

JOÃO VITOR PAES RETTORE

**ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO E DIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS-
TRONCO DO TECIDO ADIPOSEO DE GLÂNDULA MAMÁRIA BOVINA**

Dissertação de Mestrado do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas na área de Genética e Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Magno da Costa Maranduba

Co-orientadora: Dra. Lilian Tamy Iguma

Juiz de Fora

2013

**FOLHA DE APROVAÇÃO DEVERÁ SER À QUE FOI ASSINADA PELA BANCA DO DIA DA DEFESA
JOÃO VITOR PAES RETTORE**

**Isolamento, caracterização e diferenciação de células-tronco do tecido adiposo de glândula
mamária bovina**

Dissertação de Mestrado submetida à banca examinadora do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Ênfase em Genética e Biotecnologia, da Universidade Federal de Juiz de Fora, como parte dos requisitos necessários para obtenção do Grau de Mestre em Ciências Biológicas.

Aprovada em: ____/____/____.

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Carlos Magno da Costa Maranduba
Orientador
Universidade Federal de Juiz de Fora

Dra. Lilian Tamy Iguma
Co-orientadora
EMBRAPA

Dr. Humberto de Mello Brandão
EMBRAPA

Dedico este trabalho a meu grande amigo Carlos Maranduba, por ser mais que um professor e ensinar muito mais do que o que está nos livros.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Juiz de Fora, à EMBRAPA e à CAPES pela bolsa de estudos, infraestrutura e financiamento disponibilizados e por terem tornado esse projeto executável.

Ao Prof. Dr. Carlos Maranduba, por estar sempre presente e disposto a ajudar e ensinar. Por ter fornecido toda a orientação e confiança necessárias para que esse projeto se fizesse possível e por ter o tornado de fato possível.

À Dra. Lilian Iguma por toda a disponibilidade e vontade em ajudar. Pela idealização desse projeto e por todo o conhecimento e idéias compartilhados.

À Carolina Capobianco por todo suporte e boa vontade essenciais durante todas as etapas da realização desse projeto.

Ao Prof. Dr. Marcelo Santos por ter participado de toda minha jornada acadêmica desde o início.

À Dra. Marta Martins por toda a ajuda técnica e intelectual fornecidas sempre de boa vontade.

Aos professores do laboratório de genética da UFJF por todo o conhecimento passado e compartilhado, e toda a liberdade de conversar sobre os mais variados assuntos.

À Rafaella, Paula, Camila e Gustavo pela parceria e cooperação que fazem o trabalho em grupo não apenas dar certo, mas ser divertido e prazeroso.

Aos amigos do laboratório de genética da UFJF, por todo companheirismo e interesse em ver o desenvolvimento do laboratório caminhar junto com nosso desenvolvimento pessoal.

Aos amigos do laboratório de reprodução da EMBRAPA Gado de Leite pela ajuda sempre em hora oportuna e pelas conversas tão necessárias.

Aos amigos do laboratório de genética molecular da EMBRAPA Gado de Leite pela disponibilidade, boa vontade e confiança, e pelas conversas sempre tão divertidas e sem pé nem cabeça.

Aos amigos das aulas do mestrado, pelas infundáveis discussões e por todo conhecimento e divertimento que elas proporcionavam.

À minha mãe e meu irmão por me lembrarem com carinho e admiração que a família é o bem mais precioso que alguém pode ter.

À minha namorada Marina por toda a paciência, boa vontade e, principalmente, por todo o amor que me faz sempre querer ir mais além.

A meus avós, pelo exemplo e paz transmitidos de forma tão singela e natural.

Aos amigos Danilo, Fred, Carlito, Lívia, Tonho, Andressa, Getúlio e demais companheiros das horas mais tardias, por toda a descontração e alegria necessárias à sanidade mental de um mestrando.

Aos amigos de Barbacena por toda a loucura só pertinente a nós mesmos.

Aos amigos de Juiz de Fora, pela companhia e diversão.

À Deus, por colocar as coisas sempre nos lugares certos.

“Corrija um sábio e o fará mais sábio, corrija um tolo e fará um inimigo.”

RESUMO

A clonagem de animais representa um grande avanço tecnológico, mas ainda é uma técnica em experimento que necessita de aperfeiçoamento para que possa realmente ser difundida no meio agropecuário e social. Entre essas técnicas, uma que tem merecido destaque é a Clonagem por Transferência Nuclear (NT) pelo seu uso em técnicas de transgênese, entre outros, tornando-se uma alternativa viável frente aos métodos convencionais, como a microinjeção pró-nuclear. Porém, um problema frequentemente associado à NT é a baixa eficiência do processo, sendo pequena a proporção de embriões viáveis que são reconstruídos a partir de células somáticas como doadoras de núcleo. Muitos fatores podem influenciar nessa baixa taxa de sucesso, entre eles a incompleta reprogramação do núcleo da célula somática doadora, podendo levar a uma expressão anormal de importantes genes relacionados ao desenvolvimento do embrião. Isso significa que, para a clonagem funcionar, o núcleo da célula doadora precisa ser totalmente reprogramado após sua transferência, cessando sua programação própria de expressão gênica. O grau de diferenciação celular e comprometimento epigenético da célula doadora pode comprometer esse processo, levando-se a pensar na utilização de células menos comprometidas a fim de obter-se uma maior eficiência, tais como as células-tronco adultas. No presente trabalho isolamos, caracterizamos e testamos o potencial de diferenciação de células-tronco isoladas a partir do tecido adiposo da glândula mamária bovina (CTGMB), e sua caracterização semelhante a células-tronco mesenquimais torna interessante o potencial dessas células para terapia celular em bovinos, ou mesmo para clonagem por transferência nuclear, já que sua aplicação na técnica pode contribuir para aumentar sua eficiência, por se tratarem de células mais progenitoras. Além disso, por não terem comprometimento com um dado tipo celular, talvez possam contornar problemas epigenéticos. O *know-how* e os dados aqui apresentados são inéditos e inovadores, pois na literatura não há registro de algum grupo de pesquisa que tenha chegado a tal caracterização com riqueza de detalhes em células bovinas, e tais protocolos para obtenção das CTGMB podem ser patenteados.

Palavras-chave: células-tronco, células-tronco bovinas, glândula mamária bovina, transferência nuclear.

ABSTRACT

Animal cloning represents a major technological breakthrough, but it is still an experimental technique and needs some improvement so it can truly be diffused in the agricultural and social environment. Among these techniques, one that has been highlighted is Cloning by nuclear transfer (NT) because of its use in transgenesis techniques, among others, becoming one viable alternative compared to the conventional methods such as pro-nuclear microinjection. However, the low efficiency of the process is a common problem associated with NT, being small the proportion of viable embryos that are reconstructed using somatic cells as nuclear donors. There are many factors playing roles on this low success rate, one of them being the incomplete reprogramming of donor's somatic cell nucleus, leading to an abnormal expression of important genes related to embryo development. So, for the cloning to work properly, the donor cell nucleus must be completely reprogrammed after its transfer, ceasing its own gene expression programme. The actual stage of cell differentiation and epigenetic commitment of the donor cell may compromise the process, leading to think of using less committed cells in order to obtain a higher efficiency, such as adult stem cells. In the present work we isolate, characterize and test the differentiation potential of stem cells isolated from the adipose tissue of bovine mammary gland (CTGMB), and their characterization as similar to mesenchymal stem cells make interesting their potential use on cattle cell therapy, or even nuclear transfer cloning, once their application in such technique could help increasing its efficiency because CTGMB are more progenitor cells. Furthermore, since they are not committed to a specific cell type, they may be able to bypass epigenetic issues. The know-how and data presented here are novel and innovative, since in literature there is no record of any research group that has come to reach such a detailed characterization in bovine cells, and such protocols for obtaining CTGMB are patentable.

Keywords: stem cells, bovine stem cells, bovine mammary gland, nuclear transfer.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Alguns passos do protocolo desenvolvido para obtenção das CTGMB.....	31
Figura 2: Morfologia fusiforme das CTGMB.....	31
Figura 3: Diferenciação espontânea de algumas células, deixando de apresentar formato fusiforme.....	32
Figura 4: Gráfico de proliferação celular das linhagens CTGMB 1 a 5 obtido através de ensaio com MTT.....	32
Figura 5: Gráfico de senescência celular das linhagens CTGMB 3 a 5, obtido por contagem em Câmara de Neubauer.....	33
Figura 6: Análise da expressão dos marcadores mesenquimais.....	34
Figura 7: Análise da expressão dos marcadores embrionários.....	34
Figura 8: Análise da expressão dos controles internos.....	34
Figura 9: Coloração de Von Kossa para evidenciar a diferenciação osteogênica das CTGMB.....	36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Linhagens celulares obtidas.....	22
Tabela 2: Sequência dos <i>primers</i> para a caracterização das células.....	26
Tabela 3: Meios de indução utilizados nas diferenciações.....	28
Tabela 4: Sequência dos <i>primers</i> para confirmação das diferenciações.....	29

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BrdU	Bromodeoxiuridina
cDNA	DNA complementar
CT	Células-tronco
CTGMB	Linhagem de células-tronco de glândula mamária bovina
DMEM-HG	Meio de cultivo celular
DMEM-LG	Meio de cultivo celular
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxiribonucleico
dNTP	Desoxinucleotideo trifosfato
EDTA	Ácido etilenodiamino tetracético
ER	Receptores de estrogênio
iPSC	Células-tronco pluripotentes induzidas
MTT	"Thiazolyl Blue Tetrazolium Blue"
NT	Transferência nuclear
PBS	Solução salina balanceada
PCR	Reação em cadeia da polimerase
RNA	Ácido ribonucleico
SFB	Soro fetal bovino

