

USO DE L929 COMO CAMADA ALIMENTADORA PARA CÉLULAS-TRONCO EMBRIONÁRIAS HUMANAS

Juliana F. Mangolin, Cristina Pacheco Soares, Newton S. da Silva

Laboratório de Biologia Molecular e Tecidual/Universidade do Vale do Paraíba, Av. Shishima Hifumi, 2911.
CEP: 12.211-300. São José dos Campos – SP – Brasil
E-mail: julianamangolin@hotmail.com

Resumo- O isolamento de células-tronco embrionárias humanas foi reportado pela primeira vez em 1998, e desde então tem sido observado um crescimento exponencial no número de experimentos com estas células, envolvendo melhoria nas condições de cultura, manipulação genética e indução de diferenciação em vários tecidos. As hESC pluripotentes são isoladas da massa celular interna dos blastocistos e representam uma fonte potencialmente ilimitada de células para a engenharia de tecido. Tais células foram tradicionalmente cultivadas diretamente em células alimentadoras, como os fibroblastos embrionários de camundongo ou linhagem celular de fibroblasto de camundongo. Baseando-se na interação célula-tronco/fibroblasto, o estudo teve como objetivo avaliar a adaptação das hESC a células L929 inativadas como camada alimentadora e pudemos concluir que, a L929 inativada também se mostra efetiva frente à cultura de células-tronco, apresentando formação de colônias de hESC e mantendo as mesmas com morfologia semelhante a de células indiferenciadas.

Palavras-chave: Células-Tronco Embrionárias Humanas, L929

Área do Conhecimento: Ciências Biológicas

Introdução

Pesquisas com células-tronco se tornaram um campo promissor para a regeneração de tecido e aplicação em medicina regenerativa. Desde a descoberta e caracterização de células-tronco mesenquimais multipotentes da medula óssea, populações de outros tecidos semelhantes têm sido caracterizadas. Células-tronco pós-natal têm sido isoladas de vários tecidos, incluindo medula óssea, cérebro, pele, músculo esquelético e trato gastrointestinal (JAVAZON *et al.*, 2004). Células-tronco embrionárias humanas (hESCs) têm uma característica comum; são capazes de gerar células-filhas idênticas por divisões celulares ilimitadas e se diferenciar em todos os tipos de células (CARPENTER *et al.*, 2004).

O objetivo inicial do cultivo de células-tronco embrionárias de camundongos era apenas obter animais transgênicos. Em 1998, o pesquisador James Thomson, da Universidade de Wisconsin e o pesquisador John Gearhart, da Universidade Johns Hopkins, entraram para a história como os primeiros cientistas a cultivarem células-tronco embrionárias humanas (hESC) *in vitro* (HSIN-FU CHEN, *et al.*, 2009). Em 2 de Outubro de 2008, a geneticista Profa. Dra. Lygia da Veiga Pereira, da Universidade de São Paulo (USP), anunciou ter obtido a primeira linhagem brasileira de células-tronco embrionárias, a BR-1.

As hESC pluripotentes isoladas da massa celular interna dos blastocistos, representam uma fonte potencialmente ilimitada de células para a

engenharia de tecido. Enquanto a capacidade proliferativa das células-tronco adultas é limitada pela idade e pelo tempo, hESC proliferam por muito mais tempo e podem diferenciar-se em qualquer tipo de célula no corpo (BONGSO, *et al.*, 1994). Estas células imortais podem ser mantidas em cultura em seu estado não diferenciado indefinidamente, mantendo sua capacidade proliferativa e ter o único objetivo de originar células e tecidos de todas as três camadas dos folhetos embrionários, assim como células trofoblásticas. Essas características fazem das hESC excelente modelo para estudos biológicos, permitindo a compreensão dos mecanismos de diferenciação celular, assim como o desenvolvimento de processos normais. Além disso, elas podem ser potencialmente usadas como uma fonte renovável de populações de células na área da medicina regenerativa para o tratamento de doenças degenerativas humanas (XU, 2001) e a utilização das mesmas na construção de órgãos artificiais.

As hESC foram tradicionalmente cultivadas diretamente em células alimentadoras ou na matriz extracelular suplementada com o meio condicionado (CM) obtido de células alimentadoras, tais como os fibroblastos embrionários de camundongo (MEF) ou linhagem celular de fibroblasto de camundongo (RICHARDS, *et al.* 2002). Com base em experiências de células tronco embrionárias de camundongos (mESC), foi relatado que linhagens de hESC foram cultivadas com células

alimentadoras de fibroblasto fetal de camundongo mitoticamente inativadas, que também mantiveram as hESC indiferenciadas. Em contraste com a situação de mESC, fatores de inibição de leucemia sozinhos não mantêm as hESC indiferenciadas. O uso de células de fibroblasto de camundongo como alimentação, inibe em grande parte a diferenciação espontânea de hESC *in vitro* e a remoção dessas células conduz a diferenciação significativamente acentuada (BONGSO, 1989).

