

JULIANA ANDREA DE OLIVEIRA GEORGES

**DERIVAÇÃO DE NOVAS LINHAGENS BRASILEIRAS DE CÉLULAS-TRONCO EMBRIONÁRIAS
HUMANAS SOB CONDIÇÕES FISIOLÓGICAS DE OXIGÊNIO**

CAMPO GRANDE

2014

JULIANA ANDREA DE OLIVEIRA GEORGES

**DERIVAÇÃO DE NOVAS LINHAGENS BRASILEIRAS DE CÉLULAS-TRONCO EMBRIONÁRIAS
HUMANAS SOB CONDIÇÕES FISIOLÓGICAS DE OXIGÊNIO**

Tese apresentada como requisito para a obtenção do título de Doutor pelo Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, sob a orientação da Profa. Dra. Iandara Schettert Silva.

CAMPO GRANDE

2014

FOLHA DE APROVAÇÃO

A tese intitulada DERIVAÇÃO DE NOVAS LINHAGENS BRASILEIRAS DE CÉLULAS-TRONCO EMBRIONÁRIAS HUMANAS SOB CONDIÇÕES FISIOLÓGICAS DE OXIGÊNIO, apresentada por JULIANA ANDREA DE OLIVEIRA GEORGES, como exigência para a obtenção do grau de Doutor em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste, à banca examinadora, na Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, MS, obteve conceito _____.

BANCA EXAMINADORA

Iandara Schettert Silva

Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS)

Andréia Conceição Milan Brochado Antonioli da Silva

Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS)

José Luiz Guimarães de Figueiredo

Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS)

José Peixoto Ferrão Junior

Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS)

Maria de Fátima Cepa Matos

Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS)

Rodrigo Juliano Oliveira

Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS)

“Há que tornar a ungir os cavalos guerreiros e levar a luta até ao fim; porque quem nunca descansa, quem com o coração e o sangue pensa em conseguir o impossível, esse triunfa.”

(I Ching)

Dedico todo esse sucesso em memória à minha mãe, Alice de Oliveira Georges, que nos deixou este ano e tenho certeza que continuará me guiando como sempre fez.

A Deus, à minha família e aos meus amigos, pelo carinho e incentivo constante, pelo exemplo de luta e perseverança.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, em especial, gostaria de agradecer à **Profa. Dra. Iandara Schettert Silva** pela oportunidade e valiosa ajuda em tornar esta tese realidade. Sou grata, também, pela orientação e dedicação com que acompanhou a execução da mesma em todas as suas etapas. Para mim, é uma imensa honra e orgulho tê-la como orientadora. Sou grata pelos seus eternos ensinamentos, pelo grande exemplo de profissionalismo e dignidade, pelo estímulo e dedicação, pelo meu grande aprendizado e pela sua estimável confiança.

O meu agradecimento especial à **Profa. Dra. Lygia da Veiga Pereira**, por ter me acolhido em seu laboratório juntamente com toda a sua equipe durante todo o meu experimento.

Aos professores doutores, membros da banca examinadora, **Andréia Conceição Milan Brochado Antonioli da Silva, José Luiz Guimarães de Figueiredo, José Peixoto Ferrão Junior, Maria de Fátima Cepa Matos e Rodrigo Juliano Oliveira**, pela dedicação, compreensão e colaboração em contribuir com a minha formação.

Aos alunos e funcionários da Universidade de São Paulo (USP) e da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), principalmente às alunas de doutorado **Naja Vergani, Simone Fonseca e Ana Maria Fraga**, pela pronta ajuda sempre que necessária.

À FERTVITRO - Centro de Reprodução Humana, em especial às biólogas, **Litsuko Fujihara e Maria Cecília Albuquerque**, pelo apoio e valiosa contribuição para esta tese se tornar realidade.

Ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico/Departamento de Ciência e Tecnologia do Ministério da Saúde (CNPq/DECIT/MS)**, ao **Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social (BNDES)**, à **Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP)**, à **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)** e a **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)**, pelo apoio financeiro e tecnológico para realização desta tese.

A todos que, com boa intenção, colaboraram, direta ou indiretamente para a realização e finalização desta tese.

RESUMO

No estudo atual, duas linhagens de células-tronco embrionárias humanas, designadas BR-4 (46,XY) e BR-5 (46,XX), foram estabelecidas em condições ambientais com 5% de oxigênio, derivadas de embriões humanos gerados por fertilização *in vitro*. Estas linhagens foram caracterizadas e apresentaram (i) morfologia com colônias compactas e bordas bem definidas, (ii) células uniformes, (iii) controle da pluripotência sem diferenciação espontânea, (iv) congelamento e descongelamento estável, (v) comprovação positiva de pluripotência para os genes OCT 3/4, SSEA-4 e NANOG, (vi) cariótipo normal, (vii) aptidão à formação de corpos embrióides e à diferenciação espontânea, (viii) comprovação positiva de diferenciação para os genes Sox17, MyoD e NESTIN e (ix) formação de teratoma com diferenciação nos tecidos dos três folhetos embrionários. Após sete meses de expansão e caracterização, a BR-4 e BR-5, foram as primeiras linhagens brasileiras derivadas em condições ambientais com 5% de oxigênio e, nesta condição, comprovaram (i) aumento na proliferação celular, (ii) controle da diferenciação e (iii) controle de anormalidades cromossômicas. Estas linhagens podem ser multiplicadas quase que indefinidamente e suprir a necessidade de pesquisa de vários pesquisadores. Assim, se tornaram ferramentas experimentais importantes para a compreensão da diferenciação e desenvolvimento celular, e podem oferecer uma ampla gama de aplicações potenciais, incluindo a prevenção, diagnóstico e tratamento de doenças humanas.

Palavras-chave: célula-tronco embrionária, derivação, oxigênio.

ABSTRACT

In the current study, two lineages of human embryonic stem cells, designated BR-4 (46, XY) and BR-5 (46, XX), were established in environmental conditions with 5% oxygen, derived from human embryos created by *in vitro* fertilization. These lineages were characterized and showed (i) morphology with compact colonies and definite outskirts, (ii) uniform cells, (iii) control without spontaneous differentiation pluripotency, (iv) freezing and thawing stable, (v) positive evidence for the pluripotency OCT 3/4, SSEA-4 and NANOG genes, (vi) normal karyotype, (vii) ability to the embryoid bodies formation and spontaneous differentiation, (viii) positive evidence of differentiation for SOX17, MyoD and NESTIN genes and (ix) teratoma formation with differentiation in the tissues of the three germ layers. After seven months of expansion and characterization, BR-4 and BR-5, were the first Brazilian lineages derived at ambient conditions with 5% oxygen and this proved condition (i) increase in cell proliferation, (ii) control the differentiation and (iii) control of chromosomal abnormalities. These lineages can be multiplied almost indefinitely and to meet the research needs of many researchers. Thus, experimental tools have become important for understanding the development and cell differentiation, and may offer a wide range of potential applications, including the prevention, diagnosis and treatment of human diseases.

Keywords: embryonic stem cell, derivation, oxygen.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	14
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	16
3 OBJETIVOS.....	21
3.1 Geral.....	21
3.2 Específicos.....	21
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	22
4.1 Local.....	22
4.2 Considerações Éticas.....	22
4.3 Amostra.....	22
4.4 Procedimentos.....	22
4.4.1 Isolamento da <i>ICM</i>	23
4.4.2 Teste de criopreservação.....	23
4.4.3 Análise de cariótipo.....	24
4.4.4 Teste de imunohistoquímica.....	24
4.4.5 Teste de formação de corpo embrióide.....	24
4.4.6 Teste de formação de teratoma (<i>in vivo</i>).....	25
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	26
6 CONCLUSÕES.....	33
REFERÊNCIAS.....	34
ANEXOS.....	39
ARTIGO.....	43