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 Clonagem por Transferência Nuclear.....	13
1.2 Células-tronco	15
1.3 Células-tronco da Glândula Mamária Bovina.....	17
2 OBJETIVOS	20
2.1 Objetivo Geral	20
2.2 Objetivos Específicos.....	20
3 MATERIAIS E MÉTODOS	21
3.1 Isolamento das Células-tronco do Tecido Adiposo de Glândula Mamária Bovina	21
3.2 Cultivo das Células-tronco do Tecido Adiposo de Glândula Mamária Bovina	23
3.3 Avaliação da Proliferação Celular.....	23
3.4 Avaliação da Senescência Celular.....	24
3.5 Caracterização Molecular das Células-tronco do Tecido Adiposo de Glândula Mamária Bovina	24
3.6 Diferenciação Osteogênica das Células-tronco do Tecido Adiposo de Glândula Mamária Bovina	27
3.7 Diferenciação Condrogênica das Células-tronco do Tecido Adiposo de Glândula Mamária Bovina	27
3.8 Diferenciação Miogênica das Células-tronco do Tecido Adiposo de Glândula Mamária Bovina	28
4 RESULTADOS	30
4.1 Obtenção das Células-tronco do Tecido Adiposo de Glândula Mamária Bovina.....	30
4.2 Avaliação da Proliferação das Células-tronco do Tecido Adiposo de Glândula Mamária Bovina.....	32
4.3 Avaliação da Senescência das Células-tronco do Tecido Adiposo de Glândula Mamária Bovina	33
4.4 Caracterização Molecular das Células-tronco do Tecido Adiposo de Glândula Mamária Bovina	33
4.5 Análise da Diferenciação das Células-tronco do Tecido Adiposo de Glândula Mamária Bovina.....	35
5 DISCUSSÃO	37
6 REFERÊNCIAS.....	38

1 INTRODUÇÃO

Clonagem é o processo de reprodução assexuada que resulta na obtenção de cópias geneticamente idênticas de um mesmo organismo, seja ele animal ou vegetal. A clonagem de animais representa um grande avanço tecnológico, mas ainda é uma técnica em experimento que necessita de aperfeiçoamento para que possa realmente ser difundida no meio agropecuário e social (BENTO et al., 2005).

1.1 Clonagem por Transferência Nuclear

Atualmente, muitos avanços já foram feitos no que diz respeito às técnicas de clonagem, sendo que sua potencial aplicação em diversas áreas traz grandes benefícios, tanto em termos acadêmicos quanto comerciais (WALL et al., 1997; STICE et al., 1998; WILMUT, 1998). Entre as técnicas de clonagem, uma que tem merecido destaque é a Clonagem por Transferência Nuclear (NT, do inglês *Nuclear Transfer*), que consiste na transferência do núcleo de uma célula somática para um oócito enucleado, com a intenção de gerar um novo indivíduo, sendo uma ferramenta muito útil para estudos básicos, como aqueles que visam conhecer a interação núcleo-citoplasma na reprogramação nuclear, e que também promete aplicações comerciais (NIEMAN et al., 2002). A clonagem permite obter animais com características genéticas desejáveis, além de seu uso em técnicas de transgênese, com a introdução de genes de interesse, tornando-se uma alternativa viável para a produção de animais transgênicos frente aos métodos convencionais, como a microinjeção pró-nuclear (BEHBOODI et al., 2002; FREITAS et al., 2007a;). Com isso, a transferência nuclear pode permitir a produção de animais portadores de proteínas recombinantes, servindo como alternativa no tratamento de algumas patologias em humanos (FREITAS, 2006; FREITAS et al., 2007b). Nesse contexto, várias espécies de mamíferos, como caprinos (CAMPBELL et al., 1996; WILMUT et al., 1997; BAGUISI et al., 1999), bovinos (KATO et al., 1998), suínos (ONISHI et al., 2000), camundongos (WAKAYAMA et al., 1998), gatos (SHIN et al., 2002) e coelhos (CHESNE et al., 2002), já foram clonadas com sucesso utilizando-se tal técnica. Dentre elas, a espécie bovina é a mais estudada quanto a clonagem por NT, com grupos de pesquisa e companhias trabalhando na área

por todo o mundo, como América do Norte, Japão, Nova Zelândia e Europa, bem como América do Sul e Ásia (HEYMAN, 2005).

Porém, um problema frequentemente associado à NT é a baixa eficiência do processo, usualmente de 0 a 4%, sendo pequena a proporção de embriões viáveis que são reconstruídos a partir de células somáticas como doadoras de núcleo (WILMUT et al., 2002; ZHANG et al., 2008). Muitos fatores podem influenciar nessa baixa taxa de sucesso, entre eles uma alta frequência de estagnação do desenvolvimento do embrião após a implantação (HEYMAN et al., 2002). Alguns dos problemas encontrados pela clonagem incluem alta taxa de aborto, anormalidades placentárias, morte perinatal e alto peso ao nascer (SHIJIE et al., 2004). Outros dados ainda apontam para o fato de que a incompleta reprogramação do núcleo da célula somática doadora pode levar a uma expressão aberrante ou ausente de importantes genes relacionados ao desenvolvimento do embrião (DANIELS e TROUNSON, 2000). Isso significa que, para a clonagem funcionar, o núcleo da célula doadora precisa ser totalmente reprogramado após sua transferência para o citoplasma do oócito, cessando sua programação própria de expressão gênica e assumindo a programação típica de um genoma zigótico. Isso se daria, entre outros fatores, pela ativação de genes necessários ao início do desenvolvimento embrionário e a supressão de genes relacionados à diferenciação, que estariam sendo transcritos na célula doadora original. Existe ainda um limite de tempo para essa reprogramação ocorrer, uma vez que ela deve estar completa no momento em que a ativação normal do genoma do embrião estiver para começar (SOLTER, 2000; SHIJIE et al., 2004). Esse fato gera um esforço muito grande por parte do citoplasma do oócito, uma vez que o núcleo de uma célula somática é muito mais difícil de ser reprogramado que o de uma célula gamética, e assim as perdas cumulativas notadas durante o desenvolvimento do embrião seriam um reflexo dessa expressão gênica anormal em diferentes estágios de sua formação (WILMUT, 2002). Portanto, devido ao núcleo da célula doadora não estar transcricionalmente silenciado antes de sua transferência, a reprogramação pode ser incompleta, ocasionando tais problemas, sendo que, em geral, existe um decréscimo na proporção de embriões que se desenvolvem e vêm a termo quando os núcleos doadores são obtidos de células em estágios mais avançados de desenvolvimento (WILMUT, 2002). Esse decréscimo pode

refletir o grau de diferenciação celular e comprometimento epigenético da célula doadora de núcleo, podendo-se então pensar na utilização de células menos comprometidas a fim de obter-se uma maior eficiência do processo como um todo.

1.2 Células-tronco

No campo da biotecnologia, uma das áreas mais promissoras é a de aplicação das Células-Tronco (CT) e suas tecnologias associadas. Por definição, CT são células indiferenciadas, capazes de auto-renovarem, e com habilidade para gerar mais de uma linhagem celular *in vitro* e/ou *in vivo*, atendendo assim os pré-requisitos de um menor comprometimento para servirem como doadoras de núcleo na clonagem por transferência nuclear. São ainda definidas quanto a sua potencialidade, dividindo-se em três grandes grupos: células totipotentes, como as células originadas das primeiras divisões de um óvulo fertilizado, e que são capazes de gerar todo e qualquer tipo celular, embrionário ou extra-embriônico, necessários à formação de um organismo viável; células pluripotentes, como as células isoladas a partir da massa celular interna do blastocisto (EVANS e KAUFMAN, 1981; MARTIN, 1981), e que podem originar células de qualquer um dos três folhetos embrionários: ectoderma, mesoderma ou endoderma, e conseqüentemente qualquer tecido do organismo adulto; o terceiro grupo trata das células multipotentes, que teoricamente têm um potencial de diferenciação mais limitado, originando apenas células de linhagens relacionadas e restritas, como células especializadas presentes no tecido de origem dessas células-tronco. Ainda neste terceiro grupo, enquadram-se as chamadas células-tronco adultas, que são células derivadas de órgãos específicos como fígado, pulmão, intestino, cérebro, tecido adiposo e medula óssea (WEI et al., 2000), sendo normalmente nomeadas de acordo com o tecido do qual são extraídas. É comumente aceito que essas células são responsáveis pelo crescimento, diferenciação e manutenção do tecido em que residem (JONES e WATT, 1993; COSENTINO et al., 1996; FLIEDNER, 1998), e que representam uma população rara localizada em pequenos nichos no tecido adulto (WOODBURY et al., 2002). Vários estudos, no entanto, têm demonstrado que as células-tronco adultas são capazes de gerar células de mais de uma origem (folheto) embrionária, apresentando assim um potencial de diferenciação maior, e

consequentemente um grau de comprometimento menor do que o geralmente esperado (TERSKIKH et al., 2001; KOTTON e FINE, 2003).

