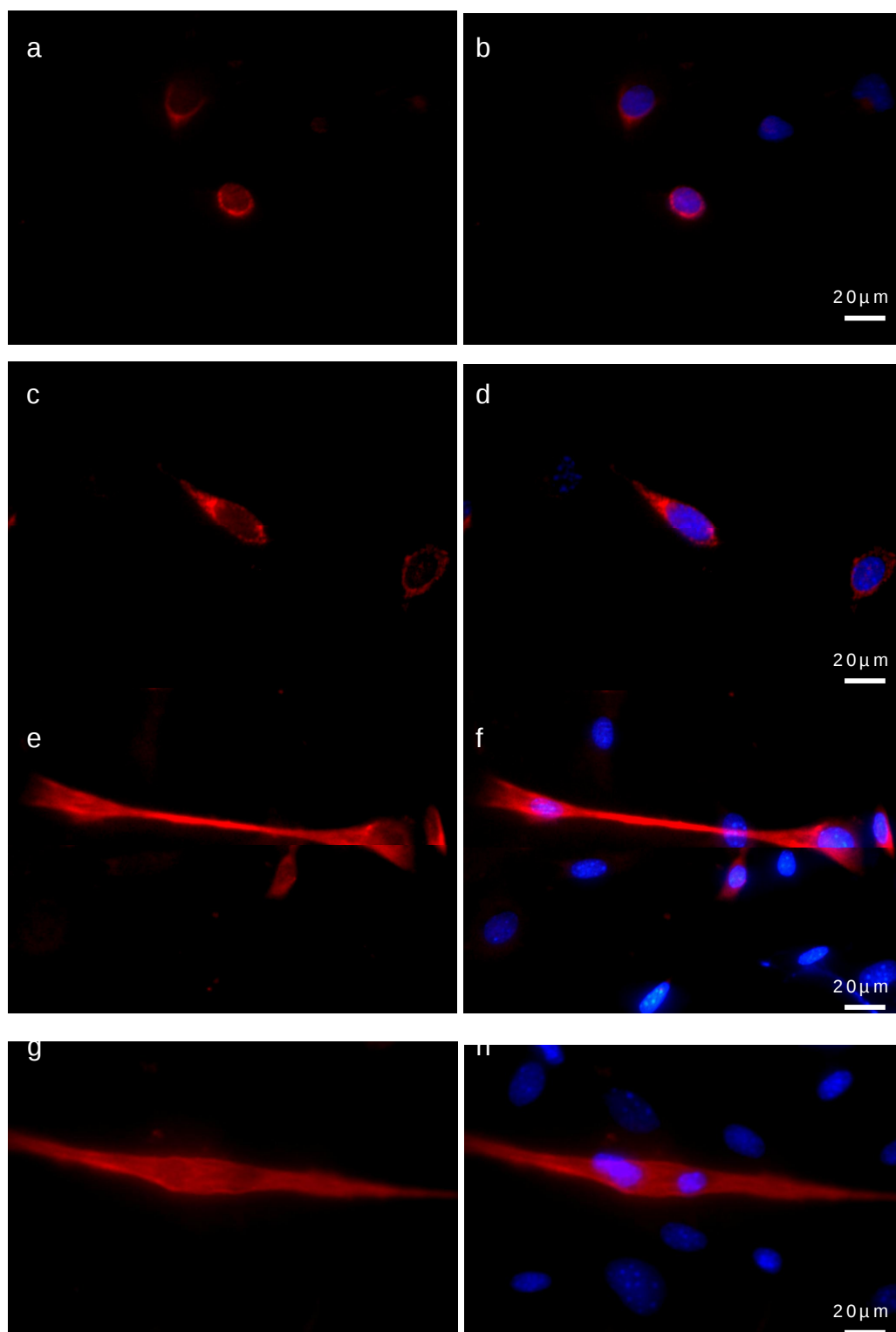


FIGURA 28 Reações de imunocitoquímica para marcadores de células musculares estriadas. Região corada por CY3 (vermelho) indicando a presença da proteína desmina (a,c) e troponina I (e,g). À direita, imagens sobrepostas aos núcleos, corados por HOECHST 33342 (azul) (b,d,f,h).

5.5.1 Experimento 5(a): Efeitos da TSA na diferenciação *in vitro* inicial de CTE em precursores mesodérmicos

Quando avaliamos a população de células desmina-positivas nas reações de imunocitoquímica nos diferentes grupos, podemos observar que o grupo 50nM apresentou maiores taxas quando comparado aos demais grupos. Os grupos 15nM e controle não diferiram, e o grupo 100nM foi inferior aos demais grupos. Portanto, conforme relatado na Tabela 15 e na Figura 29, o tratamento com a concentração de 50nM ao d5 foi o mais eficaz para aumentar a população de células desmina-positivas, precursoras mesodermiais.

TABELA 15 Relação de células desmina-positivas nos diferentes grupos.

GRUPOS	CÉLULAS DESMINA-POSITIVAS	TOTAL	%
0nM TSA (Controle)	517	2047	25,25^a
15nM TSA d0-5	941	3615	26,03^a
50nM TSA d5	1228	3894	31,53^b
100nM TSA d5	943	4249	22,9^c

^{a,b,c}: Valores com sobrescritos diferentes entre linhas diferem entre si ($p < 0.05$) (Qui-quadrado).

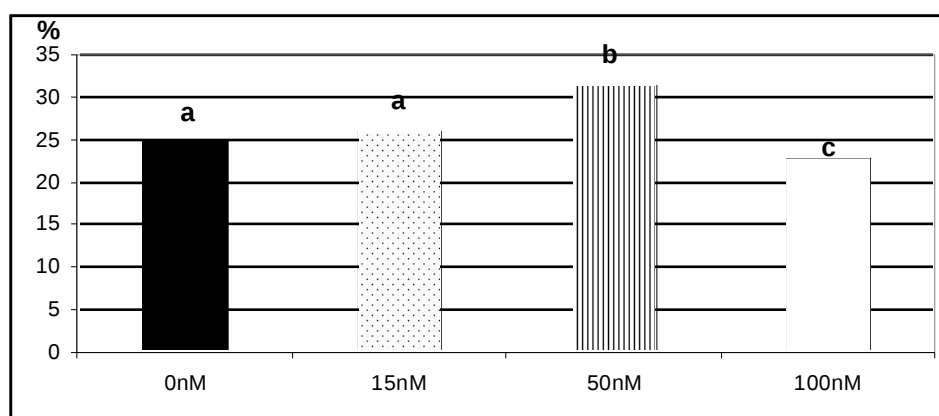


FIGURA 29 Relação percentual de células desmina-positivas nos diferentes grupos.

^{a,b,c}: Valores com sobrescritos diferentes nas colunas diferem entre si ($p < 0.05$)

As imagens do experimento 3(b) foram avaliadas conforme a análise das imagens descrita no experimento 3(a), e estão descritas na Tabela 16 e na Figura 30. A razão compreendida entre a soma das frações de área CY3 e a soma das frações de área HOECHST não correspondeu aos resultados numéricos referentes ao percentual de células desmina-positivas em relação ao total (Tabela 16 e Figura 29). No entanto, os resultados não diferiram entre os grupos. Assim, o grupo 15nM apresentou a maior razão CY3/HOECHST, seguido dos grupos 50nM, controle e 100nM. Portanto, houve uma inversão quando comparamos a posição dos resultados percentuais de células desmina-positivas e a razão CY3/HOECHST dos grupos 15nM e 50nM.

TABELA 16 Relação entre a fração de área total das células desmina-positivas e a fração de área total dos núcleos totais nos diferentes grupos.

GRUPOS	FRAÇÃO DE ÁREA DESMINA POSITIVA (CY3)	FRAÇÃO DE ÁREA DOS NÚCLEOS (HOECHST)	RAZÃO CY3/HOECHST
0nM TSA (Controle)	49,8	271,8	18,32 ^a
15nM TSA d0-5	60,1	271,3	22,15 ^a
50nM TSA d5	56,6	282,5	17,9 ^a
100 nM TSA d5	50,3	293,4	17,14 ^a

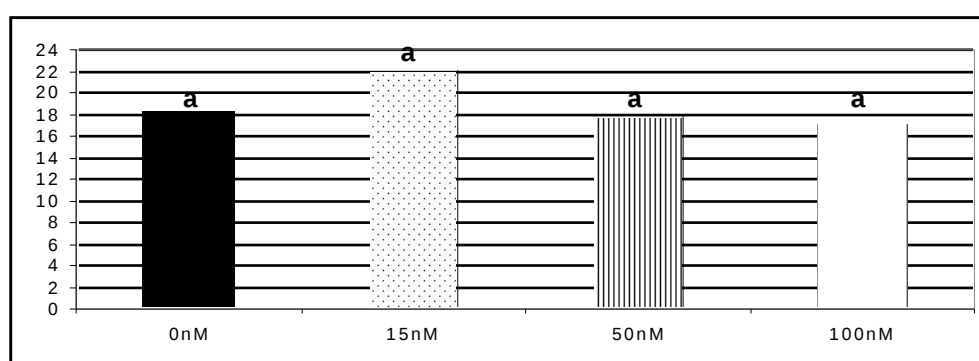


FIGURA 30 Razão CY3/HOECHST de desmina nos diferentes grupos.

5.5.2 Experimento 5(b): Efeitos da TSA na diferenciação *in vitro* tardia de CTE em células musculares estriadas

Quando avaliamos a proteína troponina I em grupos tratados com a TSA, observamos que os grupo 50nM d5 e 100nM d13 apresentaram os melhores resultados, conforme disposto na Tabela 17 e na Figura 31. O tratamento com 50nM no d13 não alterou as taxas de células troponina I positivas quando comparadas as do grupo controle, e os tratamentos com 15nM d0-5 e 100nM no d5 foram prejudiciais à diferenciação de células troponina I positivas.

Foram analisados os percentuais de células positivas e de núcleos positivos para a proteína troponina I, devido ao fato das células musculares serem multinucleadas. No entanto, os resultados encontrados apresentaram distribuições semelhantes.

TABELA 17 Relação de células e núcleos troponina I positivos nos diferentes grupos.

GRUPOS	NÚCLEOS TROPONINA POSITIVOS	CÉLULAS TROPONINA POSITIVAS	TOTAL DE NÚCLEOS	% CÉLULAS POSITIVAS	% NÚCLEOS POSITIVOS	% MÉDIA DE NÚCLEOS /CÉLULAS
0nM TSA (Controle)	136	109	2109	5,168 ^a	6,448 ^a	1,24
15nM TSA d0-5	0	0	-	0	0	0
50nM TSA d5	91	76	1052	7,224 ^b	8,65 ^b	1,19
100nM TSA d5	82	77	3117	2,47 ^c	2,6307 ^c	1,06
50nM TSA d13	145	128	2171	5,8959 ^a	6,6789 ^a	1,13
100nM TSA d13	355	284	3661	7,757 ^b	9,696 ^b	1,25

^{a,b,c}: Valores com sobrescritos diferentes entre linhas diferem entre si ($p < 0.05$) (Qui-quadrado).

