

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

**Juliana F. Mangolin; Andreza C. de Siqueira Silva; Eriane Eller de Siqueira; Cristina Pacheco Soares; Newton S. da Silva**

Laboratório de Biologia Celular 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](mailto: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 não se mostrou efetiva no cultivo de hESC por induzirem acentuada diferenciação nas mesmas.

**Palavras-chave:** Células-Tronco Embrionárias Humanas, L929, Diferenciação

**Área do Conhecimento:** Ciências Biológicas

### Introdução

O estudo das células-tronco tem-se mostrado uma área bastante explorada nos diversos segmentos da biologia nos últimos dez anos. Esse crescente interesse está relacionado às possibilidades que as células-tronco (CT) oferecem em terapias celulares, representando uma revolução no entendimento dos mecanismos de reparo e regeneração tecidual. Destaca-se ainda o fato de poderem ser aplicadas em terapias para diversas doenças para as quais não há tratamento eficaz. As células-tronco podem ser definidas segundo três propriedades: I) auto-renovação, ou seja, capacidade de originar outra CT com características idênticas; II) habilidade de se diferenciar em mais de uma linhagem celular; e III) capacidade de originar células funcionais nos tecidos derivados da mesma linhagem (SCHWIND, 2005).

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 Prof<sup>a</sup>. Dra. Lygia da Veiga Pereira, da Universidade de São Paulo (USP), anunciou ter

obtido a primeira linhagem brasileira de células-tronco embrionárias humanas (hESC), a BR-1.

As hESC tem sido tradicionalmente cultivadas diretamente em células “feeder” (camada alimentadora) (CHEN et al., 2007) ou em matriz extracelular suplementada com meio condicionado obtidos de células “feeders”, tal como fibroblastos embrionários de camundongo (MEF) ou linhagens celulares de fibroblasto de camundongo (PARK et al., 2004). 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 e verificar se as mesmas suportam o crescimento indiferenciado das células-tronco embrionárias humanas.

### Metodologia

As linhagens utilizadas foram a BR-1, gentilmente cedida pela geneticista Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Lygia da Veiga Pereira, da Universidade de São Paulo (USP) e L929 (Fibroblastos de Camundongo) como “feeder” para as células-tronco.

As hESC foram cultivadas em placas tratadas para cultura de células de 35x10mm (Corning). O meio utilizado – hESC (Meio para Células-Tronco Embrionárias Humanas) suplementado com bFGF, foi trocado todos os dias a fim de obter condições favoráveis para o crescimento e não diferenciação das mesmas. A linhagem celular L929 também foi cultivada em placas tratadas para cultura de células de 35x10mm e o meio MEM (Meio Mínimo Essencial) suplementado com 10% SFB (Soro Fetal Bovino) foi trocado a cada 2 dias. As culturas foram mantidas em estufa a 37°C em atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub>.

Com base nas experiências de células-tronco embrionárias de camundongos, foi relatado que linhagens de hESC foram cultivadas com células de fibroblasto fetal de camundongo como “*feeder*” mitoticamente inativadas, que também manteve as hESC indiferenciadas (OUTI HOVATTA, *et al.*, 2003). Para assegurar que as hESC permaneceriam no mesmo estado, 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 (Tampão Fosfato Salino) a fim de retirar todo o vestígio da mitomicina C e garantir a integridade das células.

Com o intuito de manter as CT sempre indiferenciadas e em um ambiente propício ao seu crescimento as células eram passadas conforme sua necessidade (a cada 7 dias/5 dias).

O meio velho foi retirado e adicionado meio novo. Com o auxílio do microscópio no fluxo e de uma seringa de insulina, “jogo da velha” foi feito sobre as colônias e com uma ponteira estéril, os pedaços das mesmas eram retirados gentilmente da placa. Com uma pipeta automática o meio contendo as colônias foi adicionado na placa de L929 inativada.

Após este procedimento, a cultura foi mantida em estufa por 48h para que aderisse sem perturbações.

Para observar a distribuição da glicoproteína de superfície E-caderina, as células foram fixadas com PA (Paraformaldeído) a 4% por 15 minutos, permeabilizadas com Triton X-100 a 0,2% por 10 minutos e bloqueadas com BSA (Soro Albumina Bovina) a 1% por 30 minutos. Em seguida, foram incubadas por 30 minutos em temperatura ambiente com o anticorpo primário mouse anti-E-caderina em uma concentração de 1:100. Foram então lavadas com PBS contendo 2% de BSA e incubadas por 30 minutos com o anticorpo secundário anti-mouse conjugado com FITC a 1:100.