Existe ainda outro grupo, de células-tronco produzidas artificialmente, conhecidas como células-tronco pluripotentes induzidas (iPSC, do inglês *induced pluripotent stem cells*), que têm recebido bastante atenção desde que foram desenvolvidos protocolos para sua produção a partir de células somáticas de camundongos (TAKAHASHI e YAMANAKA, 2006) e de fibroblastos de humanos (TAKAHASHI et al., 2007; YU et al., 2007). Depois desses avanços, pesquisas mais recentes têm tentado induzir a pluripotência em células através da transfecção por retrovírus para expressão de genes que são essenciais ou facilitam a produção de células pluripotentes, além de outros que também tentam eliminar a etapa de transfecção viral para a produção dessas células, uma vez que essa etapa pode levar à mutagênese (ZHOU et al., 2009; DESPONTS e DING, 2010; JIA et al., 2010). Uma grande importância relacionada a essas pesquisas é que elas têm fornecido muitas informações acerca de genes que são críticos para a manutenção da célula em um estado indiferenciado, bem como informações epigenéticas que estariam associadas a vários estados de diferenciação celular.

Pensando-se na aplicação de células-tronco em pesquisa ou no desenvolvimento de produtos ou tecnologias, deve-se lembrar que cada um dos tipos celulares apresentados possui suas características próprias e peculiaridades, levando-se em conta essas informações na hora de selecionar qual deles usar. Partindo desse ponto de vista, a utilização de CT adultas se mostra de grande potencial, devido à relativa facilidade de sua extração e obtenção, e ao baixo custo do processo como um todo se comparado à extração e manipulação dos outros tipos celulares.

A pergunta seguinte seria de que fonte retira-las. Muitas evidências apontam a existência de células-tronco adultas na glândula mamária, entre elas o ciclo de desenvolvimento, involução e subsequente redensolvimento desse órgão durante as sucessivas lactações, o que representa um forte indicativo da existência de uma subpopulação celular com capacidade de se auto-renovar nesse órgão. Além disso, vários experimentos relacionados a transplantes de tecido vêm demonstrando que

fragmentos isolados de qualquer porção do epitélio mamário normal, em qualquer fase do desenvolvimento ou mesmo em lactação, podem regenerar ou até mesmo gerar uma nova glândula mamária completa (DEOME et al., 1959; HOGG et al., 1983; SMITH e MEDINA, 1988). Kordon e Smith (1998) mostraram que uma glândula mamária funcional, inteira, pode ser regenerada a partir de divisões de uma única célula seguidas pelo transplante de um fragmento desse tecido gerado, e Shackleton et al. (2006) demonstrou que uma única célula pode reconstituir uma glândula mamária completa *in vivo*, reforçando a ideia da presença de células-tronco adultas nesse tecido. Paralelamente, foi demonstrada a existência, em camundongos, de uma subpopulação de células-tronco adultas residindo na glândula mamária, com grande potencial de proliferação e capazes de regenerar uma glândula mamária inteira *in vivo* (STINGL et al. 2006), e posteriormente foi revisto que novos estudos sugerem a presença de uma célula na glândula mamária que seria capaz de repovoar a mesma e responder normal e completamente a um programa morfogênico definido (SMITH e MEDINA 2008). Evidências adicionais em relação à existência de CT adultas na glândula mamária são intensificadas por observações de que, frequentemente, todo um lóbulo mamário pode ser constituído de células apresentando um mesmo padrão de inativação do cromossomo X (TSAI et al., 1996), além de estudos descrevendo que tumores compostos de diferentes tipos celulares podem ter uma origem clonal (DONTU et al., 2003). Ainda, a glândula mamária, diferentemente de outros órgãos, desenvolve-se principalmente após o nascimento.

1.3 Células-tronco da Glândula Mamária Bovina

Embora os conhecimentos acerca de CT adultas, e até mesmo especificamente sobre CT de origem mamária, estejam de certa forma adiantados, a grande maioria dos estudos publicados diz respeito a camundongos e humanos. Em bovinos, existem muito poucos trabalhos acerca de CT adultas, e a existência de células-tronco de origem na glândula mamária tem sido, até hoje, apenas uma hipótese, já que os poucos trabalhos publicados nessa área ainda não identificaram e caracterizaram devida e adequadamente essas células.

Ellis e Capuco (2002), ressaltam que ainda não foram bem definidos marcadores que definiriam uma célula como célula-tronco de origem mamária, embora análises histológicas têm indicado uma colônia celular do parênquima mamário que é fracamente corada e poderia funcionar como célula-tronco mamária. Histologicamente, essas células teriam características esperadas para uma linhagem de células-tronco. Primeiramente, a aparência semelhante a desmossomos e hemidesmossomos encontrada nessas células fracamente coradas indicaria que se tratam de células residentes na glândula mamária. Em segundo lugar, a baixa porcentagem de células fracamente coradas no epitélio da glândula estaria de acordo com a expectativa geral de que as CT compusessem apenas uma pequena proporção da população celular total do parênquima. Por último, a competência mitótica dessas células, demonstrada por imagens e pela incorporação de BrdU, onde elas comporiam apenas 10% da população celular do parênquima, mas seriam responsáveis por 50% da proliferação observada no tecido, serviria como forte argumento para a ideia que essas células fracamente coradas estariam agindo como células-tronco na glândula mamária.

Capuco (2007) identificaram uma linhagem de células-tronco epiteliais bovinas na glândula mamária por sua característica de reter DNA marcado por longos períodos de tempo. Essa característica é devida à habilidade de CT em reter a fita molde de DNA e passar a fita recém sintetizada para as células filhas durante a divisão assimétrica (POTTEN et al., 2002), em um processo conhecido como “hipótese da fita imortal”. Porém o próprio autor relata que embora CT apresentem retenção da marcação do DNA devido à segregação assimétrica das fitas de DNA parental, e embora eles tenham usado esse atributo para ajudar a identificar células-tronco de origem mamária, essa não é uma característica única de CT. Células progenitoras também podem apresentar a mesma característica (ARMAKOLAS e KLAR, 2006), e a glândula mamária apresenta diversas classes de células progenitoras. O autor sugere então que a expressão de receptores de estrogênio (ER) seja usada para diferenciar células-tronco epiteliais da glândula mamária (ER negativas) de células progenitoras diversas da glândula mamária (ER positivas).

Li et al. (2009) isolaram células do tecido epitelial da glândula mamária de bovinos e as cultivaram por dois métodos diferentes, em suspensão e em cultura, observando sua morfologia. Atestaram ainda sua diferenciação em células com característica de células epiteliais e células com característica de células mioepitelióides. Sua classificação como CT é dada pela expressão de dois marcadores (beta 1-integrina e alpha 6-integrina), comumente expressos em CT epiteliais de tecido mamário em humanos e camundongos, mas ainda não confirmados para bovinos.

Martignani et al. (2009) discutem que células progenitoras epiteliais mamárias, em humanos, são uma população celular não totalmente diferenciada, e que retém um potencial de proliferação limitado e a habilidade de formar colônias quando cultivada *in vitro*. Essa propriedade permitiria sua identificação através de um ensaio de formação de colônia celular (STINGL et al., 2001) e então tal ensaio foi feito para células extraídas a partir de tecido glandular mamário de bovinos. Os resultados positivos do trabalho suportam a hipótese de que células semelhantes devem existir na glândula mamária de bovinos, e que o mesmo ensaio poderia ser usado para identifica-las. Porém tal ensaio identifica células progenitoras, que como dito anteriormente, podem ser de vários tipos, e não especificamente CT.

Diante de tal cenário, podemos perceber que o estudo das células-tronco de origem mamária em bovinos é de suma importância frente suas potenciais aplicações e contribuições em diversas áreas, e ainda um campo muito pouco explorado, faltando definições e limites mais estreitos para classificarmos de fato uma linhagem celular de origem mamária como sendo uma CT. Um trabalho ainda não feito que promete um amplo campo de aplicação.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Isolar, caracterizar e diferenciar células-tronco do tecido adiposo presente na glândula mamária bovina.

2.2 Objetivos Específicos

1. Desenvolver um protocolo para isolamento de células-tronco a partir do tecido adiposo da glândula mamária de bovinos;
2. Avaliar o cultivo das células coletadas para sua expansão *in vitro* e congelamento;
3. Analisar os parâmetros de proliferação das células obtidas;
4. Analisar os parâmetros de senescência das células obtidas;
5. Caracterizar molecularmente as linhagens obtidas quanto à expressão de marcadores de células-tronco embrionárias, mesenquimais e hematopoiéticas;
6. Avaliar o potencial de diferenciação osteogênica, condrogênica e miogênica das células obtidas.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Isolamento das Células-tronco do Tecido Adiposo de Glândula Mamária Bovina

As células-tronco de glândula mamária bovina (CTGMB) foram extraídas do tecido adiposo (*fat pad*) da glândula mamária de duas vacas mestiças em terço final de gestação, através de protocolo de extração estabelecido no próprio laboratório, conforme descrito abaixo.

Duas glândulas mamárias, sendo uma de uma novilha e outra de uma vaca adulta leiteiras, ambas mestiças e em final de gestação, foram obtidas em um abatedouro local e transportadas resfriadas em caixa térmica até o laboratório. Para a novilha, três biópsias de aproximadamente 9 cm² foram retiradas do *fat pad* adjacente à bifurcação da artéria pudenda interna, sendo uma mais superficial, próxima à artéria; uma intermediária; e uma mais profunda, mais distante da artéria. Cada biópsia foi acondicionada separadamente em um tubo tipo Falcon de 50 mL contendo 30 mL de meio de cultivo DMEM-HG (Invitrogen) suplementado com 10% (v/v) de Soro Fetal Bovino (SFB, Hyclone), além de 100 U/mL de Penicilina e 100 µg/mL de Streptomicina (Invitrogen) para evitar contaminações provenientes do tecido. O mesmo procedimento foi repetido para a vaca adulta, com a diferença que apenas duas biópsias (uma mais superficial e uma mais profunda) foram retiradas.