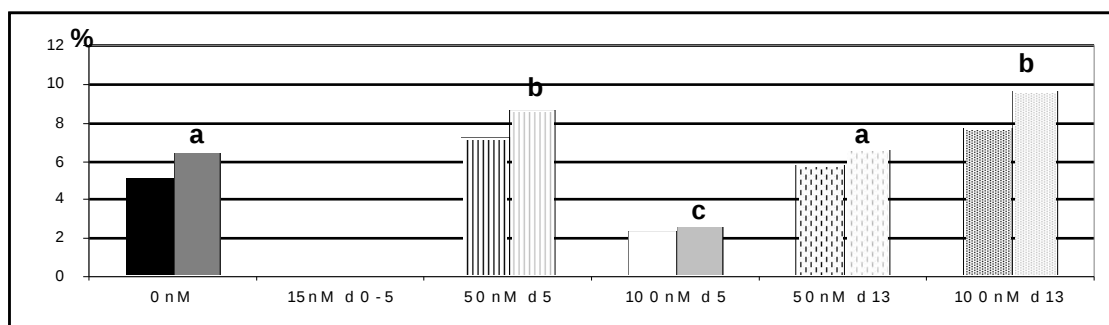


FIGURA 31 Relação percentual de células e núcleos troponina I positivos nos diferentes grupos. Colunas à esquerda representam células e colunas à direita representam núcleos.
a,b,c: Valores com sobrescritos diferentes nas colunas diferem entre si ($p < 0.05$)

Ao analisarmos a presença de focos contráteis nos diferentes grupos, relacionados na Tabela 18 e na Figura 32, podemos observar uma distribuição entre os grupos semelhante à observada no percentual de células troponina I positivas. No entanto, os grupos 100nMd5 e 0nM (controle) não diferiram, como ocorrido no percentual de células troponina I positivas. O mesmo ocorreu para o grupo 100nMd13.

TABELA 18 Relação de CE que apresentaram focos contráteis nos diferentes grupos.

GRUPOS	CE CONTRÁTEIS	TOTAL DE CE	%
0nM TSA (Controle)	43	63	68,25 ^a
15nM TSA d0-5	2	54	3,125 ^b
50nM TSA d5	36	40	90 ^c
100nM TSA d5	40	60	66,6 ^a
50nM TSA d13	61	86	70,93 ^a
100nM TSA d13	67	83	80,7 ^{a,c}

a,b,c: Valores com sobrescritos diferentes entre linhas diferem entre si ($p < 0.05$) (Qui-quadrado).

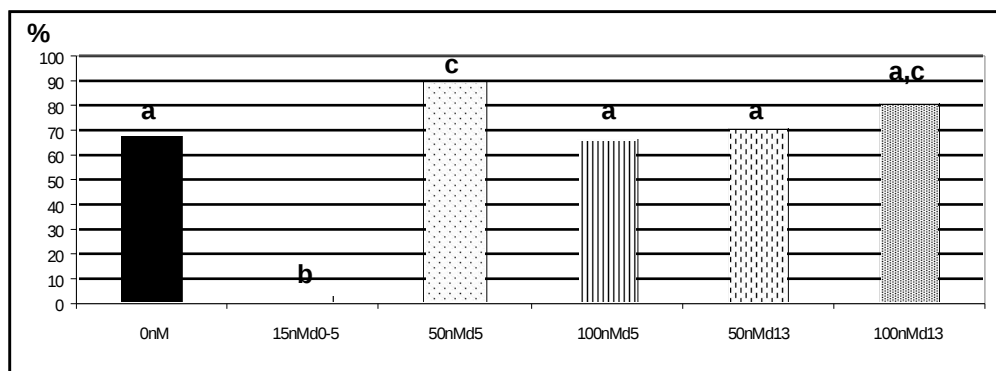


FIGURA 32 Relação de CE que apresentaram focos contráteis nos diferentes grupos.
^{a,b,c}: Valores com sobrescritos diferentes nas colunas diferem entre si ($p < 0.05$)

6 DISCUSSÃO

A capacidade de detectar estímulos extracelulares e executar respostas apropriadas é crucial para todas as funções celulares. Quando recebem sinais externos, como estímulos estressantes ou fatores de crescimento, mecanismos celulares distintos são ativados e culminam na indução ou repressão de grupos de genes definidos. A transferência de sinais da superfície celular ao núcleo leva a respostas celulares integradas como a proliferação, diferenciação celular e apoptose (CHEUNG et al., 2000).

Em linhas gerais, a TSA se mostrou efetiva na promoção de hiperacetilação de Lys9H3, e promoveu queda da proliferação celular. Ainda, acelerou a diferenciação de CTE, em determinadas concentrações, nos tipos celulares estudados. Como a identidade celular é determinada pela expressão de um grupo de genes definido, modificações na expressão gênica podem alterar o fenótipo e função de uma célula, podendo fazer com que ela adquira um nível tal de competência que se mantenha após passar o efeito do tratamento (CHAMBERS et al., 2007).

6.1 Experimento 1: Caracterização *in vitro* da linhagem de CTE H106

A presença do fator de transcrição OCT3/4 e o surgimento de tipos celulares oriundos dos três folhetos embrionários, confirmados por reações de imunocitoquímica (AFP, endoderma; troponina I, mesoderma; α III tubulina, ectoderma), demonstram a pluripotência da linha celular trabalhada.

A cronologia do aparecimento dos tipos celulares obtidos é condizente com estudos publicados. DANI et al. (1997) descrevem o aparecimento de fibroblastos a partir do plaqueamento dos CE, sendo em seu cultivo o plaqueamento realizado no d8 de diferenciação.

O surgimento de focos contráteis é descrito no 11º (AOUADI et al., 2006) e no 8º dia de cultivo em diferenciação (DANI et al., 1997), sendo o plaqueamento realizado no 7º dia. De acordo com BOHELER et al. (2002), o aparecimento destes

focos é esperado entre 1 e 4 dias após o plaqueamento, e aumenta progressivamente com a diferenciação celular.

O aparecimento de células semelhantes a adipócitos é descrito no período do 18º ao 23º dia de cultivo, sendo o plaqueamento realizado no 7º dia (DANI et al., 1997).

O reconhecimento de células semelhantes a neurônios é descrito no 11º dia de cultivo, 4 dias após o plaqueamento (AOUADI et al., 2006; BAIN et al., 1995).

Com base na literatura apresentada, o desenvolvimento *in vitro* da linhagem trabalhada (H106) está dentro do esperado para CTE murinas, sendo a mesma adequada para a utilização em experimentos.

6.2 Experimento 2: Efeitos da TSA sobre a morte celular e apoptose de CTE em diferenciação

No presente experimento, observamos os efeitos da inibição das HDAC sobre a morte celular e as taxas de apoptose das células aderidas, entre grupos de CTE no 5º dia de diferenciação. A morte celular e os níveis de apoptose aumentados em decorrência do tratamento com a TSA ilustram efeitos tóxicos da droga, que foram observados apenas em 300nM (d14) e 400nM (d5) pelo teste de integridade de membrana (células mortas), e já em 100nM pelo teste de TUNEL (apoptose).

Estudos demonstram que o tratamento com TSA causa parada de ciclo celular e apoptose ou diferenciação em vários tipos celulares, sendo a droga utilizada com sucesso como agente terapêutico anti-tumoral (SAUDERS et al., 1999). Outros estudos demonstram efeitos anti-proliferativos do tratamento com TSA em CTE (LEE et al., 2004; CHUIKIN et al., 2006; MCCOOL et al., 2007). O presente experimento compara estes efeitos em diversas concentrações da droga, demonstrando que o tratamento com até 200nM de TSA não afeta o percentual de células vivas, e que o tratamento com 50nM não altera nem mesmo os níveis de apoptose.

6.2.1 Efeitos da TSA na formação de CE

Ao utilizarmos a droga durante o cultivo em suspensão (15nM d0-5) percebemos que os CE formados tiveram seu desenvolvimento prejudicado pela ação da TSA.

Lee et al. (2004) utilizaram TSA em baixas concentrações (5 e 10nM) durante o cultivo em suspensão, e perceberam inibição na formação de CE. Na concentração de 10nM, os CE apenas foram formados quando a droga foi retirada. Modificações no meio de cultivo dos autores (alta glicose, 10% de SFB) podem ter ocasionado a ausência de CE no cultivo. Porém, a situação observada é semelhante à do presente experimento, de prejuízo na formação de CE no grupo tratado com 15nM de TSA durante o cultivo em suspensão.

Em contrapartida, Karamboulas et al. (2006) demonstraram que o tratamento de células P19 (linhagem de carcinoma embrionário murino) com 2,5, 5 e 10nM TSA por 4 dias durante o cultivo em suspensão permitiu a formação de CE semelhantes aos do grupo controle. Talvez pelas concentrações e tempo de exposição inferiores utilizados pelos autores, e pela resistência da linhagem P19 à TSA, a mesma tenha permitido a formação de CE semelhantes aos do grupo controle.

6.2.2 Toxicidade da TSA

Os efeitos observados no presente experimento, de percentuais de células mortas comparados aos do grupo controle em cultivos tratados com 100, 200 e até 300nM (somente no período d5), correspondem a outros resultados encontrados na literatura. McCool et al. (2007) trataram CTE pluripotentes com 100nM TSA por 20 horas, e os efeitos observados de atraso no crescimento celular só foram notados de 18 a 24 horas, momento no qual a população de células demorou cerca de 24 horas para dobrar. Nos demais momentos, a população de células dobrou a cada 12 horas.

Baqir e Smith (2006) também avaliaram os efeitos anti-proliferativos do tratamento com 100nM de TSA por 24 horas em CTE pluripotentes, e perceberam

aumentos semelhantes na população dos grupos tratado e controle, nos momentos 0-24hs; 24-48hs; 48-72hs. O crescimento celular de ambos os grupos diminuiu sucessivamente, pela confluência das células. A proliferação celular diminuiu à medida que o número de células aumenta, por competição por nutrientes, maior quantidade de metabólitos tóxicos e confluência das mesmas.

É importante considerar que a parada de ciclo celular pode ser ocasionada pela diferenciação celular (INOKOSHI et al., 1999), e não necessariamente por senescência ou apoptose. Desta forma, é natural que células no 5º dia de diferenciação não exibam mais os mesmos índices de proliferação das CTE pluripotentes.

Células no d5 apresentaram percentuais de células mortas inferiores aos de células no d13 de diferenciação, inclusive no grupo controle. Também se mostraram mais resistentes à concentração de 300nM do que no período d13. Portanto, as CTE em estádios de diferenciação mais avançados mostram-se mais sensíveis aos efeitos tóxicos da droga.

6.2.4 Efeitos da TSA nas taxas de apoptose

Ao avaliarmos a taxa de apoptose nos grupos estudados no presente experimento, o percentual de células apoptóticas ao final do cultivo em suspensão foi 45% maior no grupo 15nM do que no grupo 0nM.

Da mesma forma, após 24hs de tratamento com TSA nos CE plaqueados (d5), o grupo 100nM apresentou 2,2 vezes mais células apoptóticas do que o controle. Após o plaqueamento, os níveis de apoptose no grupo controle são bem inferiores quando comparados aos do cultivo em suspensão (2,3 vezes). Tal fato pode ocorrer pelo sistema *Hanging Drop* não permitir troca de meio, e desta forma metabólitos tóxicos são mantidos nas gotas, e os nutrientes vão se esgotando. No grupo controle esse efeito certamente é mais pronunciado, pois o número de células é cerca de 2,3 vezes maior do que no grupo tratado ao final do cultivo, e conseqüentemente também é aumentada a produção de metabólitos e competição por nutrientes. A própria coloração do meio se apresenta mais amarelada no grupo

controle e mais rosada no grupo 15nM ao fim do cultivo em suspensão, devido à acidificação ocorrida no grupo controle. Então, os níveis de apoptose no cultivo em suspensão se devem em grande parte ao estresse gerado pelo próprio sistema de cultivo.