LISTA DE ABREVIATURAS

ASC	do inglês, <i>Adult Stem Cell</i>
ATP	do inglês, <i>Adenosine Triphosphate</i>
bFGF	do inglês, <i>basic Fibroblast Growth Factor</i>
BL	do inglês, <i>Blastocyst</i>
BME	do inglês, β - <i>Mercaptoethanol</i>
BNDES	Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social
BSA	do inglês, <i>Bovine Serum Albumin</i>
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
DECIT	Departamento de Ciência e Tecnologia
DMEM	do inglês, <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	do inglês, <i>Dimethylsulphoxide</i>
DPBS	do inglês, <i>Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline</i>
Dra.	Doutora
EB	do inglês, <i>Embryoid Body</i>
ECC	do inglês, <i>Embryonal Carcinoma Cell</i>
ESC	do inglês, <i>Embryonic Stem Cell</i>
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
FBS	do inglês, <i>Fetal Bovine Serum</i>
FINEP	Financiadora de Estudos e Projetos
hESC	do inglês, <i>human Embryonic Stem Cell</i>
HLA	do inglês, <i>Human Leukocyte Antigen</i>
IB	Instituto de Biociências
ICM	do inglês, <i>Inner Cell Mass</i>
IVF	do inglês, <i>in vitro Fertilization</i>
KCL	do inglês, <i>Potassium Chloride</i>
KO-DMEM	do inglês, <i>KnockOut Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
KO-SR	do inglês, <i>KnockOut Serum Replacer</i>
LaNCE	Laboratório Nacional de Células-Tronco Embrionárias
LIF	do inglês, <i>Leukemia Inhibitory Factor</i>
MEF	do inglês, <i>Mouse Embryonic Fibroblast</i>
mESC	do inglês, <i>mouse Embryonic Stem Cell</i>
MO	do inglês, <i>Morula</i>
MS	Ministério da Saúde
MSC	do inglês, <i>Mesenchymal Stem Cell</i>
NEAA	do inglês, <i>Non-Essential Amino Acids</i>
NIH	do inglês, <i>National Institute of Health</i>

<i>NOD / SCID</i>	do inglês, <i>Non-obese diabetic / Severe Combined Immunodeficiency</i>
<i>PFA</i>	do inglês, <i>Paraformaldehyde</i>
Profa.	Professora
<i>Px</i>	do inglês, <i>Passage</i>
<i>RT</i>	do inglês, <i>Room Temperature</i>
<i>SC</i>	do inglês, <i>Stem Cell</i>
<i>SR</i>	do inglês, <i>Serum Replacement</i>
UFMS	Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
USP	Universidade de São Paulo

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
®	Marca registrada
µg	Micrograma
µl	Microlitro
µM	Micromolar
µm	Micrômetro
CO ₂	Gás carbônico
G	Gauges
Kg	Kilograma
M	Molar
Mg	Miligrama
ml	Mililitro
mM	Milimolar
Ng	Nanograma
nº	Número
O ₂	Oxigênio
°C	Grau Celsius
pH	Potencial hidrogeniônico
rpm	Rotação por minuto
U	Unidade
β	Beta

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Etapas do processo de isolamento e derivação das linhagens de <i>hESCs</i> . (A) BR-4 e (B) BR-5. <i>ICMs</i> aderidos em <i>MEFs</i> depois de 9 dias (D9), 10 dias (D10), 11 dias (D11) e 12 dias (D12) em cultivo celular.....	27
Figura 2 –	Análise morfológica característica de estrutura compacta de colônia de <i>hESCs</i> . Colônia herméticamente uniforme e com bordas definidas na periferia. Núcleo grande em comparação com citoplasma e nucléolo proeminente.....	28
Figura 3 –	Expressão de marcadores de pluripotência das linhagens de <i>hESCs</i> , BR-4 e BR-5, por imunohistoquímica. As colônias, BR-4 e BR-5, indiferenciadas, foram positivas para os marcadores OCT 3/4 (vermelho), SSEA-4 (vermelho) and NANOG (verde). Núcleos foram contrastados com DAPI (azul).....	29
Figura 4 –	Análise de cariótipo das linhagens de <i>hESCs</i> , BR-4 e BR-5, com <i>G-banding</i> das células na passagem 10. A BR-4 mostrou cariótipo masculino normal (46, XY) e a BR-5 mostrou cariótipo feminino normal (46, XX).....	30
Figura 5 –	Etapas do processo de diferenciação das linhagens de <i>hESCs</i> . (A) Formação de corpos embrióides das linhagens de <i>hESCs</i> , BR-4 e BR-5, em suspensão, em placas de cultivo celular não aderente. (B) Diferenciação espontânea das linhagens de <i>hESCs</i> , BR-4 e BR-5, aderidas em placas de cultivo celular aderente.	30
Figura 6 –	Expressão de marcadores de pluripotência das linhagens de <i>hESCs</i> , BR-4 e BR-5, por imunohistoquímica. As colônias, BR-4 e BR-5, diferenciadas, foram positivas, para os marcadores SOX17 (verde), MyoD (verde) e NESTIN (verde). Núcleos foram contrastados com DAPI (azul).....	31
Figura 7 –	Análise histológica das linhagens de <i>hESCs</i> , BR-4 e BR-5, realizada pelo método de coloração HE (Hematoxilina-Eosina). Imagens de seções de teratomas derivados das linhagens de <i>hESCs</i> , BR-4 e BR-5, mostrando derivações dos três tecidos germinativos embrionário. As linhagens se diferenciaram em vários tecidos representativos da ectoderme, mesoderme e endoderme como (ad) adiposo; (c) cartilagem; (ge) epitélio glandular; (m) tecido muscular; (ne) epitélio neural; (nr) rosetas neural; (v) vasos.....	32

1 INTRODUÇÃO

Ao longo dos anos, diversos órgãos e tecidos do corpo humano perdem progressivamente sua capacidade de funcionamento, seja por causa de alguma doença ou pelo processo normal de envelhecimento. Há então uma grande demanda de reposição desses órgãos, que hoje em dia é atendida por programas de transplante de órgãos. No entanto, por várias razões, esses programas de transplante de órgãos atendem somente de 5-10% dos pacientes, seja por escassez de doadores ou pela atual incapacidade de transplante de certos órgãos ou tecidos (Vogel, 1999).

Em 1838 Matthias Schleiden e Theodor Schwann, estabeleceram o que ficou conhecido como teoria celular que todo o ser vivo é formado por células-tronco (*Stem Cells* - SCs). Todos os 200 tipos celulares distintos encontrados entre as cerca de 75 trilhões de células existentes em um homem adulto, derivam das células precursoras denominadas SCs. Estas são células mestras que têm a capacidade de se transformar em outros tipos de células, incluindo as do cérebro, coração, ossos, músculos e pele (Bolsover et al., 2004).

Nas últimas décadas, surgiu a era da medicina regenerativa, que tem como base principal os novos conhecimentos sobre as SCs e a capacidade do próprio corpo em regenerar órgãos e tecidos. O reconhecimento do impacto desta nova modalidade na medicina culminou com a concessão do Prêmio Nobel de Medicina e Fisiologia em 1990 a Joseph Murray e E. Donall Thomas, pioneiros em transplantes de órgãos e células (Mummery et al., 2002).

A partir de então a crescente expectativa do uso terapêutico destas células para cura de males que desafiam a Ciência tem ocupado bastante espaço na mídia em geral, especialmente a televisiva, gerando um intenso debate entre cientistas, políticos, religiosos e leigos em geral.

Em 1981, foram derivadas as primeiras linhagens celulares pluripotentes de células-tronco embrionárias de camundongo (*mouse Embryonic Stem Cells* - *mESCs*), a partir de blastocisto (*Blastocyst* - *BL*) de embriões de camundongos e demonstraram grande capacidade de diferenciação *in vitro* e *in vivo* (Evans & Kaufman, 1981; Martin, 1981).

James Thomson, em 1998, renovou as esperanças de médicos, pesquisadores, pacientes e famílias, ao derivar as primeiras linhagens celulares pluripotentes de células-tronco embrionárias humanas (*human Embryonic Stem Cells* - *hESCs*), a partir da massa celular interna (*Inner Cell Mass* - *ICM*) de *BL* de embriões humanos produzidos por fertilização *in vitro* (*in vitro Fertilization* - *IVF*), com a possibilidade de se encontrar uma cura para doenças degenerativas de origem genética ou não. Desde então, as técnicas para derivar e cultivar *hESCs* foram aprimoradas, dependendo de estímulos externos para gerar linhagens mais especializadas (Thomson et al., 1998).

As pesquisas com células-tronco embrionárias (*Embryonic Stem Cells* - *ESCs*) avançam na busca de tratamentos para muitas doenças que afetam milhões de pessoas, mas esbarra em várias questões éticas e religiosas (Yamada et al., 2002).

Inúmeras discussões têm ocorrido nos últimos anos sobre normas para a derivação, registros, caracterização, armazenamento, bancos, distribuição e engenharia dessas células tanto para pesquisa como para terapia celular (Staba et al., 2004).