Todos os procedimentos a partir de então foram realizados sob capela de fluxo laminar (ESCO Class II BSC), seguindo os protocolos de manutenção da esterilidade tanto de materiais quanto das soluções utilizadas (FRESHNEY, 2010). Cada biópsia foi colocada em uma placa de petri 60 x 10 mm, lavada com solução salina balanceada (PBS) contendo 100 U/mL de Penicilina e 100 µg/mL de Streptomicina, e então fragmentada com o auxílio de uma lâmina de bisturi. O tecido fragmentado foi lavado três vezes com a solução salina mencionada acima e então digerido enzimaticamente em solução de Colagenase tipo I a 0,1% (Sigma) por 30 minutos a 37°C. A enzima foi inativada pela adição de meio de cultivo DMEM-HG suplementado com 10% (v/v) de SFB, 100 U/mL de Penicilina e 100 µg/mL de Streptomicina, e o tecido digerido foi transferido para uma nova placa de petri revestida com SFB. Foi adicionado à placa

cerca de 5 mL de meio de cultivo DMEM-HG suplementado com 10% (v/v) de SFB, 100 U/mL de Penicilina, 100 µg/mL de Streptomicina e 2 mM de L-glutamina (Invitrogen), trocando-se o meio a cada 2 ou 3 dias.

As placas foram monitoradas diariamente com o auxílio do microscópio de fase invertido (Nikon TS100F) até a liberação das células a partir do tecido. No momento em que uma grande quantidade de células já podia ser notada aderida ao fundo da placa (o que se deu entre o 10º e 12º dia), o tecido foi descartado e as células tratadas com 0,25% de tripsina-EDTA (Gibco), sendo incubadas a 37º C por 5 minutos. A tripsina foi neutralizada com meio DMEM-HG contendo 10% (v/v) SFB e o sobrenadante foi centrifugado a 1.500 rpm por 5 minutos. O pellet formado foi resuspenso em 1 mL de meio DMEM-HG suplementado com 10% (v/v) de SFB, 100 U/mL de Penicilina, 100 µg/mL de Streptomicina e 2 mM de L-glutamina e transferido para uma garrafa de cultivo do tipo T75 cm², completando-se o volume do meio para cerca de 15 mL, obtendo-se assim as primeiras linhagens, conforme indicado na Tabela 1.

Tabela 1 – Linhagens celulares obtidas

Linhagem	Animal de origem	Local de Origem
CTGMB 1	Vaca adulta	Biópsia superficial, adjacente à bifurcação da artéria pudenda interna
CTGMB 2	Vaca adulta	Biópsia profunda, adjacente à bifurcação da artéria pudenda interna
CTGMB 3	Novilha	Biópsia superficial, adjacente à bifurcação da artéria pudenda interna
CTGMB 4	Novilha	Biópsia intermediária, adjacente à bifurcação da artéria pudenda interna
CTGMB 5	Novilha	Biópsia profunda, adjacente à bifurcação da artéria pudenda interna

3.2 Cultivo das Células-tronco do Tecido Adiposo de Glândula Mamária Bovina

As CTGMB foram cultivadas em meio de cultivo DMEM-HG suplementado com 10% (v/v) de SFB, 100 U/mL de Penicilina, 100 µg/mL de Streptomicina e 2 mM de L-glutamina (meio de manutenção). As células foram incubadas (REVCO 3000) a 37°C em uma atmosfera umidificada contendo 95% de ar e 5% CO₂. Todos os procedimentos de cultivo celular foram realizados sob capela de fluxo laminar (ESCO Class II BSC), seguindo os protocolos de manutenção da esterilidade tanto de materiais quanto das soluções utilizadas (FRESHNEY, 2010). O crescimento celular foi monitorado diariamente com o auxílio do microscópio de fase invertido (Nikon TS100F) e o meio de cultura foi trocado a cada dois ou três dias.

Visando à manutenção de um estoque das células isoladas no presente trabalho, as culturas foram mantidas até atingirem 80% de confluência e foram então criopreservadas. Para o congelamento, após tratamento das células com 0,25% de tripsina-EDTA (Gibco), conforme descrito no tópico anterior, as células foram resuspendidas em meio de cultura DMEM-HG suplementado com 20% (v/v) de SFB e 10% (v/v) de dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma), transferidas para criotubos e mantidas por 24-48h a -70 °C. Após esse período, os criotubos foram transferidos para um galão contendo nitrogênio líquido para seu armazenamento.

3.3 Avaliação da Proliferação Celular

Para avaliar o padrão de proliferação das CTGMB utilizou-se o ensaio de MTT (Thiazolyl Blue Tetrazolium Blue, Sigma).

Inicialmente (D0) foram plaqueadas 1.000 células em cada poço de uma placa de 96 poços (Corning) e as leituras foram feitas no 4º (D4), 8º (D8) e 12º (D12) dias. Nos dias da leitura, o meio de manutenção foi removido e foram adicionados 180 µL de meio puro mais 20 µL de MTT. Em seguida, a placa foi mantida no escuro, na estufa a 37°C por 4 horas para que o MTT fosse metabolizado e, após esse período, o meio mais MTT foram removidos e 200 µL de álcool isopropílico ácido foram adicionados. A placa foi mantida no escuro na estufa por 1 hora, o sobrenadante foi transferido para

uma nova placa e 200 μ L de álcool isopropílico ácido foram usados como branco para a leitura.

A proliferação foi estimada pela leitura da placa em espectrofotômetro (Thermo Scientific Varioskan Flash) à absorvância de 570 nm e as células utilizadas nesse ensaio eram das linhagens CTGMB 1, CTGMB 2, CTGMB 3, CTGMB 4 e CTGMB 5, inicialmente em passagem 4 (P4). Os experimentos foram realizados em triplicata.

3.4 Avaliação da Senescência Celular

Para estudar o padrão de senescência das CTGMB, 1×10^4 células foram plaqueadas em placas 35 x 10 mm (Corning) e a cada quatro dias o meio de manutenção foi removido e as células aderidas lavadas em PBS. A seguir, as células foram tratadas com 0,25% de tripsina-EDTA e incubadas a 37°C por 3 minutos. A tripsina foi neutralizada com meio DMEM-HG contendo 10% (v/v) de SFB e o sobrenadante foi centrifugado a 1.500 rpm por 5 minutos. O pellet formado foi resuspendido em 1 ml de meio DMEM-HG e o número de células foi estimado com auxílio da Câmara de Neubauer. As CTGMB foram re-plaqueadas (1×10^4 células/poço) em placas de 35x10 mm e os experimentos foram repetidos sucessivamente até a estagnação da contagem celular. As células usadas nesse ensaio eram das linhagens CTGMB 3, CTGMB 4 e CTGMB 5, inicialmente em P4, e os experimentos foram realizados em quadruplicata.

3.5 Caracterização Molecular das Células-tronco do Tecido Adiposo de Glândula Mamária Bovina

Para traçar o perfil molecular das células isoladas foi analisada a expressão de genes que agem como marcadores de células-tronco hematopoiéticas, mesenquimais e embrionárias. Os marcadores para células-tronco hematopoiéticas utilizados foram *CD34* e *CD45*; para células-tronco mesenquimais foram *CD90*, *Nestin*, *CD166* e *CD44*; e para células-tronco embrionárias foram *Nanog* e *OCT4*. Foi ainda utilizada como controle interno a expressão dos genes *GAPDH* e *Beta-actina*.

Inicialmente, o RNA total de aproximadamente $1,5 \times 10^6$ células foi extraído utilizando-se o kit *RNeasy Mini Kit* (Qiagen), seguindo as recomendações do fabricante e efetuando-se todas as centrifugações à temperatura ambiente ($\pm 25^\circ\text{C}$). Logo após, cerca de 3 μg de RNA total foram utilizados para a síntese da primeira fita do cDNA utilizando-se o kit *SuperScript[®] III First-Strand Synthesis SuperMix* (Invitrogen), seguindo as recomendações do fabricante. O cDNA, então, foi utilizado como *template* para as reações de PCR, sendo o procedimento repetido para cada uma das linhagens.

As reações de PCR para amplificação da região alvo dos marcadores citados foram feitas utilizando-se 0,6 μM de cada um dos *primers* F e R para os respectivos marcadores (conforme Tabela 2), 2 μL da reação de síntese de cDNA usada diretamente como *template*, 1x *Go Taq[®] Flexi Buffer*, 2 mM MgCl_2 , 0,2 mM dNTP mix, 1 U *Go Taq[®]* polimerase (*GoTaq[®] Flexi DNA Polymerase*, Promega Corporation), e água Mili-Q suficiente para um volume final de reação de 25 μL . A solução foi inicialmente desnaturada a 95°C por 2 minutos, seguida de 30 ciclos compostos por: desnaturação (95°C por 30s), anelamento dos *primers* (60°C por 30s) e alongamento da fita (72°C por 30s), além da extensão final de 72°C por 5 minutos. O produto do PCR foi visualizado em géis de agarose 2% (p/v) corados com solução de brometo de etídio 0,001% (p/v). A condição da corrida do gel foi de 80 v por 1h30min, analisando-se as bandas esperadas nas alturas indicadas (Tabela 2).