Células no d13 de diferenciação apresentaram níveis ainda maiores de apoptose no grupo controle (2,3 vezes maiores do que no período d5), e também aumentaram significativamente em decorrência do tratamento com 100nM TSA (1,3 vezes).

Koyama et al. (2000) demonstraram que a exposição de células T à 100nM TSA por 48hs diminuiu a viabilidade das mesmas (50% de apoptose em células tratadas contra apenas 10% no controle). Outro experimento realizado neste mesmo estudo utilizou linhagem de células resistente às ações de hiperacetilação de histonas causadas pela TSA, e demonstrou que nas mesmas não houve aumento nas taxas de apoptose mesmo quando tratadas com altas concentrações de TSA. Segundo o autor, os efeitos apoptóticos da TSA se devem à hiperacetilação das histonas, pois a forma relaxada do DNA é facilmente catalisada por endonucleases, e as células nesta situação iniciam a cascata de apoptose. Portanto, no estudo citado, efeitos tóxicos que poderiam ser provocados pela estrutura da molécula de TSA não representaram aumento nas taxas de apoptose.

Finalmente, a população de células no d13 de diferenciação mostrou-se mais sensível aos efeitos da TSA do que a população de células no d5 de diferenciação, evento que foi evidente pelo declínio estatístico no percentual de células vivas na concentração de 400nM no d5 e já na de 300nM no d13.

A TSA apresentou efeitos tóxicos a partir de 300nM em células no d13 e 400nM em células no d5, portanto as concentrações utilizadas no presente estudo são adequadas e não afetam estatisticamente a sobrevivência das células, ao menos no período seguinte ao do tratamento.

No entanto, ao observarmos os efeitos nas taxas de apoptose, a droga induz aumento significativo de fragmentação de DNA já na concentração de 100nM,

podendo estar interferindo no ciclo celular de grupos tratados com esta concentração.

6.3 Experimento 3: Dinâmica da acetilação de histonas H3 em CTE tratadas com TSA

O experimento 3 relata o estudo dos efeitos da TSA sobre a acetilação da lisina 9 de histonas H3 em CTE. As propriedades da TSA, causadoras da inibição de HDAC e conseqüente hiperacetilação de histonas em CTE já foram demonstradas em diversos estudos (LEE et al., 2004; DAI e RASMUSSEN, 2007; MCCOOL et al., 2007).

No presente experimento, foram estudadas CTE indiferenciadas na presença do LIF, e CTE no d0-d2 de diferenciação, na ausência do LIF (experimento 3a); e ainda, foram observados os efeitos da TSA sobre CTE em diferenciação (d5-d7 e d13-d15) (experimento 3b).

6.3.1 Padrão de acetilação de CTE não tratadas com TSA

Em CTE pluripotentes (LIF+), os níveis de acetilação se mostraram ausentes com exceção das 36hs, quando atingiram níveis muito baixos. Quando o LIF foi retirado (CTE d0-2 de diferenciação), níveis muito baixos foram detectados. Desta forma, em CTE pluripotentes e em estádios iniciais de diferenciação observamos que a acetilação da lisina 9 em histonas H3 não é significativa.

Em CTE no d5-7 de diferenciação, os níveis de acetilação se mostraram constantes e superiores aos de células do d13-15 de diferenciação, que se apresentaram muito baixos.

McCool et al. (2007) observaram acetilação global das histonas H3 e H4 dos dias 1 a 5 após a retirada do LIF em CTE pluripotentes. Os níveis de acetilação da histona H3 aumentaram no 2º dia (aproximadamente 30%), e sucessivamente de forma lenta atingindo um aumento de 50% apenas no d4. No presente estudo, observamos comportamento de aumento nos níveis de AcLys9H3 até o 6º dia, quando então os níveis caem, mas se mantêm reativos até o momento estudado

(d7). Os níveis baixos nos 2 primeiros dias da diferenciação celular observados no presente experimento são condizentes com os relatos do autor.

LEE et al. (2004) relataram desacetilação durante o primeiro dia de diferenciação na formação de CE, contrastando com os resultados apresentados neste estudo. No entanto, o sistema de cultivo e meio utilizados pelo autor diferem dos utilizados no presente experimento. De qualquer forma, já no d2 os níveis de acetilação foram restaurados no estudo citado.

Outro estudo identificou níveis elevados de Lys9H3 acetilada já no d2, que dobraram no d4 e se mantiveram constantes até o dia estudado, d18. Em oposição, níveis de Lys9H3 trimetilada aumentam a partir do d2, porém na forma de ondas, que corresponderiam a uma desacetilação de H3 (GOLOB et al., 2008).

Meshorer e Misteli (2006) relatam aumentos nos níveis de metilação de Lys9H3 e queda nos níveis de acetilação de H3 e H4 após 7 dias de diferenciação, como observado no presente experimento no que diz respeito à acetilação da Lys9H3.

Em linhas gerais, os resultados obtidos nos estudos citados e no presente experimento são semelhantes, com exceção dos resultados de Lee et al. (2004). CTE pluripotentes apresentam níveis baixos de acetilação, que progridem com a diferenciação até momentos próximos do fim do cultivo em suspensão, quando regridem devido ao aumento da metilação das histonas.

Alterações na cronologia desta apresentação devem-se provavelmente a modificações nos sistemas de cultivo - por exemplo, a diferenciação inicial (d0-d2) foi estudada no presente experimento em cultivos aderidos, planos, e não em suspensão, como alguns dos estudos comentados. Ainda, características intrínsecas das linhas celulares trabalhadas e a metodologia utilizada para a detecção das alterações pós-traducionais das histonas contribuem para pequenas alterações cronológicas nos experimentos.

A onda de acetilação de histonas H3 observada durante a diferenciação celular é condizente com o aumento da expressão gênica, e níveis elevados da expressão de marcadores das três linhagens germinativas. Porém, nesta fase

inicial da diferenciação, as células ainda não estão comprometidas com nenhuma linhagem específica (GADUE et al., 2005).

6.3.2 Padrão de acetilação de CTE tratadas com TSA

De uma forma geral, em CTE pluripotentes todos os grupos tratados exibiram um comportamento semelhante, ou seja, os níveis de acetilação crescentes ou aumentados durante o tratamento com TSA e decrescentes após a retirada da droga.

A concentração de droga utilizada interferiu nos níveis de acetilação encontrados, principalmente nos grupos de CTE pluripotentes (LIF+), e também no tempo de ação residual da droga: os níveis permaneceram superiores aos encontrados no grupo controle por 36hs na concentração de 15 nM; por 48 hs na concentração de 50nM e por mais que 48hs na concentração de 100nM.

Após 5 dias de diferenciação, percebemos também maiores níveis de Lys9H3 acetilada nos grupos tratados em relação ao controle, de forma dose-dependente: as concentrações de 150, 100, e 50nM apresentaram nesta ordem, maiores níveis de acetilação.

A droga atingiu efeitos mais drásticos no período de 24hs, e efeitos intermediários em 12hs. Assim, a TSA leva mais de 12 horas para atingir seu resultado máximo. Após o fim do tratamento, a concentração de 50nM foi a única a não exibir um efeito residual, em 36 e 48hs. Todas as demais apresentaram níveis superiores ao controle, mesmo após a retirada da TSA.

Células no d13 apresentaram um comportamento semelhante ao de CTE no d5 de diferenciação mediante o tratamento com a TSA, porém os percentuais de acetilação foram menores em todos os grupos. Ainda, em 48hs, os efeitos residuais das concentrações 100 e 150nM já eram muito baixos, o que é refletido nos níveis de acetilação próximos aos do controle, ao contrário de células no d5.

Porém, se considerarmos os aumentos referentes ao grupo controle neste período (d13), que apresentava níveis muito baixos de acetilação, estes foram bastante significativos, e superiores aos ocorridos no d5.

Desta forma, parece que as células no d5 apresentam maior adaptabilidade ao tratamento com TSA: maior resistência aos efeitos tóxicos, e respondem com níveis maiores de acetilação. Ao contrário, células no d13 sofrem mais os efeitos tóxicos e não atingem níveis tão elevados de acetilação.

McCool et al. (2007) observaram níveis elevados de acetilação de Lys9H3 em CTE indiferenciadas quando comparados aos de células tratadas com TSA em genes responsáveis pela pluripotência; OCT3/4, REX1 e FGF4. Em genes particulares da diferenciação celular, como nestina, a acetilação de Lys9H3 foi maior em células tratadas com a TSA. Os autores também perceberam coincidência nos padrões de acetilação locais de alguns genes quando ocorreu a retirada do LIF e quando as células foram tratadas com TSA, como se a TSA tivesse simulado o programa de diferenciação celular inicial.

Lee et al. (2004) observaram inibição da onda de desacetilação percebida em seu experimento com CTE em diferenciação, quando a TSA foi utilizada, confirmando o efeito de hiperacetilação de histonas ocasionado pela droga.

No presente experimento, a hiperacetilação causada pela TSA ocorreu independentemente dos eventos de diferenciação, e atingiu níveis maiores nos grupos tratados com LIF. Talvez a maior resistência das CTE pluripotentes aos efeitos tóxicos da TSA tenha ocasionado esse resultado, pois quando comparamos células tratadas no d0, d5 e d13 de diferenciação, percebemos níveis superiores de acetilação em células no d0, seguidos pelo d5, assim como uma resposta ao tratamento com TSA mais pronunciada. Concordando com esta hipótese, DAI e RASMUSSEN (2007) perceberam um aumento de 6 vezes nos níveis de acetilação de Lys9H3 em CTE pluripotentes tratadas com aproximadamente 33nM TSA por 24hs; ao tratarem FPM com a mesma concentração por 48hs, observaram aumento de apenas 2 vezes. Então, CTE pluripotentes respondem de forma mais acentuada ao tratamento com TSA do que células diferenciadas ou em processo de diferenciação.

6.3.3 Alterações morfológicas observadas em decorrência do tratamento com TSA

No presente experimento, observamos alterações morfológicas no grupo controle sem LIF compatíveis com diferenciação celular em 48hs, e tais alterações não foram observadas no grupo controle com LIF. O tratamento com TSA na presença de LIF induziu morfologia semelhante à diferenciada em 24hs, que se reverteu em 36 e 48hs, quando a droga foi retirada, e as células retornaram a um fenótipo semelhante ao indiferenciado. Nos grupos tratados com TSA na ausência de LIF, observamos que o processo de diferenciação foi acelerado em relação ao grupo controle, demonstrando morfologia compatível com diferenciação celular já em 24hs, que se manteve em 48hs mesmo com a retirada da droga.

De acordo com nossos resultados, McCool et al. (2007) encontraram quase 100% das colônias após o tratamento com 100nM TSA por 20hs na presença do LIF com morfologia diferenciada, e após a retirada por 2 dias da TSA, 65% das colônias retomaram fenótipo indiferenciado. Esta reversão obtida na morfologia, observada em CTE +LIF tratadas com TSA após a retirada da droga, é compatível com um retorno da expressão gênica das mesmas a um padrão pluripotente, segundo os autores, que descreveram o OCT3/4 re-expresso em 75% das células. Para os autores, o aumento na expressão de genes causado pela TSA não foi suficiente para manter as células diferenciadas.

