



Evento	Salão UFRGS 2013: SIC - XXV SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFRGS
Ano	2013
Local	Porto Alegre - RS
Título	Caracterização de uma linhagem de células-tronco embrionárias humanas para estudos futuros em terapia celular
Autor	PEDRO CERVO CALDERARO
Orientador	PATRICIA HELENA LUCAS PRANKE

Há dois tipos de células-tronco, as adultas e as embrionárias. As células-tronco adultas são obtidas de órgãos e tecidos diferenciados, como a gordura, o cordão umbilical e a polpa do dente. Possuem um potencial de diferenciação limitado, sendo denominadas multipotentes, ou seja, são capazes de se diferenciar apenas em alguns tipos celulares. As células-tronco embrionárias (CTE) são derivadas da massa celular interna de embriões no estágio de blastocisto. No caso de embriões humanos esses são obtidos em clínicas de reprodução assistida, após doação para pesquisa, através da assinatura de um termo de consentimento livre e esclarecido pelos genitores. Essas células possuem uma capacidade ilimitada de diferenciação, denominada de pluripotência, isto é, são capazes de se diferenciar em qualquer tipo celular do organismo. Após o processo de obtenção das CTE é muito importante que se realize a caracterização das células obtidas. A caracterização das células permite verificar a presença dos marcadores indicativos de pluripotência e também a sua capacidade de se diferenciar em diversos tipos celulares. Entre os testes mais comuns estão: imunofluorescência, para detectar marcadores de superfície ou fatores de transcrição específicos de pluripotência, a formação de corpos embrióides *in vitro*, para avaliação da sua capacidade de diferenciação, a reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa (RT-PCR) para detectar a expressão desses marcadores, a análise de cariótipo e formação de teratomas *in vivo*. O objetivo desse trabalho foi caracterizar uma linhagem de CTE humanas (CTEh), que serão futuramente utilizadas em experimentos com biomateriais produzidos por nanotecnologia. Foi utilizada uma linhagem comercial de CTEh já estabelecida a H9. Previamente ao descongelamento foi preparada uma placa com uma monocamada de fibroblastos embrionários murinos (MEFs) tratados com mitomicina C. As CTEh foram então descongeladas em banho-maria a 37°C e lavadas com meio de cultura (DMEM-F12) por centrifugação a 300xg por 5min. O pellet foi ressuspensionado e as células foram cultivadas sobre as MEFs. O meio base utilizado para manutenção das células foi o DMEM f-12 suplementado com Y-27632 (10 mM), FGF-β (4 ng/mL), soro Knockout 10%, aminoácidos não essenciais (0,1 mM) e β-mercaptoetanol (0,1 mM). As placas contendo as células foram armazenadas em estufa à 37°C com 5% CO₂ e 90% de umidade. Após 48 horas, o meio foi trocado e seguiu-se a troca diária do meio até o momento em que se formaram colônias indiferenciadas aptas para a primeira passagem. A caracterização teve início com a avaliação da atividade da fosfatase alcalina com o kit *Alkaline Phosphatase Live Stain* (Life Technologies). Por imunofluorescência foi feita a análise dos seguintes marcadores de pluripotência OCT4, SOX-2 e TRA-1-81. Também foi realizado o teste de formação de corpos embrióides. Essa avaliação foi feita de duas maneiras, primeiro com a formação de corpos embrióides aderidos e segundo com a formação de corpos embrióides suspensos ambos mantidos em cultivo por 15 dias. Posteriormente, a placa dos aderidos foi corada para identificação por imunofluorescência de ectoderme (Nestina e β-tubulina) e endoderme (Sox17). As análises foram realizadas sob microscópio de fluorescência. Foi verificada a presença da atividade da fosfatase alcalina. Todos os marcadores analisados por imunofluorescência foram identificados (OCT4, SOX-2, TRA-1-81, nestina, β-tubulina e SOX-17). Futuramente também serão realizadas as análises de identificação de mesoderme e o RT-PCR. Os corpos embrióides suspensos foram fixados em álcool 70° para posterior preparo para histologia. Sendo assim, até o momento todos os testes demonstraram que a linhagem de CTEh utilizada possui as características determinantes para ser classificada como célula-tronco embrionária. Dessa forma, estudos futuros de interação dessas células com biomateriais poderão ser realizados, visando o desenvolvimento de protocolos para o tratamento de lesões. Além disso, essas células também poderão ser utilizadas no desenvolvimento de protocolos para tratamento de doenças como a diabetes, mal de Parkinson e doenças cardíacas.