## Resultados

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

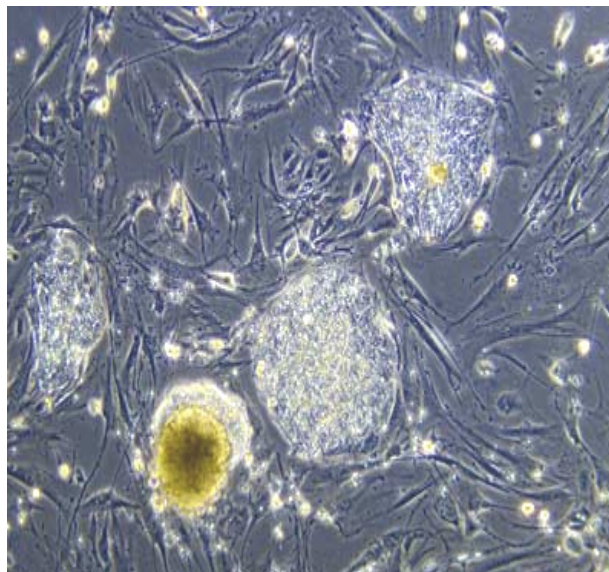


Figura 1: Vista microscópica 10x de uma colônia de células-tronco embrionárias (as colônias de células-tronco são as massas redondas e densas de células).

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.

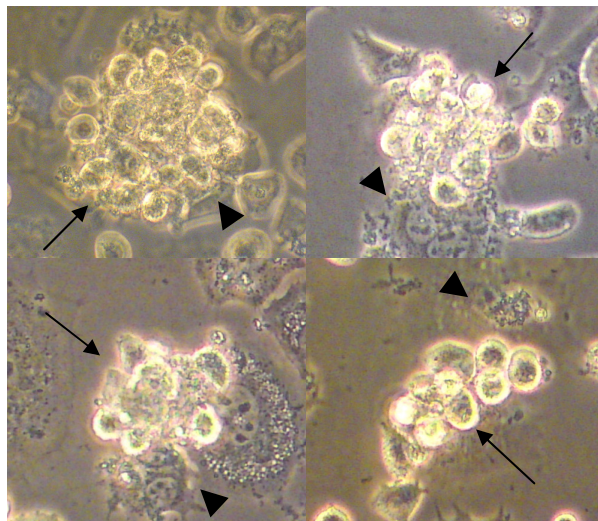


Figura 2: Imagem microscópica 20x de um co-cultivo de células hESC em cultura de fibroblastos L929 após 7 dias de cultura. Seta indica cultura de hESC e cabeça de seta indica fibroblastos inativados.

Entretanto, pouca marcação do anticorpo primário E-caderina pode ser observado, o que



indica acentuada diferenciação das células-tronco embrionárias humanas como mostra a Figura 3.

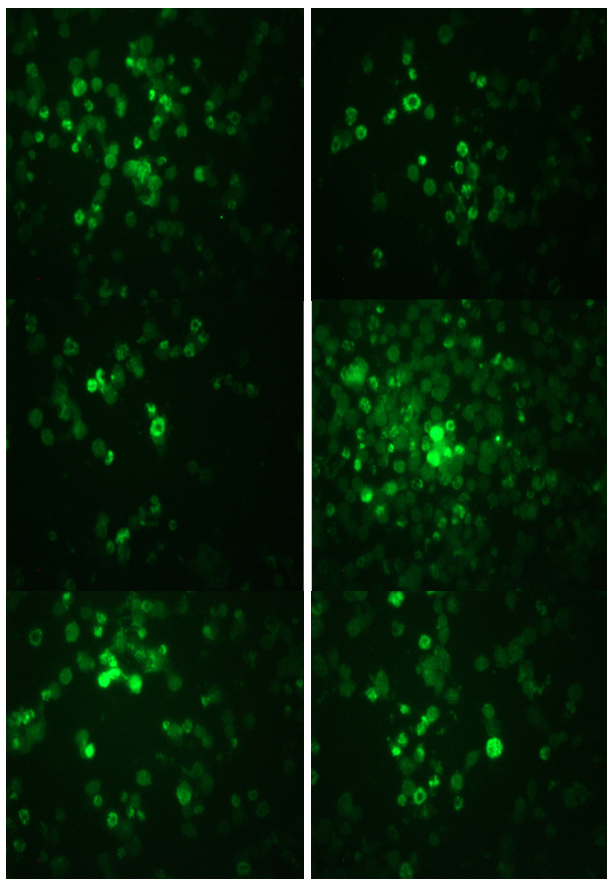


Figura 3: Vista microscópica de 40x de colônias/células de hESC marcadas com E-caderina.