Na última década, os métodos para cultura de células pluripotentes evoluíram rapidamente em uma tentativa de atender às necessidades prementes da medicina regenerativa e da descoberta de drogas. Apesar do progresso rápido no desenvolvimento de novos métodos de cultura de células pluripotentes, no entanto, ainda enfrentam muitos problemas que precisam ser resolvidos antes de sua aplicação futura. Esses desafios incluem: (i) a falta de protocolos padronizados para aplicações específicas, (ii) a ausência de eficácia para monitorar os ensaios de stress celular induzido pelo crescimento desordenado, condições apoptótica excessiva e sinais de diferenciação espontânea durante o processamento das células, (iii) a impureza ou heterogeneidade de células propagadas, (iv) a instabilidade genômica relacionada com anormalidades cromossômicas, e (v) o potencial de tumorigenicidade (Liang e Zhang, 2013).

Por existirem em quantidades reduzidas no corpo e pela dificuldade que apresentam para se dividir, a produção em laboratório desse tipo celular é limitada. Mesmo assim, cientistas desenvolvem a cada dia novos métodos para incrementar a cultura e manipulação destas células para utilização em tratamentos de lesões ou doenças.

Assim, em vista do art. 5º da Lei Nº 11.105, de 24 de março de 2005, que permite, para fins de pesquisa e terapia, a utilização de embriões humanos produzidos por *IVF* e não utilizados no respectivo procedimento, no Brasil, bem como a carência de pesquisadores nessa área, é fundamental que novas linhagens de células-tronco embrionárias (*Embryonic Stem Cells - ESCs*) sejam estabelecidas visando (i) autonomia para pesquisa básica e aplicações clínicas, devido a perda da estabilidade fenotípica e genética durante o cultivo e a manipulação das SCs e (ii) geração de linhagens adequadas para uso em seres humanos. Assim, desenvolve-se a pesquisa científica de inovação tecnológica “Derivação de novas linhagens brasileiras de células-tronco embrionárias humanas sob condições fisiológicas de oxigênio” para consolidar esta área de pesquisa em nosso país.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Células-tronco são células produzidas durante o desenvolvimento do organismo e com grande capacidade de (i) proliferação, (ii) auto-renovação, (iii) diferenciação e (iv) regeneração de tecidos. Estas células podem ser encontradas em (i) embriões recém-fecundados, (ii) células germinativas/órgãos de fetos abortados, (iii) células do sangue do cordão umbilical, (iv) tecidos adultos e (v) em células do tecido adulto a serem reprogramadas com comportamento de SCs e são classificadas em três grandes grupos como: (i) células-tronco adultas (*Adult Stem Cells - ASCs*), (ii) células-tronco embrionárias (*Embryonic Stem Cells - ESCs*) e (iii) células-tronco pluripotentes induzidas (*induced Pluripotent Stem Cells - iPSCs*) (Kehat et al., 2002).

De acordo com a plasticidade, ou seja, poder de diferenciação celular, as SCs são classificadas em (i) totipotentes - células progenitoras que possuem a capacidade de se diferenciar em diferentes tipos de células dentro de uma única linhagem, (ii) pluripotentes - células que possuem o potencial de se diferenciar em células dos três tipos do folheto embrionário (endoderme, mesoderme, ectoderme), (iii) multipotentes - células adultas que possuem o potencial de se diferenciar em um número limitado de outros tipos de células e (iv) unipotentes - células que possuem a capacidade de se diferenciar em somente um tipo de célula (Suda et al., 1987).

O processo de diferenciação celular compreende diversas etapas programadas geneticamente, dentre elas: (i) a proliferação de células progenitoras/SCs imortais e que respondem a estímulo mitogênico, (ii) a ativação e/ou repressão de inúmeros genes, (iii) a expressão de proteínas de determinadas linhagens que mediam funções biológicas específicas, (iv) a repressão progressiva da capacidade de responder a fatores mitogênicos e (v) a diferenciação terminal completa associada à perda irreversível do potencial proliferativo (Scott, 1997; Markert, 1968; Wille & Scott, 1986).

As ESCs são células originadas da *ICM* de um embrião no estágio de *BL*. Quando um espermatozoide se funde com o óvulo, forma-se uma única célula, denominada zigoto, que após a fecundação divide-se em duas células, as duas em quatro, as quatro em oito e assim por diante.

No estágio entre oito e dezesseis células, as células desse embrião se diferenciam em dois grupos: (i) um com células externas que vai dar origem à placenta e aos anexos embrionários, e (ii) outro com células da *ICM* que vai dar origem ao embrião propriamente dito. São essas células da *ICM* do embrião na fase *BL* que podem ser retiradas e colocadas em placas de cultura onde, em condições apropriadas, podem se manter indiferenciadas, se multiplicarem indefinidamente, mantendo seu potencial de contribuir para todos os tipos celulares adultos (Evans & Kaufman, 1981; Martin, 1981; Bradley et al., 1984).

O desenvolvimento das ESCs oferece um vasto número de aplicações potenciais, incluindo prevenção, diagnóstico e tratamento de doenças humanas. Contudo, alegações provocativas e

conflitantes deixam o público, e a maioria dos cientistas, confusos quanto ao uso e à viabilidade de tratamentos com as ESCs.

A utilização das ESCs pode alcançar alguns objetivos como (i) compreensão dos mecanismos de diferenciação, desenvolvimento, identificação, isolamento e purificação dos diferentes tipos celulares, (ii) controle da diferenciação em outros tipos celulares, sendo o alvo necessário para o tratamento de doenças, (iii) conhecimento para desenvolver transplantes compatíveis, (iv) uso nos transplantes com demonstração do controle apropriado do crescimento, bem como a obtenção do desenvolvimento e função de célula normal e (v) confirmação dos resultados bem sucedidos dos animais em seres humanos (Choi et al., 2002; He et al., 2003; Rounson, 2005).

As ESCs podem ser cultivadas por um longo período devido à sua ilimitada capacidade de multiplicação e são capazes de se diferenciar *in vivo* e *in vitro*. Os testes *in vivo* das células não podem ser conduzidos em seres humanos por uma série de restrições quanto ao seu uso e a produção de patentes de produtos derivados das mesmas (Thomson et al., 1998; Cowan et al., 2004). Além disso, as linhagens de ESCs disponíveis foram estabelecidas e cultivadas na presença de produtos animais, o que impossibilita seu uso terapêutico em seres humanos (Martin et al., 2005; Reubinooff et al., 2000).

Alguns estudos demonstraram que, em uma mesma espécie, diferentes linhagens de ESCs apresentavam alto grau de heterogeneidade quanto a sua capacidade de diferenciação, levando a diferentes respostas quando submetidas aos mesmos tratamentos (Hoffman & Carpenter, 2005; Allegrucci & Young, 2007).

As características morfológicas das ESCs, indiferenciadas, crescem em colônias herméticamente uniformes com bordas definidas na periferia das colônias. Núcleo grande em comparação com o citoplasma e nucléolo proeminente (Trosko et al., 1990). Outras características destas células são: (i) atividade de fosfatase alcalina, (ii) presença do fator de transcrição, (iii) alta atividade da telomerase e (iv) variedade de marcadores celulares reconhecidos por anticorpos monoclonais nos antígenos embrionários (Donavan & Gearhart, 2001).

Para fomentar a investigação com ESCs, busca-se obter e caracterizar linhagens uniformes, de forma segura e mais completa, que atendam a critérios estritos para a facilidade de manipulação, incluindo fatores importantes, como: (i) pluripotência *in vitro* e *in vivo*, (ii) fatores de crescimento, (iii) citocinas e homônios, (iv) nível de oxigênio, (v) análise de cariótipo, (vi) imunohistoquímica, (vii) formação de corpos embrionários (*Embryoid Bodies* - EBs), (viii) formação de teratoma, (ix) procedimentos de criopreservação e (x) descongelamentos simplificados (Prokhorova et al., 2009; Buzzard et al., 2004; Choi et al., 2002; Rounson, 2005; Plaia et al., 2006).

Outro fator muito importante para o controle *in vitro* das ESCs são as matrizes celulares. O cultivo de ESCs requer adesão a uma matriz celular ou extracelular para sobrevivência e crescimento (Nieto et al., 2007). Estas células são cultivadas com fibroblastos mitoticamente inativos

(metabolicamente ativos), por meio de Mitomicina C ou por irradiação gama, que inibe a replicação do DNA (Roy et al., 2001), ou sem fibroblastos inativos e com adição de fator de inibição de leucemia (*Leukemia Inhibitory Factor* - *LIF*), que ativa o fator STAT3 e permite a manutenção do estado indiferenciado das *ESCs* (Watt & Hogan, 2000; Smith, 2001).