Ao efetuarem o tratamento com TSA, Lee et al. (2004) perceberam comportamento de diferenciação mais rápido após a retirada da droga. Para os autores, o tratamento com TSA não permitiu que as células adquirissem adquirido características morfológicas de células diferenciadas, mas com a remoção da droga as células completam rapidamente o programa de diferenciação. Vale ressaltar que o sistema de cultivo do autor diferiu do trabalhado neste estudo.

No presente experimento, observamos nas células do d5-d7 que a expressão das proteínas induzida pela TSA, combinada a certo grau de diferenciação, induziu realmente a entrada das mesmas no processo de diferenciação celular, que não foi revertida mesmo doze dias após o tratamento.

Chegamos a esta conclusão ao observarmos o aumento das populações estudadas tardiamente, pelo tratamento com TSA aplicado no d5.

6.4 Experimento 4: Efeitos da TSA na diferenciação *in vitro* neural de CTE

Nossos experimentos *in vitro* demonstraram que modificações epigenéticas causadas pela atividade das HDAC influenciam o padrão de diferenciação de precursores neurais e neurônios derivados de CTE. A inibição da atividade das HDAC pela TSA durante o cultivo em suspensão, no 5º e no 13º dia de diferenciação estimulou significativamente a progressão da linhagem neuronal.

Os presentes achados são condizentes com observações em experimentos realizados com células do hipocampo adultas de ratos (HSIEH et al., 2004) e com células tronco neurais (BALASUBRAMANIYAN et al., 2006). Assim, tanto em CTE, quanto em células do hipocampo adulto, e CT neurais, a hiperacetilação de histonas promoveu diferenciação neuronal. No entanto, além da diferença encontrada entre os inibidores de HDAC utilizados (VPA no caso de células de hipocampo adultas), particularidades das propriedades intrínsecas e do comportamento *in vitro* dos tipos celulares mencionados parecem estar relacionadas a algumas das diferenças observadas após manipulação da atividade das HDACs.

Por exemplo, os progenitores neurais de hipocampo adulto apenas se diferenciam em neurônios após estimulação exógena com fatores como o ácido retinóico (HSIEH et al., 2004), enquanto estudos em CT neurais demonstram que apenas com a inibição de HDAC é possível derivar-se neurônios com propriedades compatíveis com disparo de potencial de ação (BALASUBRAMANIYAN et al., 2006).

As diferenças referentes ao estágio de diferenciação celular também se refletem nas concentrações da droga utilizadas. Quando utilizada em células tronco neurais, a concentração de 17 nM por 4 dias já foi suficiente para induzir a diferenciação neuronal, e os cultivos sobreviveram exibindo fenótipo neuronal por até 3 semanas sob esta concentração de droga.

McCool et al. (2007) utilizaram 100nM TSA por 20hs em células indiferenciadas, na presença de LIF, e obtiveram uma população de 50% de células nestina-positivas no grupo tratado, e 0% no controle. O grupo tratado, mesmo na presença de LIF, apresentou maior população nestina-positiva do que CTE no 3º dia de diferenciação. No presente experimento, utilizamos 15nM d0-5, e tal concentração já foi suficiente para estimular em nível máximo a expressão de nestina. Ao contrário, quando utilizamos 100nM TSA no d5 de diferenciação, observamos efeito benéfico apenas na diferenciação neuronal, sendo os percentuais de células nestina-positivas semelhantes aos encontrados no grupo controle. Isso demonstra que em células já em processo de diferenciação, na ausência do LIF, o tratamento com altas concentrações de TSA (100nM) pode não ser tão benéfico quanto concentrações intermediárias (50nM). Desta forma, CTE se mostraram mais resistentes no d0 do que no d5.

McCool et al. (2007) realizaram o experimento na presença do LIF, e quando a TSA foi retirada observaram após dois dias menos de 25% das células positivas para nestina, e a intensidade da reação também diminuiu. O autor sugere que na presença do LIF, após retirar a TSA as células retomam o fenótipo indiferenciado. No presente experimento, no entanto, as células foram tratadas na ausência de LIF e em sistemas de diferenciação. Assim, mesmo após a retirada da TSA as células progrediram sua especificação, e exibiram uma população de neurônios superior aos grupos tratados posteriormente e ao grupo controle.

O fato da concentração de 100nM d5 não ter incrementado a população de precursores mas sim a de neurônios pode ter ocorrido devido ao efeito tóxico desta concentração no d5, portanto ainda que ela tenha aumentado a população este aumento foi mascarado e não diferiu do controle. O tratamento com 100nMd5 ocasionou atraso no ciclo celular, que foi revertido após a retirada da droga (Experimento 2), e o incremento foi observado mais tarde, na diferenciação neuronal. No experimento 5(a), a TSA 100nMd5 se mostrou tóxica e diminuiu os níveis de precursores mesodérmicos e de células musculares estriadas. Aqui, ela

apenas não diferiu do controle no momento inicial e sim no momento tardio, mostrando-se benéfica à diferenciação neuronal.

Experimentos de cultivo com neuroblastoma (Neuro2a) e com células progenitoras neurais utilizando inibidores farmacológicos de HDACs também demonstram um incremento na diferenciação neuronal. O uso da TSA em células Neuro2a também modificou níveis de expressão de HDAC (AJAMIAN et al., 2004) e induziu saída de ciclo celular para diferenciação neuronal (INOKOSHI et al., 1999).

Células tronco neurais expostas à 33nM TSA por 24hs deram origem, após 8 dias, ao grupo com a maior taxa de neurônios (BALASUBRAMANIYAN et al., 2006).

Portanto, os resultados apresentados de diversos grupos de pesquisa corroboram com os obtidos no presente experimento, que demonstrou a utilização da TSA benéfica tanto para a especificação de progenitores ectodérmicos quanto para a diferenciação de neurônios.

6.5 Experimento 5: Efeitos da TSA na diferenciação muscular de CTE

Nossos experimentos *in vitro* demonstram que modificações epigenéticas causadas pela atividade das HDAC influenciam o padrão de diferenciação de precursores mesodérmicos e de células musculares estriadas derivadas de CTE. A inibição da atividade das HDAC pela TSA durante o cultivo em suspensão prejudicou a diferenciação muscular; a utilização da TSA em concentrações intermediárias (50nM) no 5º dia de diferenciação e elevadas (100nM) no 13º dia estimulou significativamente a progressão da linhagem muscular estriada.

A inibição da atividade das HDAC pela TSA durante o cultivo em suspensão prejudicou a cardiomiogênese. Este resultado contrasta com o de Karamboulas et al. (2006), que induziu cardiomiogênese indicada pela expressão de MHC em células P19 tratadas no período de agregação (4 dias) com 5nM TSA, enquanto o grupo controle não apresentou cardiomiócitos, já no 6º dia de diferenciação. Tal fato pode ter ocorrido pela sensibilidade das células P19 à TSA ser menor do que

CTE indiferenciadas; ainda, possivelmente a concentração de 15nM tenha sido excessiva neste período.

Talvez a TSA atue sobre a diferenciação de células precursoras mesodérmicas em células musculares, mas não sobre a especificação de CTE em células mesodérmicas. Assim, o grupo 15nM d0-d5, onde o tratamento foi iniciado antes da existência de células precursoras, não apresentou efeitos positivos, e como o desenvolvimento dos CE foi prejudicado pela droga, a diferenciação em células musculares estriadas foi retardada e não detectada de forma semelhante ao controle nos momentos estudados.

A utilização da TSA em concentrações intermediárias (50nM) no 5º dia de diferenciação e elevadas (100nM) no 13º dia estimulou significativamente a progressão da linhagem muscular estriada. Porém, observamos um efeito do estágio de diferenciação celular na dose aplicada. A concentração de 50nM se mostrou benéfica no d5, e a concentração de 100nM prejudicial; e no d13 a concentração de 100nM foi benéfica e a de 50nM não diferiu do controle. Assim, como observado no experimento 4, as CTE em estádios iniciais de diferenciação são mais sensíveis a concentrações elevadas da droga, enquanto em estádios avançados necessitam altas concentrações para apresentarem os efeitos benéficos esperados.

Ao observarmos os resultados da fração de área de desmina (razão CY3/HOECHST), verificamos que os mesmos não acompanharam a distribuição das células desmina-positivas, como seria esperado. Tal fato pode ter ocorrido devido ao período de estimulação com a droga ter sido maior no grupo 15nM, podendo ter havido uma maior produção da proteína nas células positivas, embora o percentual de células positivas não tenha se elevado. No entanto, esta hipótese foge ao ocorrido com o marcador nestina, que apresentou uma distribuição semelhante tanto no percentual de células positivas quanto na razão CY3/HOECHST.

Ao compararmos a distribuição do percentual de núcleos positivos com células positivas para troponina I (Tabela 13), percebemos um aumento numérico

no percentual de núcleos em todos os grupos, exceto no grupo 100nM d5. Este resultado demonstra que no grupo em questão, o percentual de células multinucleadas é inferior aos outros grupos, e desta forma percebemos que o estágio de desenvolvimento das células musculares estriadas no grupo 100nM d5 é anterior ao encontrado nos demais grupos.

Na literatura, estão presentes alguns trabalhos que evidenciam um incremento na diferenciação muscular estriada utilizando a TSA, mas em estádios avançados da diferenciação, e em concentrações mais baixas do que as encontradas em experimentos de neurogênese. Kawamura et al. (2005) utilizaram aproximadamente 33nM de TSA por 24 horas no d9-d10 do cultivo em suspensão de CTE e descreveram aumento de 6 vezes no percentual de células cardíacas; Hosseinkhani et al. (2007) utilizaram 10nM TSA em CTE de macaco, por 24hs no d7-d8 após plaqueamento dos CE, e perceberam aumento de 2,25 vezes no percentual de cardiomiócitos.

Quando observamos a presença da linhagem cardiomiocitária em estádios avançados, refletida pela pulsação de CE, percebemos uma reversão dos efeitos maléficos da concentração de 100nM d5. Nesta situação, os efeitos das concentrações 100nMd5, 50nMd13 e controle se mostram semelhantes. Tal fato pode ter ocorrido por esta avaliação não considerar a população percentual de células, e sim a presença das mesmas. Assim, provavelmente os cardiomiócitos se apresentavam em menores percentuais no grupo 100nMd5, como refletiram os outros resultados apresentados (desmina e troponina).

A população de células mesodérmicas e musculares estriadas se mostrou mais sensível à droga do que as células ectodérmicas e neurônios. As concentrações de 15nM d0-5 e 100nM d5, que foram prejudiciais às células mesodérmicas, foram benéficas às células neuronais. No entanto, a concentração de 100nM no d13, que foi benéfica às células mesodérmicas, parece ter sido baixa para as células neuronais, já que observamos nelas efeitos positivos mas não comparáveis aos encontrados quando a concentração de 15nM d0-5 e 50nM d5.