### Discussão

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). Embora a literatura descreva células de fibroblasto de camundongo como um “feeder” efetivo no cultivo de hESC, em nosso estudo, foi possível mostrar que, uma linhagem de fibroblasto de camundongo, L929, suporta o crescimento de células-tronco embrionárias humanas, permitindo a formação de colônias, como mostra a figura 2, embora também tenha ocorrido diferenciação das mesmas. Essa diferenciação pode ter sido causada por fatores secretados pelos fibroblastos, sinalizando então a diferenciação das hESC, já que as células-tronco são influenciadas pelo nicho que ocupam.

Pesquisadores da Delbr-ck Max Center for Molecular Medicine (MDC) Berlin-Buch descobriram o que permite as células-tronco

embrionárias de se diferenciarem em diversos tipos de células e, portanto, a ser pluripotentes. Esta pluripotência depende de uma molécula específica - a E-caderina - até então conhecida principalmente por seu papel na mediação da adesão célula-célula como uma espécie de “cola intracelular”. Se a E-caderina está ausente, as células-tronco perdem a sua pluripotência. A molécula também desempenha um papel crucial na reprogramação de células somáticas (células do corpo) em células-tronco pluripotentes (*EMBO Reports*, publicação on-line, 27 de maio de 2011; doi: 10.1038/embor.2011.88).

A marcação com E-caderina mostra colônias de hESC com grande número de células, mas também mostra a pouca expressão da glicoproteína. Os resultados revelam que as colônias de hESC tem perdido sua pluripotência durante seu cultivo com a L929 como “feeder”.

### Conclusão

Com o presente estudo, pode-se concluir que a L929 não se mostrou efetiva no cultivo de células-tronco embrionárias humanas, pois quando utilizadas como “feeder” induz acentuada diferenciação nas mesmas.

### Referências

- BONGSO A, FONG C-Y, NG SC et al. Establishment of human ampullary cell cultures. **Hum Reproduction**; 4:486-494, 1989.
- CHEN HF, KUO HC, CHIEN CL, SHUN CT, YAO YL, IP PL, CHUANG CY, WANG CC, YANG YS, HO HN. Derivation, characterization and differentiation of human embryonic stem cells: comparing serum-containing versus serum-free media and evidence of germ cell differentiation. **Hum Reproduction**; 22:567–577, 2007.
- HSIN-FU CHEN, CHING-YU CHUANG, YU-KAI SHIEH, HAO-WEI CHANG, HONG-NERNG HO, HUNG-CHIH KUO. Novel autogenic feeders derived from human embryonic stem cells (hESCs) support an undifferentiated status of hESCs in xeno-free culture conditions. **Human Reproduction**, 24:1114–1125, 2009.
- 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 Reproduction**; Vol.18, No.7 pp. 1404±1409, 2003.
- PARK SP, LEE YJ, LEE KS, AH SHIN H, CHO HY, CHUNG KS, KIM EY, LIM JH. Establishment of human embryonic stem cell lines from frozen-

# XVINIC

Encontro Latino Americano  
de Iniciação Científica

# XI EPG

Encontro Latino Americano  
de Pós Graduação

# VINIC Jr

Encontro Latino Americano  
de Iniciação Científica Júnior

thawed blastocysts using STO cell feeder layers.

**Hum Reproduction**;19:676–684, 2004.

- SCHWINDT TT, BARNABÉ GF, MELLO LEAM –  
Proliferar ou diferenciar? Perspectivas de destino  
das células-tronco **J Bras Neurocirurg** 16(1), 13-  
19, 2005.

- "*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](http://ciencia.hsw.uol.com.br/stephanie-watson.htm) Acesso em: 21 de agosto, 2011,  
23h33.

- [http://www.news-  
medical.net/news/20110527/10071/Portuguese.as  
px](http://www.news-medical.net/news/20110527/10071/Portuguese.aspx) Acesso em: 21 de agosto, 2011, 23h28.