O nível de oxigênio é um composto muito adequado ao papel que exerce no metabolismo de produção energética. Células, tecidos e organismos sentem quando o oxigênio é limitante e respondem de forma adequada, sendo que a adaptação às alterações na concentração de oxigênio no ambiente depende de mudanças nos níveis de expressão de uma série de proteínas (Poyton, 1999).

Em mamíferos, a resposta à limitação de oxigênio vai desde alterações imediatas no metabolismo energético até a ativação de vias de controle da expressão gênica. No início da exposição a uma condição de baixa tensão de oxigênio, ocorre uma rápida mudança no metabolismo, de aeróbico para anaeróbico, e supressão de reações que consomem energia (Hochachka, et al., 1996).

Esta condição de oxigênio reduz a diferenciação espontânea das *ESCs* por meio de perda da forforilação oxidativa e da produção de *ATP* pelas mitocôndrias, ou seja, inicialmente impede a célula de usar seu principal meio de obtenção de energia (Millman et al., 2009; Ezashi & Roberts, 2005).

A mitocôndria participa da manutenção de funções celulares vitais, tais como respiração e síntese de *ATP*, modulação do estado redox da célula, regulação osmótica, controle do pH, homeostase do cálcio no citosol e sinalização intracelular (Kaplowitz, 2000).

As *ESCs* quando cultivadas em baixa concentração de oxigênio, são mantidas em estado fenotípico indiferenciado por múltiplas divisões celulares, apresentam evidências quanto (i) o aumento da proliferação celular (Harvey et al., 2004; Morrison et al., 2000; Lennon et al., 2001), (ii) a redução da diferenciação espontânea (Ezashi et al., 2005; Ludwig et al., 2006) e (iii) a redução de aberrações cromossômicas (Forsyth et al., 2006).

Alguns pesquisadores demonstraram que o nível da pluripotência das *ESCs* é identificado *in vitro* com a formação de *EBs*, ou seja, quando ocorre a remoção dos fibroblastos inativos e *LIF* e realiza-se o cultivo celular em suspensão, as *ESCs* são induzidas a entrar em um programa de diferenciação *in vitro* de forma sincronizada. Nestas condições, estas células se diferenciam, espontaneamente, e formam agregados de células, denominados *EBs* (Ling & Neben, 1997), em linhagens celulares, com origem nos três folhetos embrionários, e expressaram os genes OCT 3/4, SSEA-4, NANOG, SOX-17, MyoD, NESTIN por meio da imunohistoquímica (Brook & Gardner, 1997).

A pluripotência *in vivo* com *ESCs* é realizada somente através da injeção destas células em camundongos imunodeficientes para ocorrer a diferenciação nos três folhetos embrionários (Wobus & Boheler, 2005).

As ESCs, quando injetadas em camundongos *NOD/SCID*, respondem aos diferentes estímulos *in vivo* e se diferenciam desorganizadamente em qualquer tipo de tecido/células do indivíduo adulto. Estes tecidos consistem em tecidos dos três folhetos embrionários e extra-embrionários, quando tratados com determinados fatores de crescimento, citocinas e hormônios, e forma teratomas e teratocarcinomas (Wille & Scott, 1986; Trosko et al., 1990; Watt & Hogan, 2000; Reubinooff et al., 2000; Przyborski, 2005).

Os teratomas são tumores, caracterizados pelo aumento anormal de uma parte ou da totalidade de um tecido, originados de células embrionárias, podem ser benignos ou malignos (Pierce et al., 1960).

A diferença entre o tumor benigno e o tumor maligno, é a ausência de diferenciação celular. Os tumores benignos (teratoma maturo/dermóide - cisto) tendem a apresentar crescimento lento, ordenado, não-infiltrativo, sem metástase e expansivo, e permitem a formação de uma pseudocápsula fibrosa. Os tumores malignos (teratoma imaturo/sólido - teratocarcinoma) tendem a apresentar crescimento rápido, desordenado, infiltrativo, com metástase e não permitem a formação da pseudocápsula fibrosa (Andrews, 2005; Kleinsmith & Pierce, 1964).

A formação e a composição dos teratomas é um obstáculo crítico para um transplante seguro de ESCs para tratamentos clínicos em seres humanos no futuro, e isso parece ser influenciado por diversos fatores, incluindo: (i) o local do implante, o que afeta o crescimento e a composição do tumor, (ii) o número de células transplantadas e (iii) a fase de desenvolvimento do hospedeiro (Cooke et al., 2006; Muotri et al., 2005).

Vários métodos foram descritos na literatura em relação ao local onde as ESCs são implantadas, como: (i) sob a capsula renal (Heins et al., 2004), (ii) por via intramuscular (Plaia et al., 2006), (iii) por via intratesticular (Stojkovic et al., 2005) e (iv) por via subcutânea (Cooke et al., 2006).

Todos estes estudos, não esclarecem se existe região específica que diferencie a eficiência de formação de teratoma ou na composição do tecido. É plausível que uma região específica de implantação possa afetar o grau e o tipo de diferenciação no teratoma, devido à influência do microambiente de diferenciação das ESCs (Kleinsmith & Pierce, 1964).

No entanto, existem poucos estudos onde essa comparação foi realizada. Alguns estudos mostraram que a concentração do número de células transplantadas é outro fator que influencia na formação do teratoma. Em alguns casos, um número pequeno de ESCs transplantadas, dependendo do local do implante, pode resultar na formação de teratoma (Prokhorova et al., 2009; Blum & Benvenisty, 2008).

Porém, para utilização das ESCs em terapia celular, a diferenciação desorganizada em vários tecidos ou a formação de teratomas não é conveniente. Assim, antes de transplanta-las, é fundamental diferenciar as ESCs, *in vitro*, no tipo celular desejado, de acordo com a doença a ser tratada (Scott, 1997; Markert, 1968; Wille & Scott, 1986).

Nos últimos anos, a diferenciação *in vitro* das ESCs estão direcionadas em tipos específicos de células, como: (i) nervosas, (ii) produtoras de insulina, (iii) do músculo cardíaco, (iv) da medula óssea e (v) outras. Quando estas células são transplantadas em animais doentes, elas exercem um efeito terapêutico, em várias doenças, incluindo: (i) doença de Parkinson, (ii) paralisia por trauma de medula espinhal, (iii) diabetes e (iv) leucemias (Guasch & Fuchs, 2005).

Em 2010, o primeiro teste clínico em seres humanos com células derivadas das ESCs foi iniciado nos EUA, em indivíduos com lesão de medula espinhal. Os principais objetivos deste experimento foram: (i) avaliar a segurança das células injetadas, ou seja, se elas não formam tumores como as ESCs não diferenciadas e (ii) avaliar a resposta imunológica do organismo contras as células derivadas das ESCs. Uma vez verificados estes pontos, foi também estudada a eficácia do tratamento (Geron, 2010).

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

- ✓ Estabelecer linhagens brasileiras de *hESCs*, em condições ambientais ideais com 5% de O₂, derivadas de embriões humanos gerados por *IVF*.

3.2 Específicos

- ✓ Descongelar e cultivar embriões humanos de acordo com a Lei de Biossegurança (nº 11.105, de 24 de março de 2005) até o estágio de *BL*.
- ✓ Isolar a *ICM* de embriões humanos cultivados até o estágio de *BL*.
- ✓ Estabelecer, cultivar e expandir as linhagens de *hESCs*.
- ✓ Caracterizar as linhagens de *hESCs* com:
 - Análise morfológica,
 - Teste de criopreservação,
 - Teste de imunohistoquímica para pluripotência,
 - Análise de cariótipo,
 - Teste de formação de *EBs*,
 - Teste de diferenciação espontânea,
 - Teste de imunohistoquímica para diferenciação espontânea,
 - Teste de formação de teratoma (*in vivo*).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Local

Este estudo foi realizado, na FERTIVITRO - Centro de Reprodução Humana e no Laboratório Nacional de Células-Tronco Embrionárias (LaNCE) do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (IB-USP), com a colaboração e apoio técnico-científico dos alunos e funcionários do grupo de pesquisa da Profa. Dra. Lygia da Veiga Pereira.

4.2 Considerações Éticas

Todos os procedimentos seguiram as normas da Lei de Biossegurança (nº 11.105, de 24 de março de 2005) e foram aprovados pelo Comitê de Ética do IB-USP (Protocolo nº 044/2006) (Anexo 1).