7 CONCLUSÕES

- 1) A linhagem celular H106 apresentou padrões de diferenciação celular adequados e pode ser utilizada para estudos de diferenciação *in vitro*.
- 2) A TSA promoveu aumento das taxas de morte celular a partir da concentração de 300nM (até 1,84 vezes), e aumento das taxas de apoptose a partir da concentração de 100nM (até 2,2 vezes).
- 3) Os níveis de acetilação da lisina 9 em histonas H3 se mostraram ausentes em CTE pluripotentes e muito baixos em CTE d0-2 de diferenciação.
- 4) Os níveis de acetilação da lisina 9 em histonas H3 se mostraram maiores (4,69 vezes) em células do d5-d7 quando comparados a células do d13-d15 de diferenciação.
- 5) A TSA promoveu hiperacetilação de Lys9H3, de forma dose-dependente. O estágio de diferenciação das CTE influenciou a potencialidade da droga, que promoveu níveis mais drásticos de hiperacetilação em CTE indiferenciadas (LIF+), seguido de CTE d0-2 de diferenciação; e por último CTE d5-7 de diferenciação.
- 6) A TSA promoveu aumento de até 1,34 vezes na população de precursores ectodérmicos quando aplicada no período d0-5 e d5, exceto na concentração de 100nM.
- 7) A TSA promoveu aumento de até 2,3 vezes na população de neurônios quando aplicada no período d0-5, d5 e d13, exceto na concentração de 50nM d13.

- 8) A TSA promoveu aumento de 1,24 vezes na população de precursores mesodérmicos quando aplicada no período d0-5 e d5, apenas na concentração de 50nM; nas concentrações de 15nM d0-5 e 100nM, se mostrou prejudicial.
- 9) A TSA promoveu aumento de até 1,5 vezes na população de células musculares estriadas quando aplicada no período d5 (50nM) e d13 (100nM), e prejudicial no período d0-5 na concentração 15nM.

8 IMPLICAÇÕES

Modificações epigenéticas são creditadas por participarem ativamente dos padrões celulares de expressão gênica, que estão envolvidos no fenômeno de diferenciação celular.

Os resultados apresentados no presente estudo demonstram que o aumento nos níveis de acetilação de histonas causado pela TSA estimula positivamente a neurogênese e a cardiomiogênese, porém quando excessivos podem ocasionar efeitos indesejáveis como a redução da proliferação celular e o aumento dos níveis de apoptose. Estudos adicionais promovendo o tratamento com a TSA combinada a outros agentes indutores das linhagens trabalhadas são promissores no intuito de obter-se incrementos consideráveis nas linhagens desejadas.

Para a ciência básica, o presente estudo confirma o envolvimento da acetilação de histonas na diferenciação celular. Estudos adicionais de expressão gênica poderão elucidar aumentos da expressão de genes específicos, relacionados à especificação de linhagem, nas diferentes concentrações de TSA trabalhadas. Assim, a determinação da concentração ideal de TSA a ser utilizada para cada linhagem, em cada momento, poderá ser efetuada considerando-se não apenas o fenótipo das células, mas também o programa de expressão gênica que as mesmas apresentam mediante os diversos tratamentos.

9 REFERÊNCIAS

ABE, K.; NIWA, H.; IWASE, K.; TAKIGUCHI, M.; MORI, M.; ABÉ, S.I.; YAMAMURA, K.I. Endoderm-specific gene expression in embryonic stem cells differentiated to embryoid bodies. **Exp Cell Res** , v.229, p.27-34, 1996.

AJAMIAN, F.; SALMINEN, A.; REEBEN, M. Selective regulation of class I and class II histone deacetylases expression by inhibitors of histone deacetylase in cultured mouse neural cells. **Neuroscience Lett**, v. 365, p. 64-68, 2004.

ALI, N.N.; EDGAR, A.J.; SAMADIKUCHAKSARAEI, A.; TIMSON, C.M.; ROMANSKA, H.M.; POLAK, J.M.; BISHOP, A.E. Derivation of type II alveolar epithelial cells from murine embryonic stem cells. **Tissue Eng.**, v.8, p.541–550, 2002.

AOUADI, M.; BOST, F.; CARON, L.; LAURENT, K.; BRUSTEL, Y.M.; BINETRUY, B. p38 mitogen-activated protein kinase activity commits embryonic stem cells to either neurogenesis or cardiomyogenesis. **Stem Cells**, v. 24, p. 1399-1406, 2006.

BAIN, G.; KITCHENS, D.; YAO, M.; HUETTNER, J.E.; GOTTLIEB, D.I. Embryonic stem cells express neuronal properties in vitro. **Dev Biol** , v.168, p.342-357, 1995.

BAKER, R.K.; LYONS, G.E. Embryonic stem cells and in vitro muscle development. **Curr Top Dev Biol** , v.33, p.263-279, 1996.

BALASUBRAMANIAN, V.; BODDEKE, E.; BAKELS, R.; KUST, B.; KOOISTRA, S.; VENEMAN, A.; COPRAY, S. Effects of histone deacetylation inhibition on neuronal differentiation of embryonic mouse neural stem cells. **Neuroscience**, v. 143, p. 939-951, 2006.

BAQIR, S.; SMITH, L.C. Inhibitors of histone deacetylases and DNA methyltransferases alter imprinted gene regulation in embryonic stem cells. **Cloning and Stem Cells**, v. 8 (3), p. 200-213, 2006.

BARBERI, T; KLIVENYI, P.; CALINGASAN, N.Y.; LEE, H.; KAWAMATA, H.; LOONAM, K.; PERRIER, A.L.; BRUSES, J.; RUBIO, M.E.; TOPF, N.; TABAR,V.; HARRISON, N.L.; BEAL, M.F.; MOORE, M.A.; STUDER, L. Neural subtype specification of fertilization and nuclear transfer embryonic stem cells and application in Parkinsonian mice. **Nat. Biotechnol.** , v. 21, p. 1200–1207, 2003.

BARTL, S.; TAPLICK, J.; LAGGER, G.; KHIER, H.; KUCHLER, K.; SEISER, C. Identification of mouse histone deacetylase 1 as a growth factor-inducible gene. **Mol. Cell. Biol.** , v. 17, p. 5033–5043, 1997.

BERNSTEIN, B.E.; ALLIS, C.D. RNA meets chromatin. **Genes Dev.** , v. 19, p. 1635–1655, 2005.

BERNSTEIN, B.E.; MIKKELSEN, T.S.; XIE, X. A bivalent chromatin structure marks key development genes in embryonic stem cells. **Cell**, v. 125(2), p. 233–236, 2006.

BOHELER, K.R.; CZYZ, J.; TWEEDIE, D.; YANG, H.T.; ANISIMOV, S.V.; WOBUS, A.M. Differentiation of pluripotent embryonic stem cells into cardiomyocytes. **Circ. Res.**, v. 91, p. 189–201, 2002.

BOHELER, K.R.; WOBUS, A.M. Myocardial aging and stem cell biology. In: Mattson MP, van Zant G, eds. *Stem Cells: A Cellular Fountain of Youth?* New York, NY: Elsevier Science; p. 141–177, 2002.

BRADLEY, A.; EVANS, M.; KAUFMAN, M.H.; ROBERTSON, E. Formation of germ-line chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines. **Nature**, v. 309, p. 255–256, 1984.

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.

CHAMBERS, S.M.; SHAW, C.A.; GATZA, C.; FISK, C.J.; DONEHOWER, L.A.; GOODELL, M.A. Aging hematopoietic stem cells decline in function and exhibit epigenetic dysregulation. **PLoS Biol**, v. 5, p. 201, 2007.

CHEUNG, P.; ALLIS, C.D.; SASSONE-CORSI, P. Signaling to chromatin through histone modifications. **Cell**, v. 103, p. 263–271, 2000.

CHONG, J.A.; TAPIA-RAMIREZ, J.; KIM, S.; TOLEDO-ARAL, J.J.; ZHENG, Y.; BOUTROS, M.C.; ALTSHULLER, Y.M.; FROHMAN, M.A.; KRANER, S.D.; MANDEL, G. REST: a mammalian silencer protein that restricts sodium channel gene expression to neurons. **Cell**, v. 80, p. 949–957, 1995.

CHUIKIN, I.A.; LIANGUZOVA, M.S.; POSPELOV, V.A. Anti-proliferative effect of histone deacetylase inhibitors on murine embryonic stem cells. **Tsitologiya**, v. 48(8), p. 674–683, 2006.

CIBELLI, J.B.; STICE, S.L.; GOLUEKE, P.J.; KANE, J.J.; JERRY, J.; BLACKWELL, C.; PONCE DE LEÓN, F.A.; ROBL, J.M. Transgenic bovine chimeric offspring produced from somatic cell-derived stem-like-cells. **Nat. Biotechnol.** , v.16, p.642–646, 1998.

CONLON, F.L.; LYONS, K.M.; TAKAESU, N.; BARTH, K.S.; KISPERS, A.; HERRMANN, B.; ROBERTSON, E.J. A primary requirement for nodal in the

formation and maintenance of the primitive streak in the mouse. **Development**, v. 120, p. 1919–1928, 1994.

COUCOUVANIS, E.; MARTIN, G.R. Signals for death and survival: A two-step mechanism for cavitation in the vertebrate embryo. **Cell**, v. 83, p. 279–287, 1995.

DAI, B.; RASMUSSEN, T.P. Global epiproteomic signatures distinguish embryonic stem cells from differentiated cells. **Stem Cells**, v. 25, p. 2567-2574, 2007.

DANI, C.; SMITH, A.G.; DESSOLIN, S.; LEROY, P.; STACCINI, L.; VILLAGEOIS, P.; DARIMONT, C.; AILHAUD, G. Differentiation of embryonic stem cells into adipocytes in vitro. **Journal of Cell Science**, v. 110, p. 1279-1285, 1997.

DINSMORE, J.; RATLIFF, J.; JACOBY, D.; WUNDERLICH, M.; LINDBERG, C. Embryonic stem cells as a model for studying regulation of cellular differentiation. **Theriogenology**, v. 49, p. 145-151, 1998.

DOETSCHMAN, T.C.; EISTETTER, H.; KATZ, M.; SCHMIDT, W.; KEMLER, R. The in vitro development of blastocyst-derived embryonic stem cell lines: formation of visceral yolk sac, blood islands and myocardium. **J Embryol Exp Morphol**, v. 87, P. 27-45, 1985.

DUNCAN, S.A.; NAVAS, M.A.; DUFORT, D.; ROSSANT, J.; STOFFEL, M. Regulation of a transcription factor network required for differentiation and metabolism. **Science**, v. 281, p. 692-695, 1998.

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

FINCH, B.W.; EPHRUSI, B. Retention of multiple developmental potentialities by cells of a mouse testicular teratocarcinoma during prolonged culture in vitro and their extinction upon hybridization with cells of permanent lines. **Proc. Natl Acad. Sci. USA** v. 57, p. 615 – 622, 1967.

FISCHLE, W.; KIERMER, V.; DEQUIEDT, F.; VERDIN, E. The emerging role of class II histone deacetylases. **Biochem. Cell Biol.**, v. 79, p. 337-348, 2001.

GADUE, P.; HUBER, T.L.; NOSTRO, M.C.; KATTMAN, S.; KELLER, G.M. Germ layer induction from embryonic stem cells. **Exp Hematol.**, v. 33(9), p. 955-964, 2005.