Baseando-se na interação célula-tronco/fibroblasto, o estudo teve como objetivo avaliar a adaptação das hESC em células L929 como camada alimentadora.

Metodologia

A linhagem utilizada foi a BR-1, cedida pela Profa. Dra. Lygia da Veiga Pereira.

As hESC foram cultivadas em placas tratadas para cultura de células. Os fibroblastos foram aderidos nas placas revestidas com gelatina a 0,2% e posteriormente, as hESC foram plaqueadas sobre eles.

Os meios utilizados – hESC e MEF foram trocados todos os dias a fim de obter condições favoráveis para o crescimento e não diferenciação das mesmas.

Todos os meios e procedimentos foram realizados sob condições de assepsia total e as culturas mantidas em estufa a 37°C em atmosfera com 5% de CO₂.

Com base nas experiências de células-tronco embrionárias de camundongos, foi relatado que linhagens de hESC foram cultivadas com células alimentadoras de fibroblasto fetal de camundongo mitoticamente inativadas, que também manteve as hESC indiferenciadas (OUTI HOVATTA, *et al.*, 2003). Para assegurar que as hESC permaneceriam indiferenciadas, a L929 foi então mitoticamente inativada pelo tratamento com mitomicina C por um período de 3h. Logo após foi lavada 3 a 4x com PBS a fim de retirar todo o vestígio da mitomicina e garantir a integridade das células.

A solução de gelatina foi preparada a 0,2% em água ultra-pura revestindo assim a placa. Posteriormente, as células L929, já inativadas, foram adicionadas sobre a gelatina fornecendo uma camada confiável de fibroblastos. 24h após o plaqueamento dos mesmos sobre a gelatina, as hESC foram então plaqueadas sobre a cultura de L929.

Após 24h do plaqueamento da hESC, o meio foi trocado parcialmente e, 48h depois foi realizada a troca total do meio.

Resultados

Como descrito por Stephanie Watson, hESC são massas redondas e densas que se dividem formando colônias. Figura 1.

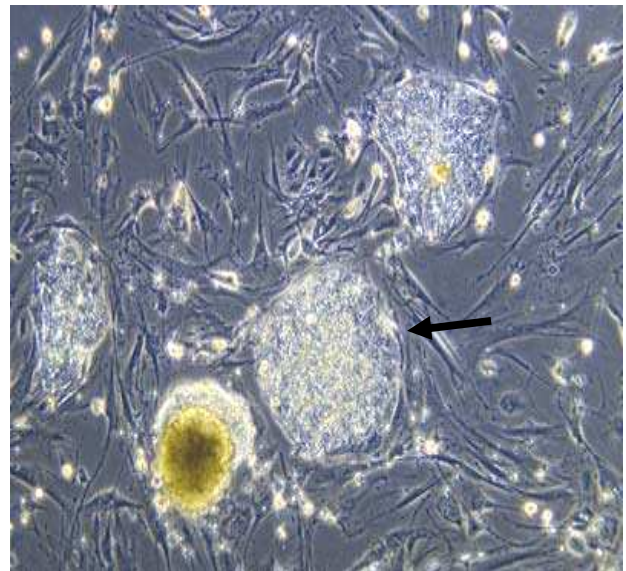


Foto cedida por Universidade de Wisconsin, Board of Regents

Figura 1: Vista microscópica 10x de uma colônia de células-tronco embrionárias (as colônias de células-tronco são as massas redondas e densas de células).

Após inativação da L929 e plaqueamento de hESC sobre a mesma, observou-se o crescimento contínuo e formação de colônias de células-tronco em 7 dias de cultura, como mostra a figura 2.

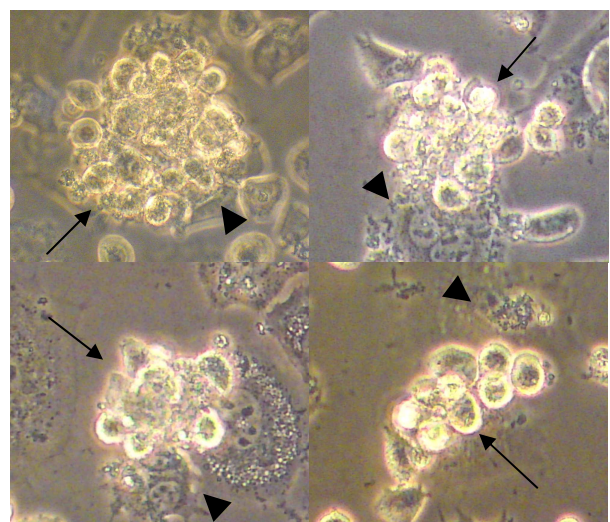


Figura 2: Imagem microscópica 20x de um co-cultivo de células hESC em cultura de fibroblastos L929 após 7 dias de cultura. Seta indica cultura de hESC e cabeça de seta indica fibroblastos inativados.