As doações dos embriões foram realizadas seguidas de termos de doação, datado e assinado, entre a FERTIVITRO - Centro de Reprodução Humana e o LaNCE do IB-USP, confidencialmente.

Os experimentos com animais seguiram os protocolos, em estrita conformidade, com as recomendações do Guia para o cuidado e uso de animais de laboratório do *National Institute of Health* - NIH (<http://grants.nih.gov/grants/olaw/Guide-for-the-care-and-use-of-laboratory-animals.pdf>) e foram aprovados pelo Comitê de Ética de Experimentação Animal do IB-USP (protocolo nº 123/2011).

4.3 Amostra

Este estudo foi realizado com dezesseis embriões humanos, descongelados e cultivados, até o estágio de BL, pela FERTIVITRO - Centro de Reprodução Humana e doados para o LaNCE do IB-USP.

4.4 Procedimentos

As placas utilizadas para o cultivo celular foram placas de 6 poços (Corning Costar), previamente tratadas por 45 minutos (RT), com *BD Matrigel hESC-qualified Matrix*® (BD Biosciences) suplementadas com *DMEM F-12* (Invitrogen).

O cultivo celular foi realizado com meio de cultivo *mTeSR[®]1 Basal Medium* (StemCell Technologies) suplementado com *mTeSR[®]1 5x Supplement* (StemCell Technologies) e incubado em temperatura a 37°C com 5% CO₂ e 5% O₂.

A manutenção e expansão foram realizadas a cada 4-6 dias com a troca do meio de cultivo celular e por passagens mecânicas realizadas com seringa de insulina (27,5G^{1/2}), com cortes uniformes.

4.4.1 Isolamento da ICM

Os embriões no estágio de *BL* foram submetidos ao isolamento da *ICM*, mecanicamente, e colocados em placas de cultivo celular de 4 poços (Nunc), previamente tratadas com 0,1% *Gelatin solution* (Sigma) por 45 minutos, e plaqueadas com *MEFs* (Chemicon International) por 48 horas. Foram cultivados com *KO-DMEM* (Invitrogen), 20% *KO-SR* (Hyclone) *Medium*, 50U/ml penicilina / streptomycin, 1x *glutaMAX* 200mM (Invitrogen), 1x *MEM* 100x *NEAA* (Cambrex), 50µM *BME* 50mM (Invitrogen), 10ng/ml *bFGF* (Invitrogen) *human recombinant* 10µg e incubados. Após 48 horas de incubação, foi realizada a troca parcial (50%) do meio de cultivo celular das placas e, nos dias seguintes, a troca foi realizada diariamente. Entre os dias 4-5, foram adicionados *MEFs* (Chemicon International) para manter as células em cultivo até realizar a primeira passagem mecânica celular.

4.4.2 Teste de criopreservação

O teste de congelamento foi realizado na passagem (*P10*). As colônias foram cortadas mecanicamente, transferidas para tubo de 15ml (Falcon) e centrifugadas com uma rotação de 1000rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi aspirado e o pellet ressuscitado, “gota a gota”, no gelo, com 10% *mTeSR[®]1 Basal Medium* (StemCell Technologies) suplementado com *mTeSR[®]1 5x Supplement* (StemCell Technologies), 10% *DMSO* (Sigma), 80% *KO-SR* (Hyclone) *Medium*. As colônias foram colocadas em *cryo-tubes* (Corning Costar) com 400-500µl do meio de congelamento descrito acima, e congeladas em temperatura a -80°C por 48 horas em *Nalgene[®] Mr.Frosty* (Nalge Nunc International) com isopropanol e transferidas para tanques de nitrogênio líquido em temperatura a -196°C.

O teste de descongelamento foi realizado na passagem (*P10*). As colônias foram descongeladas, rapidamente, em banho-maria, em temperatura a 37°C, ressuscitadas com *DMEM F-12* (Invitrogen) e centrifugadas com uma rotação de 1000rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi aspirado e o pellet ressuscitado e plaqueado com meio de cultivo, e incubado por 48 horas.

4.4.3 Análise de cariótipo

A análise de cariótipo foi realizada na passagem (P11). O meio de cultivo celular da placa foi aspirado e adicionado 30µl de colchicina (Sigma) por 1 hora e 30 minutos (RT), 15µl de brometo de etideo por 1 hora e 30 minutos (RT), 1x DPBS pH 7,4 (Invitrogen) 3 vezes por 5 minutos (RT), 2ml de *Trypsina-EDTA* 0.25% (StemCell Technologies) por 3-5 minutos (incubadas). As células tripsinizadas foram aspiradas e transferidas para um tubo de 15ml (Falcon) e centrifugadas com uma rotação de 1000rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi aspirado e o pellet ressuscitado com solução hipotônica de 0.075M KCL (Sigma) por 15 minutos (incubadas) e centrifugado com uma rotação de 1000rpm por 5 minutos. A fixação foi realizada com solução de metanol (3:1) com ácido acético (Sigma) e foram colocadas nas lâminas de leitura para proceder com a análise das metáfases, após duas semanas de envelhecimento, com o programa *Standard G-banding* (Gosden et al., 1992). As análises das metáfases foram realizadas usando um *Axiophot 2* (Carl Zeiss) e as imagens foram capturadas pela câmera CCD (Carl Zeiss) e *ISIS software* (MetaSystem).

4.4.4 Teste de imunohistoquímica

A imunohistoquímica foi realizada na passagem (P12). As colônias, indiferenciadas e diferenciadas, foram cultivadas em lâmina de cultivo celular, de 4 poços (BD Biosciences), e marcadas de acordo com os protocolos dos fabricantes de cada anticorpo, incluindo a diluição. Foram fixadas com solução 4% PFA (Sigma) por 10 minutos, permeabilizadas em 0,1% Triton x-100 solution (Sigma) por 15 minutos (RT) e bloqueadas em 1% FBS (Hyclone) por 1 hora (RT), 0,5% Triton x-100 solution (Sigma) por 15 minutos (RT). Foram marcadas com os anticorpos primários, para células indiferenciadas: OCT 3 / 4 (1:100; Santa Cruz Biotechnology), SSEA-4 (1:50; Chemicon) e NANOG (1:25; R&D Systems) e para células diferenciadas: SOX17 (1:250; R&D Sytems) (endoderme), MyoD (1:50; BD Pharmingen) (mesoderme) e NESTIN (1:100; Chemicon) (ectoderme) e com o anticorpo secundário Alexa Fluor 488 (1:1000; Molecular Probes). Os núcleos das células foram contrastados com DAPI e as lâminas foram montadas em meio de montagem Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, CA). Todas as colônias presentes nas lâminas foram analisadas para confirmar o sinal positivo de cada um dos anticorpos. As análises foram realizadas usando um *Axiophot 2* (Carl Zeiss) e as imagens foram capturadas pela câmera CCD (Carl Zeiss) e *ISIS software* (MetaSystem).

4.4.5 Teste de formação de corpo embrióide

A formação de corpo embrióide foi realizada na passagem (P12). As colônias foram cortadas mecanicamente, plaqueadas com agarose e cultivadas em 80% DMEM High-glucose (Invitrogen), 20% FBS - Defined (Hyclone), 1mM Sodium Pyruvate Stock (Sigma), 0.1mM MEM NEAA (Invitrogen), 0.055mM BME (Sigma), 2mM L-Glutamine (Invitrogen), e incubadas por 10-14 dias até a formação

dos *EBs*. Para o crescimento das colônias de *hESC* diferenciadas nos três folhetos embrionários, os *EBs* foram cultivados com meio de cultivo celular e incubados.

4.4.6 Teste de formação de teratoma (*in vivo*)

A formação de teratoma foi realizada na passagem (*P12*). Para a formação de teratoma, foram utilizados três animais, camundongos imunodeficientes (*C57/B16 NOD / SCID mice*), com 4-6 semanas de vida, para cada linhagem. Uma semana antes de iniciar os experimentos, todos os animais estavam em ambiente estéril e climatizado.

As colônias diferenciadas foram cortadas mecanicamente, em pedaços com aproximadamente 1×10^5 (100 pedaços) de células por amostra, centrifugadas com uma rotação de 1000rpm por 5 minutos, ressuspensas com 140µl *DMEM F-12* (Invitrogen) e 60µl *BD Matrigel hESC-qualified Matrix* (BD Biosciences) e colocadas no gelo até o momento da injeção nos animais. Cada amostra de *hESCs* foi correspondente a um animal.