GARCIA, J. M.; SMITH, L.C. Obtenção de "embryonic stem cells" murinas com marcador no DNA mitocondrial para NZB Heteroplásmicas NZB/BIC57 e transmissão para os descendentes. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE

BRASILEIRA DE TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES, 1998, Atibaia. **Arq. Fac. Vet. UFRGS**, v. 26, p. 278-279, 1998.

GARDNER, R.L.; ROSSANT, J. Investigation of the fate of 4–5 day post-coitum mouse inner cell mass cells by blastocyst injection. **J. Embryol. Exp. Morphol.**, v. 52, p. 141–152, 1979.

GINSBURG, M.; SNOW, M.H.; McLAREN, A. Primordial germ cells in the mouse embryo during gastrulation. **Development**, v.110, p. 521–528, 1990.

GOLOB, J.L.; PAIGE, S.L.; MUSKHELI, V.; PABON, L.; MURRY, C.E. Chromatin remodeling during mouse and human embryonic stem cell differentiation. **Developmental Dynamics**, v. 237, p. 1389-1398, 2008.

GOODSELL, D. The molecular perspective: histone deacetylase. **Stem Cells**, v. 21, p. 620-621, 2003.

GOSSLER, A.; JOYNER, A.L.; ROSSANT, J.; SKARNES, W.C. Mouse embryonic stem cells and reporter constructs to detect developmentally regulated genes. **Science**, v. 244, p. 463-466, 1989.

GOULDING, M.D.; CHALEPAKIS, G.; DEUTSCH, U.; ERSELIUS, J.R.; GRUSS, P. Pax-3, a novel murine DNA binding protein expressed during early neurogenesis. **Embo J**, v. 10, p.1135-47, 1991.

GREGORY, R.I.; O'NEIL, L.P.; RANDALL, T.E.; FOURNIER, C.; KHOSLA, S.; TURNER, B.M.; FEIL, R. et al. Inhibition of histone deacetylases alters allelic chromatin conformation at the imprinted U2á1-rs1 locus in mouse embryonic stem cells. **J Biol Chem**, v. 277(14), p. 11728-11734, 2002.

GROZINGER, C. M.; SCHREIBER, S.L. Deacetylase enzymes: biological functions and the use of small-molecule inhibitors. **Chem. Biol.**, v.9, p. 3–16, 2002.

HAMAZAKI, T.; LIBOSHI, Y.; OKA, M.; PAPST, P.J.; MEACHAM, A.M.; ZON, L.I.; TERADA, N. Hepatic maturation in differentiating embryonic stem cells in vitro. **FEBS Lett.**, v. 497, p. 15–19, 2001.

HATTORI, N.; NISHINO, K.; KO, Y.G.; HATTORI, N.; OHGANE, J.; TANAKA, S.; SHIOTA, K. Epigenetic control of mouse Oct-4 gene expression in embryonic stem cells and trophoblast stem cells. **J Biol Chem**, v. 279, p. 17063-17069, 2004.

HAUB, O; GOLDFARB, M. Expression of the fibroblast growth factor-5 gene in the mouse embryo. **Development**, v. 112, p. 397–406, 1991.

HAUSER, C.; SCHUETTENGROBER, B.; BARTL, S.; LAGGER, G.; SEISER, C. Activation of the mouse histone deacetylase 1 gene by cooperative histone phosphorylation and acetylation. **Mol. Cell. Biol.**, v. 22, p. 7820–7830, 2002.

HESCHELER, J.; FLEISCHMANN, B.K.; LENTINI, S.; MALTSEV, V.A.; ROHWEDEL, J.; WOBUS, A.M.; ADDICKS, K. Embryonic stem cells: A model to study structural and functional properties in cardiomyogenesis. **Cardiovasc. Res.**, v. 36, p. 149–162, 1997.

HOFFMAN, P.N. Distinct roles of neurofilament and tubulin gene expression in axonal growth. **Ciba Found. Symp.**, v.138, p.192-204, 1988.

HOGAN, B.L. Bone morphogenetic proteins: Multifunctional regulators of vertebrate development. **Genes & Dev.**, v. 10, p. 1580–1594, 1996.

HOPFL, G.; GASSMANN, M.; DESBAILLETS, I. Differentiating embryonic stem cells into embryoid bodies. *Methods Mol Biol* 2004;254:79 –98. In: Schatten H, ed. **Germ Cell Protocols, Vol. 2: Molecular Embryo Analysis, Live Imaging, Transgenesis, and Cloning**. Totowa, NJ: Humana Press Inc. 79-98, 2004.

HOSSEINKHANI, M.; HASEGAWA, K.; ONO, K. Trichostatin A induces myocardial differentiation of monkey ES cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 356, p. 386-391, 2007.

HSIEH, J.; NAKASHIMA, K.; KUWABARA, T.; MEJIA, E.; GAGE, F.H. Histone deacetylase inhibition-mediated neuronal differentiation of multipotent adult neural progenitor cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 101, p. 16659-16664, 2004.

HUBNER, K.; FUHRMANN, G.; CHRISTENSON, L.K.; KEHLER, J.; REINBOLD, R.; DE LA FUENTE, R.; WOOD, J.; STRAUSS III, J.F.; BOIANI, M.; SCHOELER, H.R. Derivation of oocytes from mouse embryonic stem cells. **Science**, v. 300, p. 1251–1256, 2003.

HUEBERT, D.J.; BERNSTEIN, B.E. Genomic views of chromatin. **Curr. Opin. Genet. Dev.**, v. 15(5), p. 476-481, 2005.

ILLMENSEE, K.; MINTZ, B. Totipotency and normal differentiation of single teratocarcinoma cells cloned by injection into blastocysts. **Proc. Natl Acad. Sci. USA**, v. 73, p. 549 – 553, 1976.

INOKOSHI, J.; KATAGIRI, M.; ARIMA, S.; TANAKA, H.; HAYASHI, M.; KIM, Y.B.; FURUMAI, R.; YOSHIDA, M.; HORINOUCHE, S.; OMURA, S. Neuronal differentiation of neuro 2a cells by inhibitors of cell cycle progression, trichostatin A and butyrolactone I. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 256, p. 372-376, 1999.

JESSELL, T.M. Neuronal specification in the spinal cord: Inductive signals and transcriptional codes. **Nat. Rev. Genet.** , v. 1(1), p. 20-29, 2000.

JOHNSTONE, R.W. Histone-deacetylase inhibitors: novel drugs for the treatment of cancer. **Nat. Rev. Drug Discov.**, v.1, p. 287-299, 2002.

KARAMBOULAS, C.; SWEDANI, A.; WARD, C.; AL-MADHOUN, A.S.; WILTON, S.; BOISVENUE, S.; RIDGEWAY, A.G.; SKERJANC, S. HDAC activity regulates entry of mesoderm cells into the cardiac muscle lineage. **Journal of Cell Science**, v. 119, p. 4305-4314, 2006.

KAWAI, T.; TAKAHASHI, T.; ESAKI, M.; USHIKOSHI, H.; NAGANO, S.; FUJIWARA, H.; KOSAI, K. Efficient cardiomyogenic differentiation of embryonic stem cell by fibroblast growth factor 2 and bone morphogenetic protein 2. **Circ. J.** , v. 68, p. 691–702, 2004.

KAWAMURA, T.; ONO, K.; MORIMOTO, T.; WADA, H.; HIRAI, M.; HIDAKA, K.; MORISAKI, T.; HEIKE, T.; NAKAHATA, T.; KITA, T.; HASEGAWA, K. Acetylation of GATA-4 is involved in the differentiation of embryonic stem cells into cardiac myocytes. **J Biol Chem**, v. 280(20), p. 19682-19688, 2005.

KAWASAKI, H.; MIZUREKI, K.; NISHIKAWA, S.; KANEKO, S.; KUWANA, Y.; NAKANISHI, S.; NISHIGAMA, S.I.; SASAI, Y. Induction of midbrain dopaminergic neurons from ES cells by stromal cell-derived inducing activity. **Neuron** , v. 28, p. 31–40, 2000.

KEEFER, C.L., STICE, S.I., MATTHEWS, D.L. Bovine inner cell mass cells as donor nuclei in the production of nuclear transfer embryos and calves. **Biol. Reprod.**, v.50, p.935-9, 1994.

KELLER, G. Embryonic stem cell differentiation: emergence of a new era in biology and medicine. **Genes & Development**, v.19, p.1129-1155, 2005.

KIM, J.H.; AUERBACH, J.M.; RODRIGUEZ-GOMEZ, J.A.; VELASCO, I.; GAVIN, D.; LUMELSKY, N.; LEE, S.H.; NGUYEN, J.; SANCHEZ-PERNAUTE, R.; BANKIEWICZ, K.; MCKAY, R. Dopamine neurons derived from embryonic stem cells function in an animal model of Parkinson's disease. **Nature**, v. 418, p. 50–56, 2002.

KINDER, S.J.; TSANG, T.E.; QUINLAN, G.A.; HADJANTONAKIS, A.K.; NAGY, A.; TAM, P.P. The orderly allocation of mesodermal cells to the extraembryonic structures and the anteroposterior axis during gastrulation of the mouse embryo. **Development**, v. 126(1), p. 77-90, 2000.

KLEINSMITH, L.J.; COCHRAN, N.A. Multipotentiality of single embryocarcinoma cells. **Cancer Res.** v. 24, p. 1544 – 1551, 1964.

KOYAMA, Y.; ADACHI, M.; SEKIYA, M.; TAKEKEWA, M.; IMAI, K. Histone deacetylase inhibitors suppress IL-2-mediated gene expression prior to incuption of apoptosis. **Blood**, v. 96, p. 1490-1495, 2000.

KOUZARIDES, T. Chromatin modifications and their function. **Cell**, v. 128, p. 693 705, 2007.

KUBO, A.; SHINOZAKI, K.; SHANNON, J.M.; KOUSKOFF, V.; KENNEDY, M.; WOO, S.; FEHLING, H.J.; KELLER, G. 2004. Development of definitive endoderm from embryonic stem cells in culture. **Development** , v. 131, p. 1651–1662, 2004.

LAGGER, G.; O'CARROL, D.; REMBOLD, M.; KHIER, H.; TISCHLER, J.; WEITZER, G.; SCHUETTENGROBER, B.; HAUSER, C.; BRUNMEIR, R.; JENUWEIN, T.; SEISER, C. Essential function of histone deacetylase 1 in proliferation control and CDK inhibitor repression. **Embo. J.**, v. 21, p. 2672–2681, 2002.

LEE, J.H.; HART, S.R.L.; SKALNIK, G. Histone deacetylase activity is required for embryonic stem cell differentiation. **Genesis**, v. 38, p.32-38, 2004.

LEI, H.; OH, S.P.; OKANO, M.; JUTTERMANN, R.; GOSS, K.A.; JAENISCH, R.; LI, E. De novo DNA cytosine methyltransferase activities in mouse embryonic stem cells. **Development**, v. 122, p. 3195–3205, 1996.

LEND AHL, U.; ZIMMERMAN, L.B.; MCKAY, R.D. CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. **Cell** , v. 60, p. 585–595, 1990.

LI, E. Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development. **Nat. Rev. Genet.**, v. 3, p. 662–673, 2002.

LI, Z.L.; LILIENBAUM, A.; BUTLER-BROWNE, G.; PAULIN, D. Human Desmin-coding gene: complete nucleotide sequence, characterization and regulation of expression during myogenesis and development. **Gene**, v.78, p. 243-254, 1989.

