

INDUÇÃO DE NEUROGÊNESE IN VITRO A PARTIR DE CÉLULAS TRONCO EMBRIONÁRIAS DE CAMUNDONGO..

Paz AHR , Terraciano PB , Baldo G , Giugliani R , Matte U , Passos EP , Cirne-Lima EO . Laboratório de Pesquisa e Desenvolvimento em Reprodução, Centro de Terapia Gênica, . HCPA.

As células tronco embrionárias (ES) são células que podem ser obtidas da massa central ("inner cells mass") de embriões em estágio de blastocisto. Estas células possuem como principais características a possibilidade de se multiplicar infinitamente, in vitro, mantendo seu cariótipo estável; além da capacidade de se diferenciar em tipos celulares mais complexos tanto in vitro como in vivo. Em sistemas de cultura, quando as células ES são cultivadas na presença de aditivos adequados, estas podem se diferenciar seguindo diferentes vias de diferenciação celular, conforme a composição do meio e condições de cultura. A partir da adição de fatores de crescimento específicos, por exemplo, estas podem se diferenciar em todos os 200 tipos celulares presentes nos organismos, o que lhes confere um caráter de alta plasticidade. A partir da diferenciação, in vitro, as células ES variam não só na sua morfologia, como também na expressão de genes e proteínas específicas de tecidos diferenciados. Muitos protocolos para induzir a diferenciação celular foram estabelecidos, baseados nas seguintes técnicas: o método de "hanging drop" (Wobus et al., 1991, 1997), cultura em "mass culture" (Doetschman et al., 1985; Wartenberg et al., 1998) ou ainda através do cultivo utilizando metil –celulose (Wiles & Keller, 1991). A técnica utilizada por nosso grupo é a técnica de "hanging drops", ou "gotas suspensas", que consiste basicamente em agregar um número conhecido de células ES em gotas suspensas de 20 µl de meio de cultura, a fim de induzir a formação de corpúsculos embrionários. Os corpúsculos embrionários são então mantidos em cultura de suspensão com fatores de crescimento adequados e iniciam o processo de diferenciação celular in vitro. No presente trabalho, relatamos o estabelecimento do protocolo de indução de diferenciação de células tronco embrionárias e o sucesso na indução do direcionamento da diferenciação celular gerando células nervosas. A comprovação da natureza neuronal, das células obtidas a partir da indução de diferenciação de células ES, deu-se através da análise morfológica e através da detecção da expressão de genes típicos/marcadores de células nervosas por análise molecular (RT-PCR).