No biotério, todos os animais foram manipulados dentro da cabine de fluxo laminar para evitar qualquer tipo de contaminação. Antes de iniciar as injeções com *hESCs*, os animais foram anestesiados, por 30 minutos, com injeção intraperitoneal com 6mg/kg ketamina e 0,6mg/kg xilazina para cada animal. Cada amostra de *hESCs* foi ressuspensa, cuidadosamente, com uma pipeta de 200µl. A amostra foi aspirada com uma seringa com agulha, e realizada a injeção das *hESCs* na região subcutânea dos animais. Os animais ficaram em observação até 12 semanas, para reação adversa ou o não desenvolvimento do teratoma. Semanalmente, com acompanhamento de raio-X e ultrassom, os animais foram examinados para avaliar a possível formação do teratoma, as fases de início e o grau do tumor.

Com a formação do teratoma, foi realizada a eutanásia nos animais, em ambiente estéril, dentro da cabine de fluxo laminar, de acordo com protocolo padrão. O teratoma foi removido cirurgicamente, fixado em 4% *PFA* (Sigma) e embebido em parafina para realizar a análise histológica.

O bloco de parafina com a amostra foi cortado no micrótomo, com 5µm de espessura, fixado em lâmina e corado pelo método de coloração HE (hematoxilina-eosina). As lâminas foram analisadas (Salaman & Gwynn, 1951) usando um *Axiovert* (Carl Zeiss) e as imagens foram capturadas pela câmera *CCD* (Carl Zeiss) e *ISIS software* (MetaSystem).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A primeira linhagem brasileira gerada de *hESCs* foi nomeada BR-1 (46, XY) (Fraga et al., 2008).

Em 2010, foi gerada a segunda linhagem brasileira de *hESCs*, nomeada BR-2 (69, XXX), em condições ambientais com 20% de O₂, derivada de um embrião com 3 pró-núcleos (3PN) (embrião inviável). Devido a esta anomalia no embrião, esta linhagem não pode ser usada para uso em terapia celular, tornou-se um interessante modelo *in vitro* de poliploidia humana.

Segundo Martin et al (2005), pode-se obter linhagens de *hESCs* (Thomson et al., 1998; Cowan et al., 2004) de grupos que as desenvolveram, porém sem garantia de qualidade e com uma série de restrições quanto ao seu uso e a produção de patentes de produtos derivados das mesmas.

Kehat et al (2002), esclareceu que as linhagens de *hESCs*, dependendo de estímulos externos, dão origem a diferentes linhagens celulares mais especializadas.

Prokhorova et al (2009), Buzzard et al (2004), Choi et al (2002), Rounson (2005) e Plaia et al (2006) afirmaram que os componentes essenciais do processo de derivação de *hESCs* são: (i) embriões, (ii) métodos de manipulação dos embriões, (iii) matrizes celulares, (iv) meios de cultivo celular, (v) condições ambientais ideais e (vi) condições de cultura em geral.

Neste estudo, seguiu-se todos os cuidados necessários para derivar estas novas linhagens de *hESCs*. Desde a fase de descolgelamento dos embriões até a fase de caracterização final das *hESCs*, todo o estudo foi realizado em condições ambientais ideais com 5% de O₂.

De acordo com Ezashi et al (2005), Ludwig et al (2006) e Forsyth et al (2006), a baixa concentração de oxigênio em derivações de *hESCs* contribuiu com a estabilidade da pluripotência e de aberrações cromossômicas.

Os dezesseis embriões que foram doados para a realização deste estudo, tiveram as *ICMs* isoladas e plaqueadas. Após dez dias em cultivo, duas das *ICMs* isoladas aderiram na placa de cultivo e sobreviveram para dar continuidade na derivação das novas linhagens de *hESCs*.

Após dois meses que as *ICMs* estavam aderidas em cultivo, estabeleceu as duas linhagens brasileiras de *hESCs*, nomeadas BR-4 (Figura 1A) e BR-5 (Figura 1B) e as mesmas foram destinadas ao processo de caracterização.

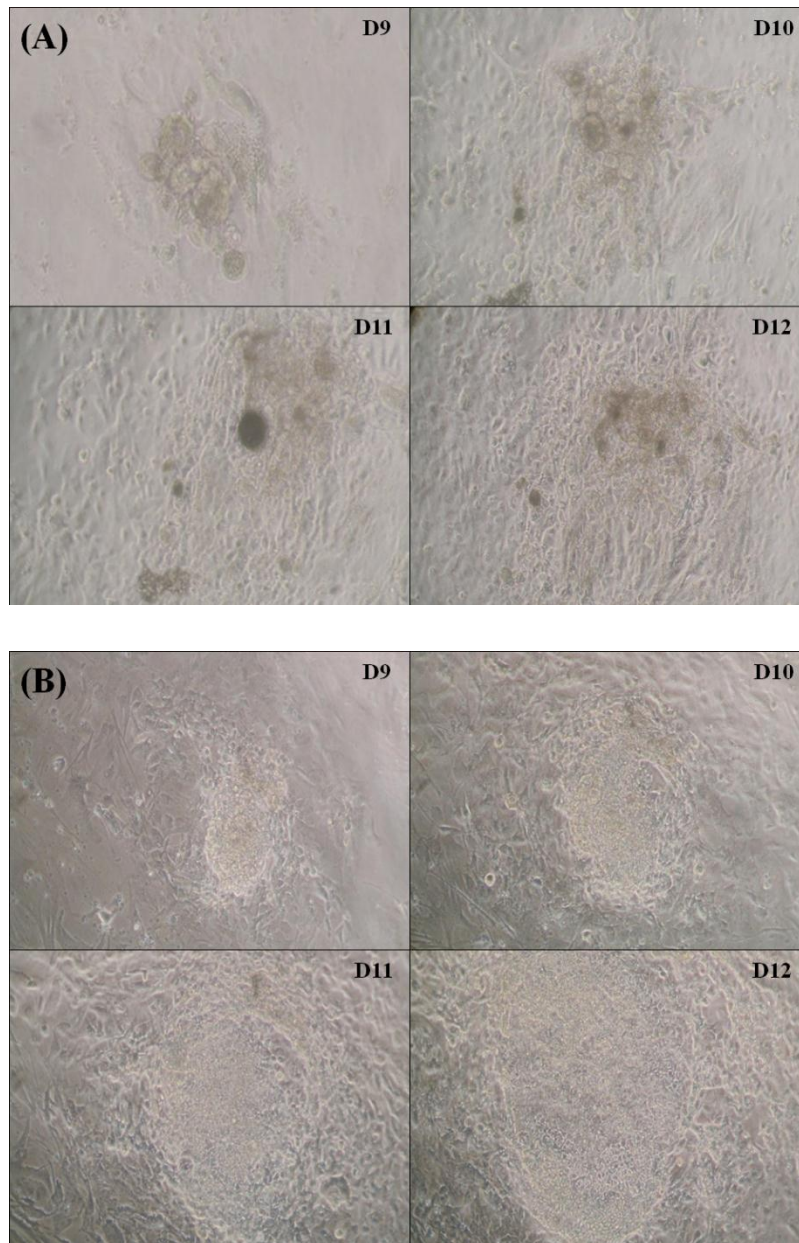


Figura 1 – Etapas do processo de isolamento e derivação das linhagens de *hESCs*. **(A)** BR-4 e **(B)** BR-5. *ICMs* aderidos em *MEFs* depois de 9 dias (D9), 10 dias (D10), 11 dias (D11) e 12 dias (D12) em cultivo celular. Escala: 100µm.

O processo de caracterização foi seguido com: (i) análise morfológica, (ii) teste de criopreservação, (iii) teste de imunohistoquímica para pluripotência *in vitro*, (iv) análise de cariótipo, (v) teste de formação de *EBs*, (vi) teste de diferenciação espontânea *in vitro*, (vii) teste de imunohistoquímica para diferenciação *in vitro* e (viii) teste de formação de teratoma.

As linhagens de *hESCs* BR-4 e BR-5, possuem um diferencial em comparação com as linhagens, do mesmo grupo, de *hESCs* BR-1 e BR-2. A BR-4 e BR-5 foram derivadas em condições ambientais ideais com 5% de O₂, e foi demonstrado que as linhagens geradas sob estas condições ambientais diminuíram a quantidade de células com diferenciação espontânea e controlaram a pluripotência e a proliferação das células.

Zhang et al (2001), Reubinoff et al (2000) e Schuldiner et al (2000) derivaram linhagens de *hESCs* com aprimoramento nas técnicas de cultivo, e estas são utilizadas em pesquisas sobre biologia do desenvolvimento humano e terapia celular.