Discussão

Nos últimos anos, a investigação extensiva para melhor sistemas de cultura de células hES rendeu três principais avanços: 1) a habilidade de crescer células sob condições livres de soro, 2) a manutenção de células no estado não diferenciado em matriz Matrigel com 100% MEF – meio condicionado e 3) o uso de fibroblastos embrionários humanos, epitélio da trompa de falópio adulta ou fibroblasto de prepúcio como camada alimentadora (REUBINOFF, *et al.* 2001). Entretanto, Richards *et al.* em 2002-2003, concluiu que por algumas razões, células MEF parecem suportar melhor o crescimento de células hES que alimentadores humanos (SCHULDINER, *et al.* 2000).

Em 1989, Bongso afirmou que o uso de células de fibroblastos de camundongo como alimentação, inibe em grande parte a diferenciação espontânea de hESC *in vitro* e a remoção dessas células conduz a diferenciação significativamente acentuada.

Em nossos estudos, a L929 inativada também se mostra efetiva frente à cultura de células-tronco, apresentando formação de colônias de hESC e mantendo as mesmas com aparência semelhante a de células indiferenciadas. Isso se deve a interação células-tronco/fibroblasto, que por sua vez possui a capacidade de alimentar tais células permitindo sua proliferação e não diferenciação.

Conclusão

As células L929, quando inativadas, permitem a formação de colônias de células-tronco embrionárias humanas em apenas 7 dias de cultivo, mantendo-as com aparência de células indiferenciadas.

Agradecimentos

A Profa. Dra. Lygia da Veiga Pereira pela linhagem cedida.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

Referências

- BONGSO A, FONG C-Y, NG SC et al. Isolation and culture of inner cell mass cells from human blastocysts. Hum Reprod 1994; 9:2110-2117.
- BONGSO A, FONG C-Y, NG SC et al. The growth of inner cell mass cells from human blastocysts (abstract). Theriogenology 1994; 41:161.

- BONGSO A, FONG C-Y, NG SC et al. Establishment of human ampullary cell cultures. Hum Reprod 1989; 4:486-494.

- CARPENTER MK, ROSLER ES, FISK GJ, BRANDENBERGER R, ARES X, MIURA T, LUCERO M AND RAO MS. Properties of four human embryonic stem cell lines maintained in a feeder-free culture system. Dev Dyn 2004; 229:243-58.

- HSIN-FU CHEN, CHING-YU CHUANG et al. Novel autogenic feeders derived from human embryonic stem cells (hESCs) support an undifferentiated status of hESCs in xeno-free culture conditions. Hum Reprod 2009; Vol.24, No.5 pp. 1114–1125.

- JAVAZON EH, BEGGS KJ, FLAKE AW. Mesenchymal stem cells: paradoxes of passaging. Exp Hematol 2004; 32: 414-425.-3 Le Blanc K, Pittenger M. Mesenchymal stem cells: progress toward promise. Cytotherapy 2005; 7: 36-45.

- OUTI HOVATTA, MILLA MIKKOLA, KARIN GERTOW et al. A culture system using human foreskin fibroblasts as feeder cells allows production of human embryonic stem cells. Hum Reprod 2003; Vol.18, No.7 pp. 1404±1409.

- REUBINOFF BE, PERA MF, VAJTA G et al. Effective cryopreservation of human embryonic stem cells by the open pulled straw vitrification method. Hum Reprod 2001; 10:2187-2194.

- RHEE SG. Redox signaling: hydrogen peroxide as intra-cellular messenger. Exp Mol Med 1999; 31:53-9.

- RICHARDS M, FONG C-Y, CHAN W-K et al. Human feeders support prolonged undifferentiated growth of human inner cell masses and embryonic stem cells. Nat Biotechnol 2002; 20:933-936.

- SCHULDINER M, YANUKA O, ITSKOVITZ-ELDOR J et al. Effects of eight growth factors on the differentiation of cells derived from human embryonic stem cells. Proc Natl Acad Sci USA 2000; 97:11307-11312.

- XU C, INOKUMA MS, DENHAM J et al. Feeder-free growth of undifferentiated human embryonic stem cells. Nat Biotechnol 2001; 19:971-974.

"HowStuffWorks - Stephanie Watson". Publicado em 19 de fevereiro de 2005 (atualizado em 21 de fevereiro de 2007)



<http://ciencia.hsw.uol.com.br/stephanie-watson.htm> (09 de setembro de 2010).