Tabela 2 – Sequência dos *primers* para a caracterização das células

Marçador	ID	Primer F	Primer R	Amplicon	Tm (°C)
Embrionário					
Nanog	NM_001025344.1	TCCCGGTCAAGA AACAAAAG	CTGGAACCAGGT CTTCACC	162 pb	60
OCT4	NM_174580.2	GTTTTGAGGCTT TGCAGCTC	CTCCAGGTTGCC TCTCACTC	182 pb	60
Mesenquimal					
CD90	NM_001034765.1	CAGAAGGTGACC AGCCTGAC	TTGGTTCGGGAG CTGTATTC	179 pb	60
Nestin	AB257750.1	GGACCCTCCTAG AGGCTGAG	GTGAGGAGAGGG GAGTAGGG	168 pb	60
CD166	AB039957.1	TGTAAGCAAAGC CCCATTTTC	TGTCAGCCTTGG TTGTCTTG	224 pb	60
CD44	NM_174013.3	AGAAGGGCATGT GGTGATTC	GGTATAACGGGT GCCATCAC	223 pb	60
Hematopoiético					
CD34	AB021662.1	TCACCACGTGCT ATTTCTCTG	AGTTCGGTATCA GCCACCAC	241 pb	60
CD45	AJ400864.1	GGACATCGCAGT GTTTGTGG	GGAGGTTTACAT TCCTCTCG	240 pb	60
Controle Interno					
GAPDH	NM_001034034.1	ACCCAGAAGACT GTGGATGG	CAACAGACACGT TGGGAGTG	178 pb	60
Beta-actina	AY141970.1	GAGGCTCTCTTC CAGCCTTC	GGGCAGTGATCT CTTTCTGC	184 pb	60

Legenda: ID: identificação da seqüência usada para desenho dos *primers* no banco de dados do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>); TM: temperatura para anelamento dos *primers*.

3.6 Diferenciação Osteogênica das Células-tronco do Tecido Adiposo de Glândula Mamária Bovina

Para avaliar o potencial de diferenciação osteogênico das CTGMB, inicialmente 1×10^4 células foram plaquedadas (D0) em placas de 6 poços (Corning) e cultivadas por 24 horas com meio de manutenção para aderirem ao fundo da placa. No dia seguinte (D1) o meio de manutenção foi substituído pelo meio de indução osteogênica, indicado na Tabela 3. O β -glicerolfosfato foi adicionado somente no dia 10 (D10) do tratamento e a cultura foi mantida por 28 dias, trocando-se o meio a cada 4 dias. As células utilizadas nesse ensaio eram das linhagens CTGMB 3, CTGMB 4 e CTGMB 5, inicialmente em P4, e o experimento foi realizado em triplicata. Para demonstrar a diferenciação osteogênica, as culturas foram fixadas com paraformaldeído 4% (v/v) por 24 horas e foram coradas com a técnica de Von Kossa descrita a seguir.

As placas foram lavadas com água destilada e coradas com nitrato de prata 1%, sendo deixadas sob luz ultravioleta por cerca de 45 minutos. Em seguida foram lavadas novamente com água destilada, tratadas com tiosulfato de sódio 3% por 5 minutos e lavadas com água destilada mais uma vez. As culturas foram então coradas com a solução de van Gieson (1% de fucsina ácida e ácido pícrico saturado em água destilada), lavadas em álcool e então fotografadas após 24h com o auxílio do microscópio de fase invertido (Nikon TS100F).

3.7 Diferenciação Condrogênica das Células-tronco do Tecido Adiposo de Glândula Mamária Bovina

Para avaliar o potencial de diferenciação condrogênico das CTGMB, 4×10^6 células foram centrifugadas, com meio de manutenção, em um tubo tipo Falcon de 15 ml a 1500 rpm por 5 minutos. As células foram então ressuspensas em meio de indução condrogênica (Tabela 3), sendo a troca do meio indutor realizada a cada 2 dias e a cultura mantida por 28 dias. As células utilizadas nesse ensaio eram das linhagens CTGMB 3, CTGMB 4 e CTGMB 5, inicialmente em P4. Para demonstrar a diferenciação condrogênica, as células foram fixadas à temperatura ambiente com paraformaldeído 4% (v/v) e emblocadas em parafina. Estamos no momento realizando os cortes

histológicos para coloração com Azul de Toluidina, para comprovação do sucesso da diferenciação. Tais dados serão demonstradas na dissertação. Além disso, *primers* específicos para avaliar a expressão de genes de condrócitos foram desenhados (Tabela 4), e realizaremos assim uma confirmação molecular da diferenciação. O procedimento utilizado será o mesmo descrito no tópico “Caracterização molecular das células-tronco do tecido adiposo de glândula mamária bovina”, modificando-se apenas as condições da reação de PCR.

3.8 Diferenciação Miogênica das Células-tronco do Tecido Adiposo de Glândula Mamária Bovina

Para avaliar o potencial de diferenciação miogênico das CTGMB, 1×10^5 células foram plaquedas (D0) em placas de 6 poços e cultivadas por 24 horas com meio de manutenção para aderirem ao fundo da placa. No D1, o meio de manutenção foi substituído pelo meio de indução miogênica (Tabela 3), sendo trocado a cada 3 dias. Para demonstrar a diferenciação miogênica, *primers* específicos para avaliar a expressão de genes de miócitos foram desenhados (Tabela 4), a fim de realizar-se uma confirmação molecular da diferenciação. O procedimento utilizado será o mesmo descrito no tópico “Caracterização molecular das células-tronco do tecido adiposo de glândula mamária bovina”, modificando-se apenas as condições da reação de PCR.

Tabela 3 – Meios de indução utilizados nas diferenciações

Diferenciação	Meio de indução
Osteogênica	DMEM-LG, SFB (10% v/v), dexametasona (10^{-7} M), 2-fosfato ácido ascórbico (50 μ M), β -glicerolfosfato (2 mM).
Condrogênica	DMEM-HG, ITS (1% v/v), dexametasona (10^{-7} M), piruvato de sódio (1 mM), 2-fosfato ácido ascórbico (50 nM), TGF β (10 ng/mL).
Miogênica	DMEM-HG, SFB (10% v/v), soro de cavalo (5% v/v), hidrocortisona (100 μ M).

Tabela 4 – Sequência dos *primers* para confirmação das diferenciações

Gene	ID	Primer F	Primer R	Amplicon	Tm (°C)
Condrogênico					
Aggrecan	U76615.1	GCGTGAGAAC CGTCTACCTC	CCACTTGTGT CACCATCCAC	171 pb	60
Collagen Type II	NM_001001135.2	GGCTTCCACT TCAGCTATGG	GGATGAGCAG AGCCTTCTTG	175 pb	60
Sox9	AF278703.1	TCATGAAGAT GACCGACGAG	GTCCAGTCGT AGCCCTTGAG	241 pb	60
Miogênico					
Alpha Smooth Muscle Actin	BT021508.1	ACTGGGACGA CATGGAAAAG	CATACATGGC TGGGACATTG	168 pb	60
FABP3	BT021486.1	ATCGAAGTGA ATGGGGACAC	GAATGAGTTT CCCGTCAACC	220 pb	60
MyoD	NM_001040478.2	GATGACCCGT GTTTCGACTC	TAGTCGTCTT GCGTTTGAC	229 pb	60
Myogenin	NM_001111325.1	GAAGCGCAGA CTCAAGAAGG	TATGGGAGCT GCATTCACTG	227 pb	60

Legenda: ID: identificação da sequência usada para desenho dos *primers* no banco de dados do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>); TM: temperatura para anelamento dos *primers*.

4 RESULTADOS

4.1 Obtenção das Células-tronco do Tecido Adiposo de Glândula Mamária Bovina

Inicialmente foram obtidas cinco linhagens da glândula mamária de bovinos, denominadas como CTGMB 1, CTGMB 2, CTGMB 3, CTGMB 4 e CTGMB 5. As linhagens CTGMB 1 e 2 são referentes às amostras de uma vaca mestiça adulta, e as CTGMB 3 a 5 às de uma novilha mestiça. As amostras foram obtidas de regiões adjacentes à bifurcação da artéria pudenda interna da glândula mamaria, conforme citado anteriormente (Tabela 1).

O protocolo desenvolvido no laboratório mostrou-se eficiente e na Figura 1 são mostrados alguns passos do mesmo. Todas as linhagens CTGMB apresentaram, inicialmente, morfologia semelhante a fibroblastos (Figura 2), com células alongadas e em formas de “espículas”, características de células-tronco. Posteriormente, um grande número de células das linhagens CTGMB 1 e 2 diferenciaram-se espontaneamente em outros tipos celulares (Figura 3), os quais não puderam ser caracterizados, o que inviabilizou sua utilização em ensaios posteriores a seu isolamento e proliferação. As células das linhagens CTGMB 3 a 5 continuaram apresentando morfologia característica em cultura e então foram utilizadas para os demais ensaios.

