

ATIVACÃO PARTENOGENÉTICA DE OÓCITOS BOVINOS COMO MODELO PARA DERIVAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO EMBRIONÁRIAS HUMANAS COM GRAU CLÍNICO

RAFAEL DA ROCHA RUGGERI¹ FLÁVIO VIEIRA MEIRELLES², FABIANA BRESSAN MARTINI² YEDA F. WATANABE³, CARLOS EDUARDO AMBROSIO², PATRICIA PRANKE⁴ ADRIANA BOS-MIKICH¹



¹Departamento de Ciências Morfológicas, ICBS, UFRGS
³Vitrogen, Cravinhos, SP

² Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos FZEA/USP
⁴ Laboratório de Hematologia e Células-tronco, Faculdade de Farmácia, UFRGS, RS.

Introdução: Embriões partenotes humanos geram todos tecidos embrionários evitando problemas éticos. Devido a escassez de material, poucos estudos dedicaram-se a ativação partenogenética de oócitos humanos. Oócitos bovinos são um bom modelo experimental para extrapolação de resultados aos humanos.

Objetivos: Produzir células-tronco partenogenéticas, a partir de oócitos bovinos como modelo para criação de linhagens humanas com grau clínico.

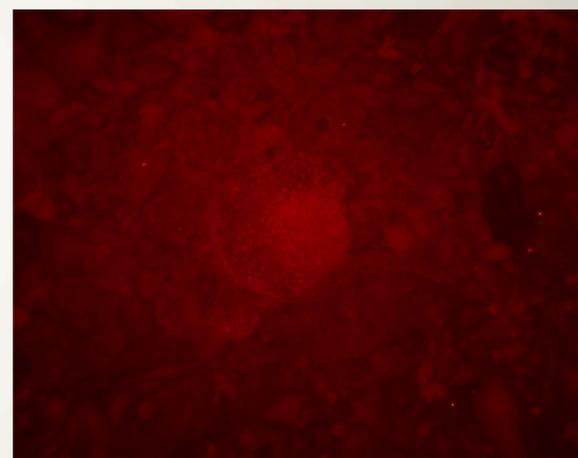
Materiais e Métodos: Oócitos bovinos foram aspirados de ovários de abatedouro e maturados por 24 horas em meio H199. Oócitos foram desnudados e expostos a ionomicina por 5 minutos e 6-DMAP por 3,5 horas. Após, avaliou-se taxa de clivagem com 48 horas de cultivo e formação de blastocisto com 168 horas de cultivo.

No dia-9 do desenvolvimento embrionário foi realizada microcirurgia dos blastocistos expandidos e/ou eclodidos, separando o botão embrionário do trofocitotoma, com um par de agulhas de insulina. A massa celular isolada foi colocada em um substrato definido de fibronectina para derivação em meio Stem-Pro[®]. As massas celulares aderidas foram cultivadas até formação de colônias, as quais foram mantidas em cultivo, recortadas quando confluentes e repassadas a novas fossas ou criopreservadas.

Resultados: Foram realizadas 10 ativações, a partir de 3312 oócitos, dos quais resultaram 1209 (36%) blastocistos. Após micromanipulação, 54 colônias de potenciais células-tronco partenogenéticas foram estabelecidas, 5 das quais foram congeladas, 13 foram testadas para fosfatase alcalina sendo 9 (70%) positivas para o teste, 3 colônias foram positivas para Oct-4 (100%) e as demais seguiram cultivo.

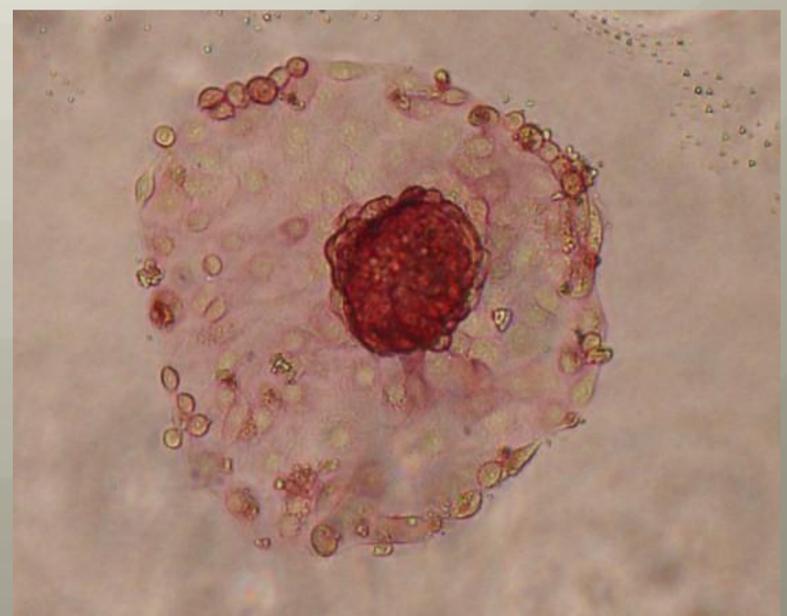
Apresentação da produção de embriões e derivação embrionária de Célula- Tronco embrionária

Tratamentos	Nº repetições	COC's	Clivagem (%)	Blastocisto D7 (%)	Numero de blastocistos derivados	Numero de colonias expandidas (%)
Parthenote	10	3312	3011 (91)	1209 (40)	350	54(20)
IVF	10	846	674 (79)	363 (43)	90	15 (17)



Colônia embrionária positiva para teste de Oct-4

Conclusão: Os resultados mostram que a ativação partenogenética usando ionomicina e 6-DMAP é um efetivo método para obtenção de embriões partenotes. Também, micromanipulação manual para isolamento da massa embrionária é uma boa alternativa para derivação celular em condições *xeno-free*.



Colônia embrionária positiva para teste de Fosfatase alcalina