LIN, R.Y.; KUBO, A.; KELLER, G.M.; DAVIES, T.F. Committing embryonic stem cells to differentiate into thyrocytelike cells in vitro. **Endocrinology**, v. 144, p. 644–2649, 2003.

MALTSEV, V.A.; ROHWEDEL, J.; HESCHELER, J.; WOBUS, A.M. Embryonic stem cells differentiate in vitro into cardiomyocytes representing sinusnodal, atrial and ventricular cell types. **Mech. Dev.**, v. 44, p. 41–50, 1993.

MARIN-HUSSTEGE, M.; MUGGIRONI, M.; LIU, A.; CASACCIA-BONNEFIL, P. Histone deacetylase activity is necessary for oligodendrocyte lineage progression. **J Neurosci**, v. 22, p. 10333-10345, 2002.

MARKS, P.A.; RICHON, V.M.; BRESLOW, R.; RIFKIND, R.A. Histone deacetylase inhibitors as new cancer drugs. **Curr. Opin. Oncol.**, v. 13(6), p. 477-483, 2001.

MARTIN, C.; ZHANG, Y. The diverse functions of histone lysine methylation. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.**, v. 6, 838 849, 2005.

MARTIN, G. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** v.78, p.7634-7638, 1981.

MCCOOL, K. W.; XU, X.; SINGER, D.B.; MURDOCH, F.E.; FRITSCH, M.K. The role of histone acetylation in regulating early gene expression patterns during early embryonic stem cell differentiation. **J Biol Chem**, v. 282, no 9, p. 6696-6706, 2007.

MCDONALD, J.W.; LIU, X.Z.; QU, Y.; LIU, S.; MICKEY, S.K.; TURETSKY, D.; GOTTLIEB, D.I.; CHOI, D.W. Transplanted embryonic stem cells survive, differentiate and promote recovery in injured rat spinal cord. **Nat. Med.**, v. 5, p.1410-1412, 1999.

MESHORER, E.; YELLAJOSHULA, D.; GEORGE, E.; SCAMBLER, P.J.; BROWN, D.T.; MISTELI, T. Hyperdynamic plasticity of chromatin proteins in pluripotent embryonic stem cells. **Dev Cell.**, v. 10(1), p. 1-2, 2006.

MESHORER, E.; MISTELI, T. Chromatin in pluripotent embryonic stem cells and differentiation. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.**, v. 7, p. 540 546, 2006.

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

MÜLLER, M., BREM, G. Transgenic strategies to increase disease resistance in livestock. **Reprod. Fert. Dev.**, v.6, p.605-13, 1994.

NAKANO, T.; KODAMA, H.; HONJO, T. 1994. Generation of lymphohematopoietic cells from embryonic stem cells in culture. **Science** , v. 265, p. 1098–1101, 1994.

NISHIKAWA, S.; NISHIKAWA, S.; HIRASHIMA, M.; MATSUYOSHI, N.; KODAMA, H. 1998. Progressive lineage analysis by cell sorting and culture identifies FLK+VE-cadherin cells at a diverging point of endothelial and hemopoietic lineages. **Development**, v. 125, p. 1747–1757, 1998.

NICHOLS, J.; ZEVIK, B.; ANASTASSIADIS, K.; NIWA, H.; KLEWE-NEBENIUS, D.; CHAMBERS, I.; SCHOLER, H.; SMITH, A. Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct-4. **Cell**, v. 95, p.379-391, 1998.

NICHOLS, J.; EVANS, E.P.; SMITH, A.G. Establishment of germ-line-competent embryonic stem (ES) cells using differentiation inhibiting activity. **Development**, v.110, p.1341-8, 1990.

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

ODORICO, J.S.; KAUFMAN, D.S.; THOMSON, J.A. Multilineage differentiation from human embryonic stem cell lines. **Stem Cells**, v.19, p.193-204, 2001.

OKABE, S.; FORSBERG-NILSSON, K.; SPIRO, A.C.; SEGAL, M.; MCKAY, R.D. 1996. Development of neuronal precursor cells and functional postmitotic neurons from embryonic stem cells in vitro. **Mech. Dev.**, v. 59, p. 89–102, 1996.

OKANO, M.; BELL, D.W.; HABER, D.A.; Li, E. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. **Cell**, v. 99, p. 247–257, 1999.

PAULA-LOPES, F.F.; HANSEN, P.J. Heat shock-induced apoptosis in preimplantation bovine embryos is a developmentally regulated phenomenon. **Biology of Reproduction**, v.66, p. 1169-1177, 2002.

PARMACEK, M.S.; LEIDEN, J.M. Structure and expression of the murine slow/cardiac troponin C gene. **J. Biol. Chem.**, v.264, p. 13217-13225, 1989.

PERRY, P.; SAUER, S.; BILLON, N.; RICHARDSON, W.D.; SPIVAKOV, M.; WARNES, G.; LIVESEY, F.J.; MERKENSCHLAGER, M.; FISHER, A.G.; AZUARA, V. A dynamic switch in the replication timing of key regulator genes in embryonic stem cells upon neural induction. **Cell Cycle** 3: 12, 1645-1650; 2004.

POLIARD, A.; NIFUJI, A.; LAMBLIN, D.; PLEE, E.; FOREST, C.; KELLERMANN, O. Controlled conversion of an immortalized mesodermal progenitor cell towards osteogenic, chondrogenic, or adipogenic pathways. **J. Cell Biol.**, v. 130, p.1461-1472, 1995.

REHEN, S.K.; KINGSBURY, M.A.; ALMEIDA, B.S.V.; HERR, D.R.; PETERSON, S.; CHUN, J. A new method of embryonic culture for assessing global changes in brain organization. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 158, p. 100-108, 2006.

RIPPON, H.J.; BISHOP, A.E. Embryonic stem cells. **Cell Prolif.** v. 37, p. 23 – 34, 2004.

ROBERTSON, E.J. Embryo-derived stem cell lines. In:____. **Teratocarcinomas and embryonic stem cells: a practical approach**. Oxford: IRL Press, p.71-112, 1987.

ROGERS, M.B.; HOSLER, B.A.; GUDAS, L.J. 1991. Specific expression of a retinoic acid-regulated, zinc-finger gene, Rex-1, in preimplantation embryos, trophoblast and spermatocytes. **Development** , v. 113, p. 815–824, 1991.

ROHWEDEL, J.; SEHLMAYER, U.; SHAN, J.; MEISTER, A.; WOBUS, A.M. Primordial germ cell-derived mouse embryonic germ (EG) cells in vitro resemble undifferentiated stem cells with respect to differentiation capacity and cell cycle distribution. **Cell Biol. Int.**, v. 20, p. 579–587, 1996.

ROSSANT, J. 1977. Cell commitment in early rodent development. **Dev. Mamm.**, v. 2, p. 119–150, 1977.

SAUDERS, N.; DICKER, A.; POPA, C.; JONES, S.; DAHLIER, A. Histone deacetylase inhibitors as potential anti-skin cancer agents. **Cancer Res.**, v. 59, p. 399-404, 1999.

SCHUBELER, D.; MACALPINE, D.M.; SCALZO, D.; WIRBELAUER, C.; KOOPERBERG, C.; VAN LEEUWEN, F.; GOTTSCHLING, D.E.; O'NEIL, L.P.; TURNER, B.M.; DELROW, J.; BELL, S.P.; GROUDINE, M. The histone modification pattern of genes revealed through genome-wide chromatin analysis of a higher eukaryote. *Genes Dev*, v. 18(11), p. 1263-1271, 2004.

SCHULDINER, M.; YANUKA, O.; ITSKOVITZ-ELDOR, J.; MELTON, D.A.; BENVENISTY, N. Effects of eight growth factors on the differentiation of cells derived from human embryonic stem cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 97, p.11307-11312, 2000.

SKERJANC, I.S. Cardiac and skeletal muscle development in P19 embryonal carcinoma cells. **Trends Cardiovasc. Med.**, v. 9, p. 139–143, 1999.

SMITH, A. Cell therapy: in search of pluripotency. **Curr. Biol.** v. 8, p. 802 – 804, 1998.

SORIA, B.; ROCHE, E.; BERNA, G.; LEÓN-QUINTO, T.; REIG, J.A.; MARTIN, F. Insulin-secreting cells derived from embryonic stem cells normalize glycemia in streptozotocin- induced diabetic mice. **Diabetes**, v.49, p.157-162, 2000.

STEFANOVA, I. et al. Monoclonal antibodies against human alphafetoprotein. Exploitation of an unusual calcium-dependent interaction with the antigen for analytical and preparative purposes. **J. Immunol. Methods**, v. 111, p. 67-73, 1988.

STICE, S., STRELCHENKO, N., BETTHAUSER, J. et al. Bovine pluripotent embryonic cells contribute to nuclear transfer and chimeric fetuses. **Theriogenology**, v.41, p.301, 1994.

TACHIBANA, M.; SUGIMOTO, K.; NOZAKI, M.; UEDA, J.; OHTA, T.; OHKI, M.; FUKUDA, M.; TAKEDA, N.; NIIDA, H.; KATO, H.; SHINKAI, Y. G9a histone methyltransferase plays a dominant role in euchromatic histone H3 lysine 9 methylation and is essential for early embryogenesis. **Genes Dev.**, v. 16, p. 1779–1791, 2002.

TAM, P.P.; BEHRINGER, R.R. Mouse gastrulation: The formation of a mammalian body plan. **Mech. Dev.**, v. 68, p. 3–25, 1997.

THE PRESIDENT'S CONCIL ON BIOETHICS. Monitoring stem cell research, A Report of The President's Council on Bioethics, 433 pp, disponível em: (<http://www.bioethics.gov>) Washington, D.C., 2004, acessado em setembro de 2006.

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, p. 1145 – 1147, 1998.

TOYOOKA, Y.; TSUNEKAWA, N.; AKASU, R.; NOCE, T. Embryonic stem cells can form germ cells in vitro. **Proc.Natl. Acad. Sci.**, v. 100, p. 11457–11462, 2003.

TROPEPE, V.; HITOSHI, S.; SIRARD, C.; MAK, T.W.; ROSSANT, J.; VAN DER KOOY, D. 2001. Direct neural fate specification from embryonic stem cells: A primitive mammalian neural stem cell stage acquired through a default mechanism. **Neuron** , v. 30, p. 65–78, 2001.

TURNER, B.M. Cellular memory and the histone code. **Cell**, v. 111, p. 285-291, 2002.

TURNER, B.M.; DELROW, J.; BELL, S.P.; GROUDINE, M. The histone modification pattern of active genes revealed through genome-wide chromatin analysis of a higher eukaryote. **Genes Dev.**, v. 18, p. 1263 1271, 2004.

UEDA, K.; KOMANO, T. Sequence-specific DNA damage induced by reduced mitomycin C and 7-N-(p-hydroxyphenyl) mitomycin C. **Nucleic Acids Res.**, v. 12(17), p. 6673-6683, 1984.

VAN HOLDE, K.E. **Chromatin**. Springer, 1988.

VENTURA, C.; MAIOLI, M. Opioid peptide gene expression primes cardiogenesis in embryonal pluripotent stem cells. **Circ. Res.**, v. 87(3), p. 189-194, 2000.