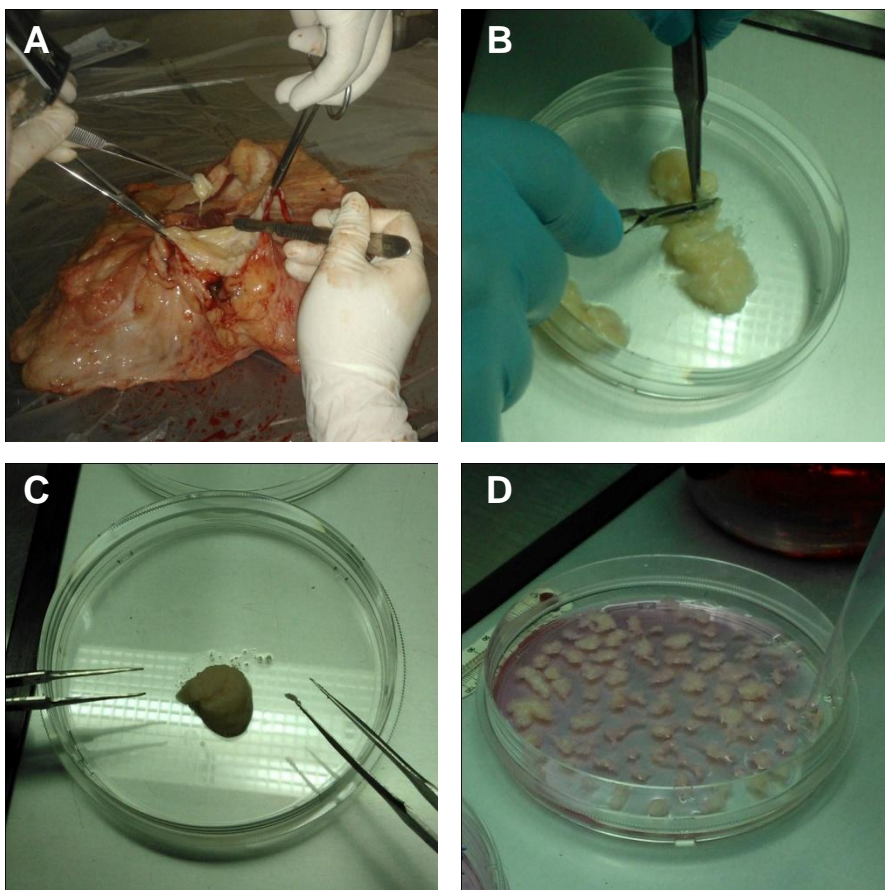


Figura 1: Alguns passos do protocolo desenvolvido para obtenção das CTGMB. A: retirada de uma biópsia; B: biópsia sendo fragmentada mecanicamente; C: biópsia após digestão; D: biópsia fragmentada e digerida, posicionada em placa de cultivo inicial.

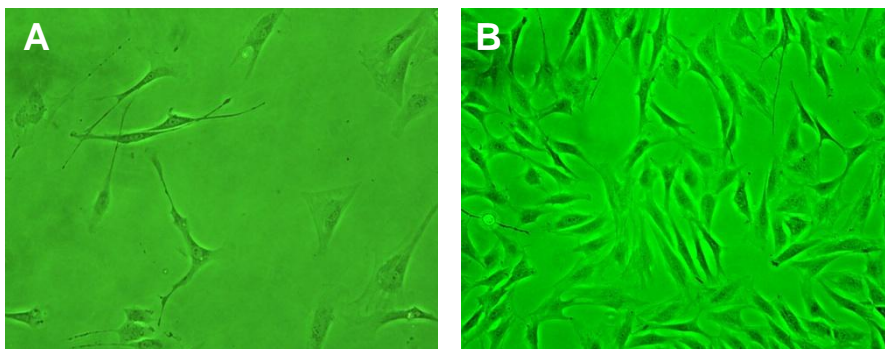


Figura 2: Morfologia fusiforme das CTGMB. A: aumento de 100x, células em baixa confluência - início do cultivo; B: aumento de 100x, células mais confluentes, a ponto de serem tripsinizadas.

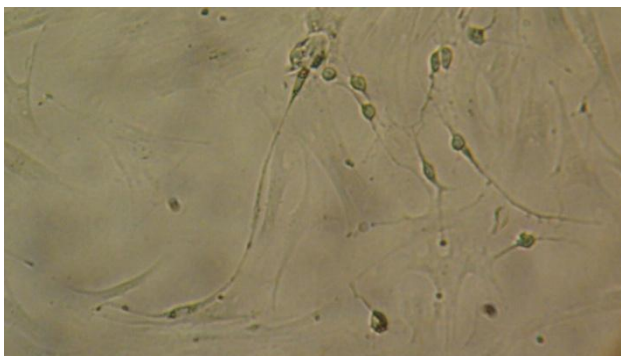


Figura 3: Diferenciação espontânea de algumas células, deixando de apresentar formato fusiforme.

4.2 Avaliação da Proliferação das Células-tronco do Tecido Adiposo de Glândula Mamária Bovina

As linhagens CTGMB 1 a 5 foram avaliadas em P4 quanto à proliferação, sendo que todas apresentaram alta capacidade proliferativa (Figura 4).

Como foi dito anteriormente, muitas células das linhagens CTGMB 1 e 2 diferenciaram-se espontaneamente, e assim seu uso para os demais ensaios foi descontinuado.

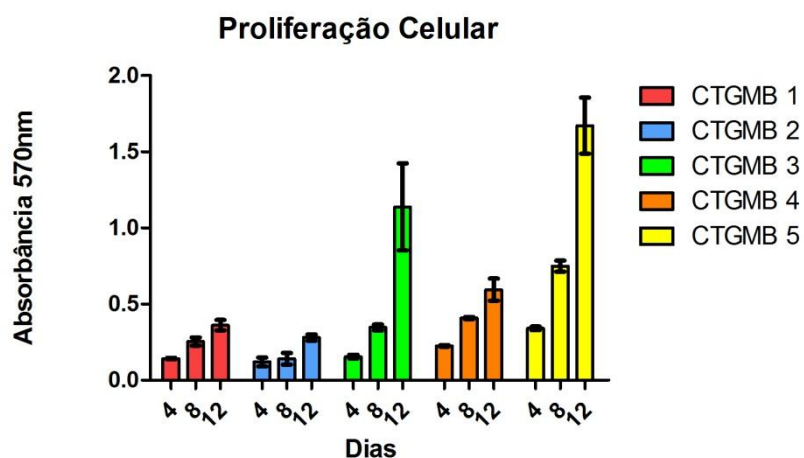


Figura 4: Gráfico de proliferação celular das linhagens CTGMB 1 a 5 obtido através de ensaio com MTT.

4.3 Avaliação da Senescência das Células-tronco do Tecido Adiposo de Glândula Mamária Bovina

As linhagens CTGMB 3 a 5 foram avaliadas em P4 quanto à sua senescência, apresentando em P6 quantidades menores em relação a quantidade inicial plaqueada (Figura 5), mas mantendo a morfologia de células-tronco. Tal resultado sugere que as CTGMB apresentam potencial terapêutico em passagens inferiores a P6.

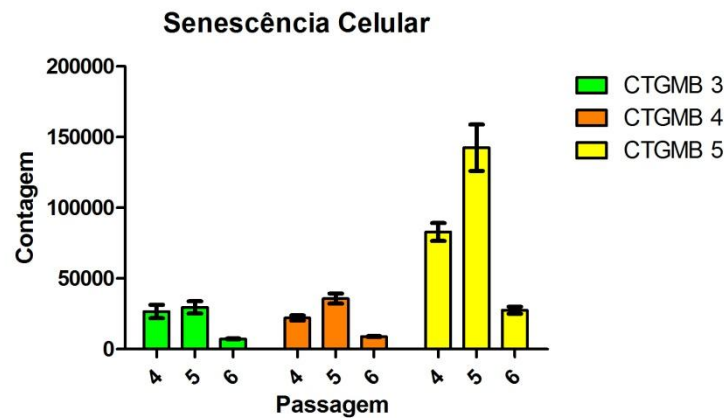


Figura 5: Gráfico de senescência celular das linhagens CTGMB 3 a 5, obtido por contagem em Câmara de Neubauer.

4.4 Caracterização Molecular das Células-tronco do Tecido Adiposo de Glândula Mamária Bovina

As linhagens CTGMB 3 a 5 foram caracterizadas molecularmente quanto à expressão de marcadores de células-tronco embrionárias, mesenquimais e hematopoiéticas, conforme descrito anteriormente (Tabela 2), a fim de se traçar um perfil molecular das células isoladas.

O perfil obtido foi semelhante para as três linhagens analisadas (Figuras 6, 7 e 8), sendo que elas não mostraram expressão dos marcadores embrionários *OCT4* e *Nanog*, porém expressaram todos os marcadores de células-tronco mesenquimais analisados (*Nestin*, *CD90*, *CD166* e *CD44*).

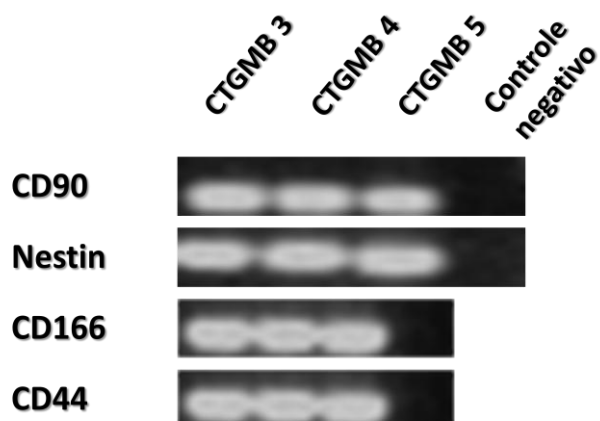


Figura 6: Análise da expressão dos marcadores mesenquimais. Gél de agarose 2% (p/v) corado com solução de brometo de etídio 0,001% (p/v). Corrida do gel em 80 v por 1h30min. Os marcadores estão mostrados lateralmente, e as linhagens analisadas estão indicadas acima da figura.