Watt & Hogan (2000) e Smith (2001) afirmaram que a ação do *LIF* mantém o estado indiferenciado das *hESCs*, elas são cultivadas por um longo período devido à sua ilimitada capacidade de multiplicação. Assim, melhorias são alcançadas na manutenção dessas células no estágio indiferenciado e no controle de sua diferenciação em direção a vários tipos celulares.

O cultivo celular das linhagens de *hESCs*, BR-4 e BR-5, foi realizado com adição de *LIF*, em todas as etapas dos processos da derivação (expansão, estabelecimento e caracterização).

Segundo Trosko et al (1990), as *hESCs* se proliferam com vias de sinalização balanceadas. As características das colônias de células indiferenciadas crescem uniformes com bordas definidas, núcleo grande e nucléolo proeminente.

Para se ter essa uniformidade das colônias de *hESCs*, o uso de técnicas e métodos seguros e bem delineados, são importantes para atender critérios para facilitar a manipulação.

Devido as condições de oxigênio que estas células foram cultivadas, as colônias das linhagens de *hESCs*, BR-4 e BR-5, exibiram morfologia característica de *hESCs*, com colônias mais compactas e com bordas bem definidas, e células com núcleos e nucléolos proeminentes e uniformes (Figura 2).

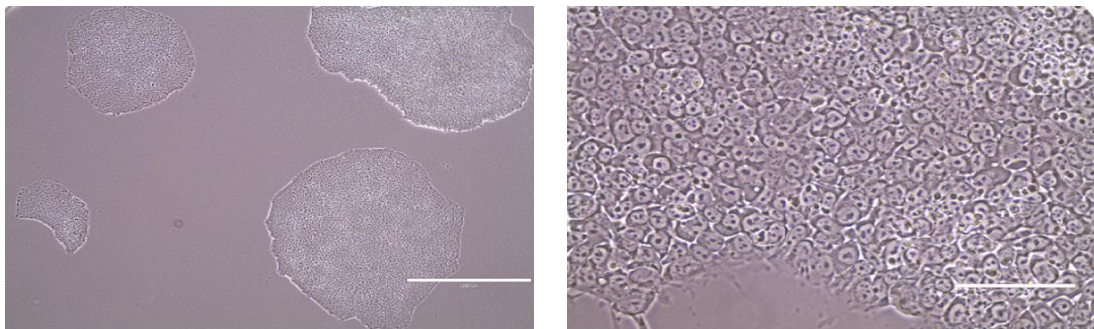


Figura 2 – Análise morfológica característica de estrutura compacta de colônia de *hESCs*. Colônia herméticamente uniforme e com bordas definidas na periferia. Núcleo grande em comparação com citoplasma e nucléolo proeminente. Escala: 100µm.

Um dos principais testes de caracterização é o teste de criopreservação. As linhagens de *hESCs*, BR-4 e BR-5, foram congeladas e descongeladas diversas vezes e apresentaram um diferença significativa em relação ao tempo de descongelamento da BR-4, que foi mais sensível do que a BR-5.

Segundo Freshney (1994), todo teste de criopreservação deve ser realizado rapidamente, e cuidadosamente aplicado para obter o maior número de células possíveis e não causar nenhum tipo

de stress celular na amostra. Os protocolos devem ser seguidos rigorosamente como descritos para nenhuma intercorrência.

De acordo com Brook & Gardner (1997), o teste de imunohistoquímica para pluripotência *in vitro* é um método de caracterização importante destas células para identificar o controle da diferenciação da mesmas.

Nas duas linhagens foi realizado o teste de pluripotência, em lâminas de imunohistoquímica, e tiveram expressão positiva com imunofluorescência para os genes OCT 3/4, SSEA-4 e NANOG (Figura 3).

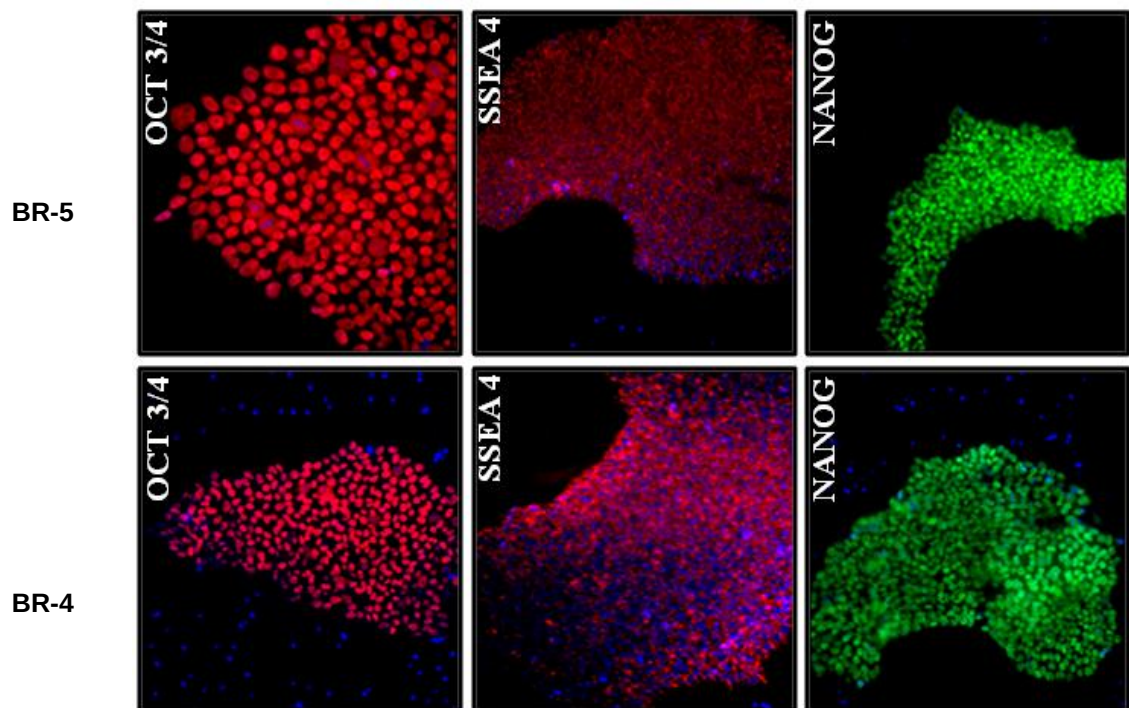


Figura 3 – Expressão de marcadores de pluripotência das linhagens de *hESCs*, BR-4 e BR-5, por imunohistoquímica. As colônias, BR-4 e BR-5, indiferenciadas, foram positivas para os marcadores OCT 3/4 (vermelho), SSEA-4 (vermelho) and NANOG (verde). Núcleos foram contrastados com DAPI (azul). Escala: 100µm.

A análise de cariótipo das linhagens de *hESCs*, BR-4 e BR-5, foi realizada a fim de verificar se alguma destas linhagens apresentavam ou não aneuploidias e para confirmar o sexo de cada linhagem. As linhagens de *hESCs*, BR-4 e BR-5, revelaram a presença dos conjuntos de cromossomos com euploidia normal em ambas as linhagens de *hESCs*. A linhagem BR-4 mostrou cariótipo masculino normal (46, XY) e a linhagem BR-5 mostrou cariótipo feminino normal (46, XX) (Figura 4).

Segundo Scott (1997), Markert (1968) e Wille & Scott (1986), algumas etapas programadas geneticamente são compreendidas pelo processo de diferenciação celular espontânea como característica essencial para as *hESCs* serem utilizadas com segurança.

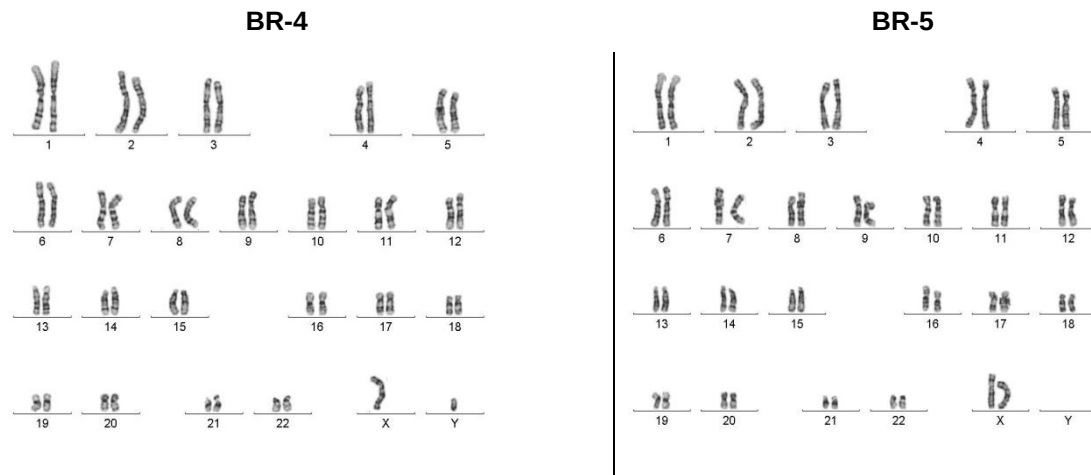


Figura 4 – Análise de cariótipo das linhagens de *hESCs*, BR-4 e BR-5, com *G-banding* das células na passagem 10. A BR-4 mostrou cariótipo masculino normal (46, XY) e a BR-5 mostrou cariótipo feminino normal (46, XX).