VERDONE, L.; CASERTA, M.; DI MAURO, E. Role of histone acetylation in the control of gene expression. **Biochem. Cell Biol.**, v. 83(3), p. 344-353, 2005.

WAKAYAMA, T.; RODRIGUEZ, I.; PERRY, A.C.F.; YANAGIMACHI, R.; MOMBAERTS, P. Mice cloned from embryonic stem cells. **Proc. Acad. Sci. USA**, v.96, p.14984-9, 1999.

WALTHER, C.; GRUSS, P. Pax-6, a murine paired box gene, is expressed in the developing CNS. **Development**, v. 113, p. 1435-49, 1991.

WATT, F.M.; HOGAN, B.L. Out of Eden: Stem cells and their niches. **Science** , v. 287, p. 1427-1430, 2000.

WILLIAMS, R.L.; HILTON, D.J.; PEASE, S.; WILLSON, T.A.; STEWART, C.I.; GEARING, D.P.; WAGNER, E.F.; METCALF, D.; NICOLA, N.A.; GOUGH, N.M. Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells. **Nature** v. 36, p. 684 – 687, 1988.

WILMUT, I., WHITELOW, C.B.A. Strategies for production of pharmaceutical proteins in milk. **Reprod. Fertil. Dev.**, v.6, p.625-30, 1994.

WOBUS, A.M.; GUAN, K.; YANG, H.T., BOHELER, K.R. Embryonic stem cells as a model to study cardiac, skeletal muscle, and vascular smooth muscle cell differentiation. **Methods Mol. Biol.** , v. 185, p. 127–156, 2002.

WOBUS, A.M.; WALLUKAT, G.; HESCHLER, J. Pluripotent mouse embryonic stem cells are able to differentiate into cardiomyocytes expressing chronotropic responses to adrenergic and cholinergic agents and Ca²⁺ channel blockers. **Differentiation**, v. 48, p.173-182, 1991.

WOBUS, A.M.; KAOMEI, G.; SHAN, J.; WELLNER, M.C.; ROHWEDEL, J.; JI GUANJU; FLEISCHMANN, B.; KATUS, H.A.; HESCHELER, J.; FRANZ, W.M. Retinoic acid accelerates embryonic stem cell-derived cardiac differentiation and enhances development of ventricular cardiomyocytes. **J Mol Cell Cardiol**, v.29(6), p. 1525-1539, 1997.

XU, N.; TSAI, C.L.; LEE, J.T. Transient homologous chromosome pairing marks the onset of X inactivation. **Science**, v. 311, p. 1149 1152, 2006.

YAMADA, T.; YOSHIKAWA, M.; TAKAKI, M.; TORIHASHI, S.; KATO, Y.; NAKAJIMA, Y.; ISHIZAKA, S.; TSUNODA, Y. 2002. In vitro functional gut-like organ formation from mouse embryonic stem cells. **Stem Cells**, v. 20, p. 41–49, 2002.

YANG, P.K.; KURODA, M.I. Noncoding RNAs and intranuclear positioning in monoallelic gene expression. **Cell**, v. 128, p. 777–786, 2007.

ZHANG, Y.; LI, J.; VILLEMOES, K.; PEDERSEN, A.M.; PURUP, S.; VAJTA, G. An epigenetic modifier results in improved in vitro blastocyst production after somatic cell nuclear transfer. **Cloning and Stem Cells**, v.9(3), p.357-364, 2007.

ZHAO, X.; RUAN, Y.; WEI, C.L. Tackling the epigenome in the pluripotent stem cells. **J. Genet. Genomics**, v. 35, p. 403-412, 2008.

ZÚCCARI, C.E.S.N. **Efeito da criopreservação sobre a integridade estrutural da célula espermática equina**. 1998. 121p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária). Universidade Estadual Paulista – UNESP – Botucatu, 1998.

ZUPKOVITZ, G.; TISCHLER, J.; POSCH, M.; SADZAK, I.; RAMSAUER, K.; EGGER, G.; GRAUSENBURGER, R.; SCHWEIFER, N.; CHIOCCA, S.; DECKER, T.; SEISER, C. Negative and positive regulation of gene expression by mouse histone deacetylase 1. **Mol Cell Biol**, v. 26 n21, p.7913-7928, 2006.

APÊNDICE A

RELAÇÃO DOS MEIOS E SOLUÇÕES UTILIZADOS

Todos os reagentes utilizados foram da MERK, exceto quando mencionado.

A.1 DMEM Estoque

Reagentes	1 L
DMEM (envelope GIBCO BRL Cat. 12100-046)	1
Bicarbonato de Sódio (NaHCO ₃)	3,7 g
Água Milli-Q	1 L

Filtrar em membrana de 22 µm e armazenar em geladeira.

A.2 DMEM FPM

Reagentes	50 mL
DMEM Estoque (A.1)	45 mL
SFB (Cripion Cell Culture, Andradina SP)	5 mL
Sulfato de Amicacina (Eurofarma) (15 µg/µL)	250 µL

Filtrar em membrana de 22 µm e armazenar em geladeira.

A.3 DMEM CTE

Componentes	10 mL
DMEM Estoque (A.1)	8,5 mL
Piruvato Sódico (A.14)	100 µL
Knockout Serum Replacement (GIBCO BRL Cat. 10829-018)	1,5 mL
Aminoácidos não essenciais 10 mM (A.15)	100 µL
L-Glutamina 200mM (A.16)	100 µL
2-mercaptoetanol 0,01 mM (A.17)	100 µL
Sulfato de Amicacina (Eurofarma) (15 µg/µL)	250 µL

Acrescentar 10⁴ unidades de ESGRO LIF (CHEMICON Cat. ESG-1106). Filtrar em membrana de 22 µm.

A.4 DMEM CTE SFB

Reagentes	10 mL
DMEM Estoque (A.1)	8,5 mL
Piruvato Sódico (A.14)	100 µL
SFB	1,5 mL
Aminoácidos não essenciais 10 mM (A.15)	100 µL
L-Glutamina 200mM (A.16)	100 µL
2-mercaptoetanol 0,01 mM (A.17)	100 µL
Sulfato de Amicacina (Eurofarma) (15 µg/µL)	250 µL

A.5 DMEM TSA 15nM, 50nM, 100nM e 150nM

Reagentes	15nM (10mL)	50nM (10mL)	100nM (10mL)	100nM (10mL)
DMEM CTE SFB (A.4)	10 mL	10 mL	10 mL	10 mL
Solução TSA para uso (A.7)	1,5 µL	5 µL	10 µL	10 µL

A.6 Estoque TSA

Reagentes	10 mL
Tricostatina A (SIGMA Cat. T8552)	1mg
Etanol	1mL

A.7 Solução TSA para uso

Reagentes	10 mL
DMEM CTE SFB (A.4)	32µL
Estoque TSA (A.6)	1µL

A.8 Meio de Congelação

Reagentes	10 mL
SFB	10 mL
DMSO (MERK Cat. 1029521000)	1mL
Sulfato de Amicacina (Eurofarma) (15 µg/µL)	50µL
Filtrar em membrana de 22 µm e manter sob refrigeração.	

A.9 PBS-L (livre de Ca⁺² e Mg⁺²)

Componentes	1 L
NaCl	10g
KCl	0,25g
Na ₂ PO ₄ .12H ₂ O	1,44g
KH ₂ PO ₄	0,25g
Água milli-Q	1 L
Ajustar o pH para 7,2 e filtrar em membrana de 22µm.	

A.10 Solução Tripsina 2,5%

Reagentes	100 mL
Tripsina (GIBCO BRL Cat. 27250-042)	2,5g
EDTA	0,4g
NaCl	7,0g
Na ₂ PO ₄ .12H ₂ O	0,3g
KH ₂ PO ₄	0,24g
KCl	0,37g
D-Glicose	1,0g
TRIS	3,0g
Vermelho fenol (SIGMA Cat. P5530)	0,005g
Água milli-Q	100 mL
Ajustar o pH para 7,6, filtrar em membrana de 22 µm e estocar a –20° C.	

A.11 Solução Tripsina 0,025%

Reagentes	1 L
Solução Tripsina 2,5% (A.10)	10mL
Solução de Puck's (A.12)	1 L

A.12 Solução de Puck's

Reagentes	100 mL
NaCl	8,0g
KCl	0,4g
NaHCO ₃	0,35g
Glucose	1,0g
Vermelho fenol	0,005g
EDTA	0,2g
Água milli-Q	1 L

Adicionar os componentes sob agitação por 15 minutos, ajustar o pH para 7,2, filtrar em membrana de 22 µm e estocar a 4° C

A.13 Solução de Mitomicina-C 10µg/mL

Reagentes	200 mL
Mitomicina-C (SIGMA Cat. M4287)	2g
DMEM Estoque	190mL
SFB	10mL
Sulfato de Amicacina (Eurofarma) (15 µg/µL)	1 mL

Filtrar em membrana de 22 µm e estocar a -20° C, protegido da luz.

A.14 Solução de Piruvato Sódico

Componentes	1 mL
Piruvato Sódico (SIGMA Cat. P4562)	0,011g
Água milli-Q	1mL

A.15 Solução de aminoácidos não-essenciais

Reagentes	100 mL
Água milli-Q	100 mL
L-Alanina (10mM) (SIGMA Cat. A3534)	0,089g
L-Asparagina (10mM) (SIGMA Cat. A4284)	0,150g
L-Ácido Aspártico (10mM) (RIEDEL-DE HAEN Cat. 27608)	0,133g
L-Prolina (10mM) (SIGMA Cat. P4655)	0,115g
L-Serina (10mM) (SIGMA Cat. S5511)	0,105g
L-Ácido Glutâmico (9mM) (SIGMA Cat. G5889)	0,147g
Glicina (10mM) (SIGMA Cat. G6388)	0,075g

Os aminoácidos L-ácido glutâmico e glicina devem ser dissolvidos separadamente em água milli-Q. Os componentes em solução ácida de HCl (pH = 1,5). Filtrar em membrana de 0,22µm e estocar na geladeira.

A.16 Solução de L-glutamina

Componentes	1 mL
L-glutamina (SIGMA Cat. G3126)	0,0292g
Água milli-Q	1 mL

A.17 Solução de 2-Mercaptoetanol

Componentes	10 mL
2-mercaptoetanol (0,1mM) (SIGMA Cat. M7522)	7,2 µL
PBS-L (A.9)	10 mL

Filtrar em membrana de 22 µm.

A.18 Solução estoque de HOECHST

Componentes	10 mL
HOECHST (bisbenzímide) (SIGMA Cat. B2261)	0,001g
PBS-L (A.9)	1 mL
PVA	0,001g

A.19 Solução HOECHST pronta para uso

Componentes	10 mL
Solução estoque HOECHST (A.18)	10µL
PBS-L (A.9)	1 mL

A.20 Solução estoque de AR

Componentes	10 mL
Ácido retinóico (SIGMA Cat. R2625)	0,015022g
DMSO	300 µL

A.21 Solução DIC/IP

Componentes	1.5 mL
Solução de diacetato de carboxifluoresceína 0.5% em DMSO	160 µL
Solução de iodeto de propídeo 50% em PBS-L	80 µL
Solução de formol a 4%	80 µL
Solução de citrato de sódio a 0,03% em PBS-L	1.180 mL

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](#)