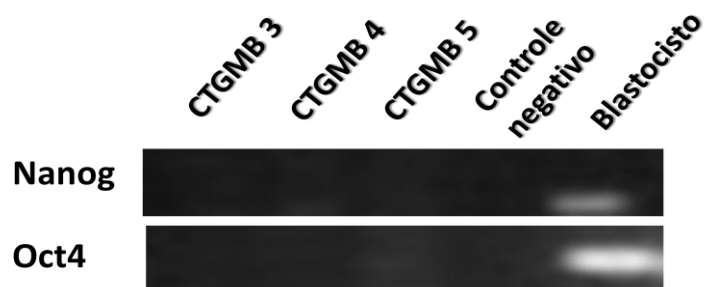


Figura 7: Análise da expressão dos marcadores embrionários. Gél de agarose 2% (p/v) corado com solução de brometo de etídio 0,001% (p/v). Corrida do gel em 80 v por 1h30min. Os marcadores estão mostrados lateralmente, e as linhagens analisadas estão indicadas acima da figura.

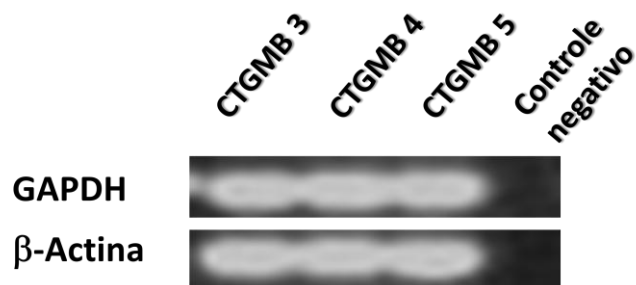


Figura 8: Análise da expressão dos controles internos. Gél de agarose 2% (p/v) corado com solução de brometo de etídio 0,001% (p/v). Corrida do gel em 80 v por 1h30min. Os marcadores estão mostrados lateralmente, e as linhagens analisadas estão indicadas acima da figura.

Estamos no momento analisando as linhagens celulares quanto à marcação hematopoiética (CD34 e CD45). Os resultados serão apresentados posteriormente.

4.5 Análise da Diferenciação das Células-tronco do Tecido Adiposo de Glândula Mamária Bovina

Células das linhagens CTGMB 3 a 5 foram testadas quanto a seu potencial de diferenciação osteogênico, e a partir do D16 do ensaio já podiam ser notadas diferenças morfológicas nas células de todas as linhagens tratadas com meio indutor. As diferenças foram evidenciadas no D21 quando as células já apresentavam claramente morfologia semelhante à osteoblastos. As fotos foram tiradas no D28, e a diferenciação foi confirmada pela coloração clássica de Von Kossa, que é específica para tecido ósseo. Com isso, foram evidenciados depósitos de cálcio extracelular e o citoesqueleto dos osteoblastos e osteócitos (Figura 9).

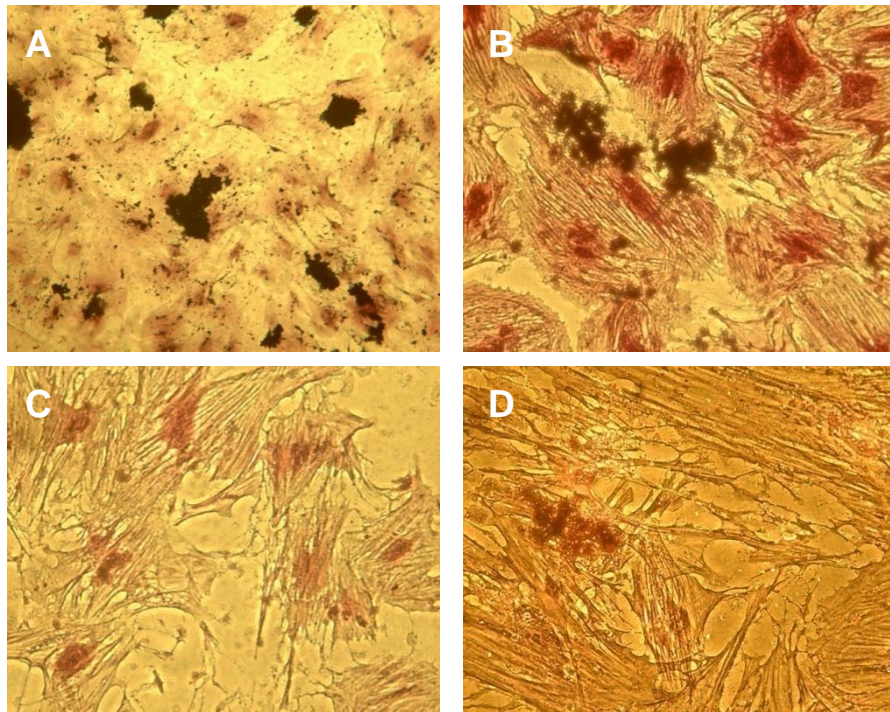


Figura 9: Coloração de Von Kossa para evidenciar a diferenciação osteogênica das CTGMB. O núcleo é corado fortemente de vermelho e o citoplasma é corado fracamente em vermelho, o citoesqueleto é corado fracamente de preto (nitrito de prata), e os depósitos extra celulares de cálcio são corados fortemente de preto. A: aumento de 40x, destaque para os vários depósitos de cálcio; B e C: aumento de 100x, destaque para pequeno depósito de cálcio em B e para a organização do citoesqueleto em C; D: aumento de 200x, destaque para organização e disposição do citoesqueleto.

A análise das diferenciações condrogênica e miogênica estão sendo feitas no momento e as mesmas serão apresentadas posteriormente.

5 DISCUSSÃO

Tendo em vista que muitos trabalhos descritos na literatura apresentam falhas na caracterização das células-tronco isoladas de bovinos, muitos deles até mesmo denominando-as simplesmente como “células com morfologia semelhante a fibroblastos”, este trabalho se posiciona de forma inovadora e pioneira uma vez que foram estabelecidos protocolos para o isolamento, caracterização e diferenciação de tais células, sem deixar dúvida que as CTGMB são as primeiras na literatura verdadeiramente tidas como células-tronco bovinas de origem na glândula mamária. Assim, ressaltamos ainda que há grande interesse na obtenção da patente desses protocolos e que a aquisição de tal *know-how* colocará o grupo de pesquisa da Embrapa Gado de Leite como referência na área.

Os resultados das CTGMB isoladas por nosso grupo sugerem que as células isoladas não têm característica de células-tronco embrionárias, apresentando um potencial mais restrito que as mesmas, talvez pelo fato de serem células-tronco adultas. Entretanto, o fato das CTGMB apresentarem marcações de células-tronco mesenquimais já torna interessante o potencial dessas células para terapia celular em bovinos, ou mesmo para clonagem por transferência nuclear, valendo ressaltar que as células-tronco mesenquimais são as mais relatadas na literatura com fins terapêuticos. A aplicação dessas células na transferência nuclear pode contribuir para aumentar a eficiência da técnica, uma vez que tratam-se de células mais progenitoras, que não têm comprometimento com um dado tipo celular. Hipotetizamos ainda que devido a esses fatores elas talvez possam contornar problemas epigenéticos que também são entraves para o aperfeiçoamento da técnica de NT.

Novamente, enfatizamos que o *know-how* e os dados aqui apresentados são inéditos e inovadores, pois na literatura não há registro de algum grupo de pesquisa que tenha chegado a tal caracterização com riqueza de detalhes em células bovinas, e assim tais protocolos para obtenção das CTGMB são passíveis de patente.

6 REFERÊNCIAS

- ARMAKOLAS, A.; KLAR, A. J. Cell type regulates selective segregation of mouse chromosome 7 DNA strands in mitosis. **Science**, v. 311, p. 1146–1149, 2006.
- BAGUISI, A.; BEHBOODI, E.; MELICAN, D. T. et al. Production of goats by somatic cell nuclear transfer. **Nat. Biotechnol.**, v. 17, p. 456-461, 1999.
- BEHBOODI, E.; CHEN, L.; DESTREMPES, M. M.; MEADE, H. M.; ECHELARD, Y. Transgenic cloned goats and the production of therapeutic proteins. **Principles of cloning**, p. 459-472, 2002.
- BENTO, M. A. F.; SILVA, V. A. P.; ALVIM, N. C. Clonagem de animais. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, v. 4, 2005.
- CAMPBELL, K. H.; MCWHIR, J.; RITCHIE, W. A. et al. Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line. **Nature**, v. 380, p. 64-66, 1996.
- CHESNE, P.; ADENOT, P. G.; VIGLIETTA, C. et al. Cloned rabbits produced by nuclear transfer from adult somatic cells. **Nat. Biotechnol.**, v. 20, p. 366-369, 2002.
- COSENTINO, L.; SHAVER-WALKER, P.; HEDDLE, J. A. The relationships among stem cells, crypts, and villi in the small intestine of mice as determined by mutation tagging. **Developmental Dynamics** v. 207, p. 420–428, 1996.
- DANIELS, R.; HALL, V.; TROUNSON, A. O. Analysis of gene transcription in bovine nuclear transfer embryos reconstructed with granulosa cell nuclei, **Biol. Reprod.**, v. 63, p. 1034-1040, 2000.
- DEOME, K. E.; FAULKIN, L. J.; BERN, H. A.; BLAIR, P. B. Development of mammary tumors from hyperplastic alveolar nodules transplanted into gland-free mammary fat pads of female C3H mice. **Cancer Research**, v. 19, p. 515-525, 1959.
- DESPONTS, C.; DING, S. Using small molecules to improve generation of induced pluripotent stem cells from somatic cells. **Methods in Molecular Biology**, v. 636, p. 207–218, 2010.
- DONTU, G.; AL-HAJJ, M.; ABDALLAH, W. M.; CLARKE, M. F.; WICH, M. S.; Stem cells in normal breast development and breast câncer. **Cell Proliferation**, v. 36, p. 59-72, 2003.
- EVANS, M. J.; KAUFMAN, M. H. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. **Nature**, v. 292, p. 154–156, 1981.

FLIEDNER, T. M.; The role of blood stem cells in hematopoietic cell renewal. **Stem Cells**, v. 16, p. 13–29, 1998.

FREITAS, V. J. F. **Transgênese em caprinos**. Produção de embriões por transferência nuclear (clonagem). Fortaleza: Multicor, 2006. p. 61-70.

FREITAS, V. J. F.; SEROVA, I. A.; ANDREEVA, L. E.; DVORYANCHIKOV, G. A.; LOPES-JUNIOR, E. S.; TEXEIRA, D. I. A.; DIAS, L. P. B.; AVELAR, S. R. G.; MOURA, R. M.; MELO, L. M.; PEREIRA, A. F.; CAJAZEIRAS, J. B.; ANDRADE, M. L. L.; ALMEIDA, K. C.; SOUSA, F. C.; CARVALHO, A. C. C.; SEROV, O. L. Production of transgenic goat (*Capra hircus*) with human Granulocyte Colony Stimulating Factor (hG-CSF) gene in Brazil. **An. Acad. Bras. Cienc.**, v. 79, p. 585-592, 2007a.

FREITAS, V. J. F.; SEROVA, I. A.; ANDREEVA, L. E.; SEROV, O. L. Estado da arte na produção de caprinos transgênicos e clonados. **Acta Sci Vet**, v. 35, p. 899-904, 2007b.

FRESHNEY, R. I. **Culture of animal cells: a manual of basic technique and specialized applications**. 6 th edition. Hoboken. NJ: Wiley-Blackwell, 2010.

HEYMAN, Y. Nuclear transfer: a new tool for reproductive biotechnology in cattle. **Reprod. Nutr. Dev.**, v. 45, p. 353–361, 2005.

HEYMAN, Y.; CHAVATTE-PALMER, P.; LEBOURHIS, D.; CAMOUS, S.; VIGNON, X.; RENARD, J. P. Frequency and occurrence of late-gestation losses from cattle cloned embryos. **Biology of Reproduction**, v. 66, p. 6–13, 2002.

HOGG, N.; HARRISON, C.; TICKLE, C. Lumen formation in the developing mouse mammary gland. **Journal of Embriology and Experimental Morphology**, v. 73, p. 39-57, 1983.

JIA, F.; WILSON, K. D.; SUN, N.; GUPTA, D. M.; HUANG, M., LI, Z.; PANETTA, N. J.; CHEN, Z. Y.; ROBBINS, R. C.; KAY, M. A.; LONGAKER, M. T.; WU, J. C. A nonviral minicircle vector for deriving human iPS cells. **Nature Methods**, v. 7, p. 197–199, 2010.

JONES, P. H.; WATT, F. M. Separation of human epidermal stem cells from transit amplifying cells on the basis of differences in integrin function and expression. **Cell**, v. 73, p. 713–724, 1993.

KATO, Y.; TANI, T.; SOTOMARU, Y. et al. Eight calves cloned from somatic cells of a single adult. **Science**, v. 282, p. 2095-2098, 1998.

KORDON, E.; SMITH, G. An entire functional mammary gland may comprise the progeny from a single cell. **Development**, v. 125, p. 1921-1930, 1998.

KOTTON, D. N.; FINE, A. Derivation of lung epithelium from bone marrow cells. **Cytotherapy**, v. 5, p. 169-173, 2003.

MARTIN, G. R. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 78, p. 7634–7648, 1981.

NIEMANN, H.; WRENZYCKI, C.; LUCAS-HAHN, A.; BRAMBRINK, T.; KUES, W. A.; CARNWATH, J. W. Gene expression patterns in bovine in vitro–produced and nuclear transfer–derived embryos and their implications for early development. **Cloning and Stem Cells**, v. 4, p. 29-38, 2002.

ONISHI, A.; IWAMOTO, M.; AKITA, T. et al. Pig cloning by microinjection of fetal fibroblast nuclei. **Science**, v. 289, p. 1188-1190, 2000.

POTTEN, C. S.; OWEN, G.; BOOTH, D. Intestinal stem cells protect their genome by selective segregation of template DNA strands. **J. Cell. Sci.**, v. 115, p. 2381–2388, 2002.

SHACKLETON, M.; VAILLANT, F.; SIMPSON, K. J.; STINGL, J.; SMYTH, G. K.; ASSELIN-LABAT, M. L.; WU, L.; LINDEMAN, G. J.; VISVADER, J. E. Generation of a functional mammary gland from a single stem cell. **Nature**, v. 439, p. 84–88, 2006.

SHIJIE, L. I.; WEIHUA, D. U.; NING, L. I. Epigenetic reprogramming in mammalian nuclear transfer. **Chinese Science Bulletin**, v. 49, p. 766-771, 2004.

SHIN, T.; KRAEMER, D.; PRYOR, J. et al. A cat cloned by nuclear transplantation. **Nature**, v. 415, p. 859, 2002.

SMITH, G. H.; MEDINA, D. Re-evaluation of mammary stem cell biology based on in vivo transplantation. **Breast Cancer Research**, v. 10, p. 203, 2008.

SMITH, G.; MEDINA, D. A morphologically distinct candidate for an epithelial stem cell in mouse mammary gland. **Journal of Cell Science**, v. 90, p. 173-178, 1988.

SOLTER, D. Mammalian cloning: advances and limitations. **Nature Reviews**, v. 1, p. 199-207, 2000.

STICE, S. L.; ROBL, J. M.; PONCE DE LEON, F. A. et al. Cloning: new breakthroughs leading to commercial opportunities. **Theriogenology**, v. 49, p. 129-138, 1998.

STINGL, J.; EAVES, C. J.; ZANDIEH, I.; EMERMAN, J. T. Characterization of bipotent mammary epithelial progenitor cells in normal adult human breast tissue. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 67, p. 93–109, 2001.

STINGL, J.; EIREW, P.; RICKETSON, I.; SHACKLETON, M.; VAILLANT, F.; CHOI, D.; LI, H. I.; EAVES, C. J. Purification and unique properties of mammary epithelial stem cells. **Nature**, v. 439, p. 993–997, 2006.

TAKAHASHI, K.; OKITA, K.; NAKAGAWA, M.; YAMANAKA, S. Induction of pluripotent stem cells from fibroblast cultures. **Nature Protocols**, v. 2, p. 3081–3089, 2007.

TAKAHASHI, K.; YAMANAKA, S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. **Cell**, v. 126, p. 663–676, 2006.

TERSKIKH, A. V.; EASTERDAY, M. C.; LI, L.; HOOD, L.; KORNBLUM, M. K.; GESCHWIND, D. H.; WEISSMAN, I. L. From hematopoiesis to neurogenesis: evidence of overlapping genetic programs. **Proceedings of the National Academy of Science of USA**, v. 98, p. 7934-7939, 2001.

TSAI, Y. C.; LU, Y.; NICHOLS, P. W.; ZLOTNIKOV, G.; JONES, P. A.; SMITH, H. S. Contiguous patches of normal human mammary epithelium derived from a single stem cell: implications for breast carcinogenesis. **Cancer Research**, v. 56, p. 2402-2404, 1996.

WAKAYAMA, T.; PERRY, A. C. F.; ZUCCOTTI, M. et al. Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. **Nature**, v. 394, p. 369-373, 1998.

WALL, R. J.; KERR D. E.; BONDIOLI, K. R. Transgenic dairy cattle: genetic engineering on a large scale. **J. Dairy Sci.**, v. 80, p. 2213-2224, 1997.

WEI, G.; SCHUBIGER, G.; HARDER, F.; MULLER, A. M. Stem cell plasticity in mammals and transdetermination in Drosophila: common themes? **Stem Cells**, v. 18, p. 409-414, 2000.

WILMUT, I. Cloning for medicine. **Sci. Am.**, v. 279, p. 58-63, 1998.

WILMUT, I.; BEAUJEAN, N.; DE SOUSA, P. A.; DINNYES, A.; KING, T. J.; PATERSON, L. A.; WELLS, D. N.; YOUNG, L. E. Somatic cell nuclear transfer. **Nature**, v. 419, p. 583-586, 2002.

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

WOODBURY, D.; REYNOLDS, K.; BLACK, I. B. Adult bone marrow stromal stem cells express germline, ectodermal, endodermal, and mesodermal genes prior to neurogenesis. **Journal of Neuroscience Research**, v. 96, p. 908-917, 2002.

YU, J.; VODYANIK, M. A.; SMUGA-OTTO, K.; ANTOSIEWICZ-BOURGET, J.; FRANE, J. L.; TIAN, S.; NIE, J.; JONSDOTTIR, G. A.; RUOTTI, V.; STEWART, R.; SLUKVIN, I. I.; THOMSON, J. A. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. **Science**, v. 318, p. 1917–1920, 2007.

ZHANG, L.; WANG, S. H.; DAI, Y.P. et al. Aberrant gene expression in deceased transgenic cloned calves. **Anim. Reprod. Sci**, 2008.

ZHOU, H.; WU, S.; JOO, J. Y.; ZHU, S.; HAN, D. W.; LIN, T.; TRAUGER, S.; BIEN, G.; YAO, S.; ZHU, Y.; SIUZDAK, G.; SCHOLER, H. R.; DUAN, L.; DING, S. Generation of induced pluripotent stem cells using recombinant proteins. **Cell Stem Cell**, v. 4, p. 381–384, 2009.