A diferenciação espontânea ocorre na ausência de *LIF*, segundo Ling & Nebe (1997), e demonstram que esta análise é uma identificação da pluripotência das linhagens de *hESCs*. Estas linhagens são induzidas a entrar em um programa de diferenciação *in vitro* de forma sincronizada originando os *EBs*.

As linhagens de *hESCs*, BR-4 e BR-5, foram induzidas a formar os *EBs* (Figura 5A). Foram cultivadas em suspensão e com ausência de *LIF* e as duas linhagens de *hESCs* foram suficientes para formar *EBs* adequados para realizar a etapa de crescimento espontâneo.

Em placas de cultivo aderentes, as linhagens de *hESCs*, BR-4 e BR-5, foram submetidas a formação espontânea de colônias indiferenciadas para formar células dos três folhetos embrionários (Figura 5B).

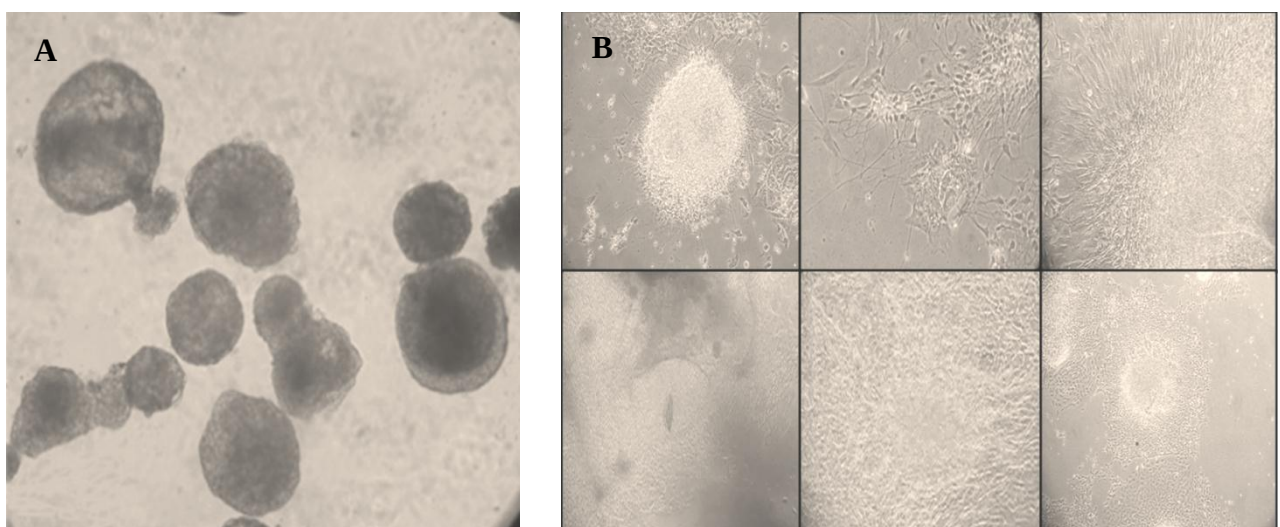


Figura 5 – Etapas do processo de diferenciação das linhagens de *hESCs*. **(A)** Formação de corpos embrióides das linhagens de *hESCs*, BR-4 e BR-5, em suspensão, em placas de cultivo celular não aderente. **(B)** Diferenciação espontânea das linhagens de *hESCs*, BR-4 e BR-5, aderidas em placa de cultivo celular aderente. Escala: 100µm.

Ainda seguindo os conceitos de Brook & Gardner (1997), o teste de imunohistoquímica para diferenciação *in vitro* é outro método de caracterização importante destas células para identificar o controle da diferenciação da mesmas.

O teste de diferenciação *in vitro* das linhagens de *hESCs*, BR-4 e BR-5, foi realizado em lâminas de imunohistoquímica, e tiveram expressão positiva com imunofluorescência para os genes Sox17, MyoD e NESTIN (Figura 6).

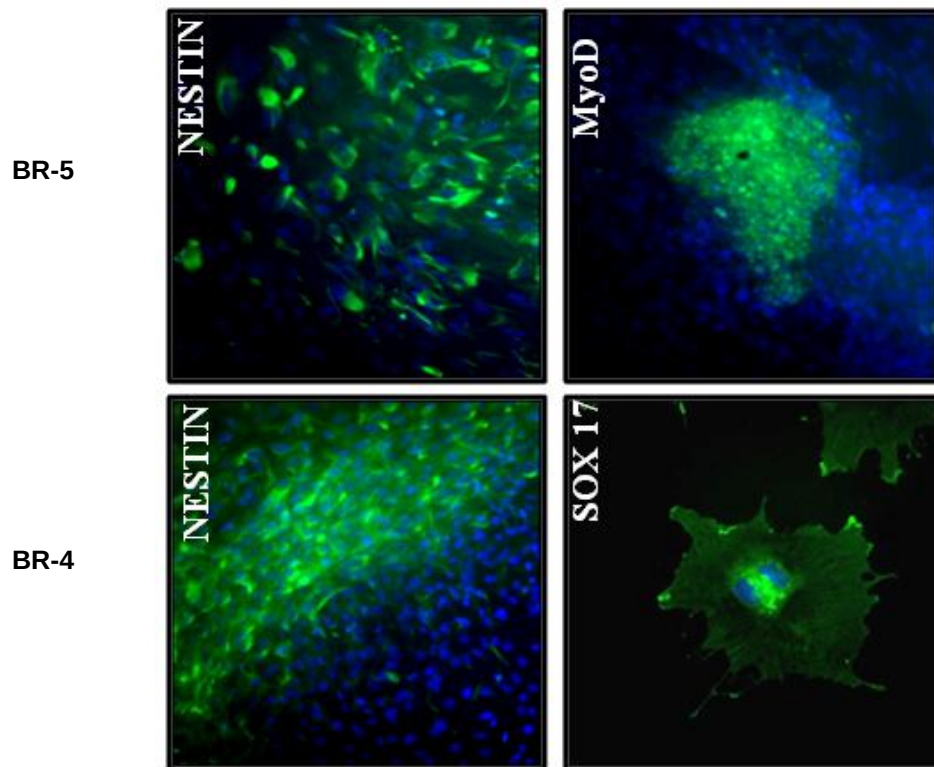


Figura 6 – Expressão de marcadores de pluripotência das linhagens de *hESCs*, BR-4 e BR-5, por imunohistoquímica. As colônias, BR-4 e BR-5, diferenciadas, foram positivas para os marcadores SOX17 (verde), MyoD (verde) e NESTIN (verde). Núcleos foram contrastados com DAPI (azul). Escala: 100µm.

Estes resultados demonstraram, *in vitro*, de que estas linhagens de *hESCs*, BR-4 e BR-5, foram capazes de se diferenciar em células representativa dos três folhetos embrionários.

De acordo com Wobus & Boheler (2005), o único teste de identificação da pluripotência *in vivo* com *hESCs* é a formação de teratoma, realizado com a injeção destas células em camundongos imunodeficientes para ocorrer *in vivo* a diferenciação nos três folhetos embrionários.

O teste de formação de teratoma *in vivo* foi realizado com as linhagens de *hESCs*, BR-4 e BR-5. Após 10 semanas da injeção, foram observados a formação de tumores e para conclusão final destes resultados, foram realizadas as análises histológicas dos tumores, pelo método de coloração HE (Hematoxilina-Eosina). Vários tipos de células/tecidos foram identificados nas duas linhagens de

hESCs e foram capazes de se diferenciar em vários tecidos representante dos três folhetos embrionários (Figura 7).

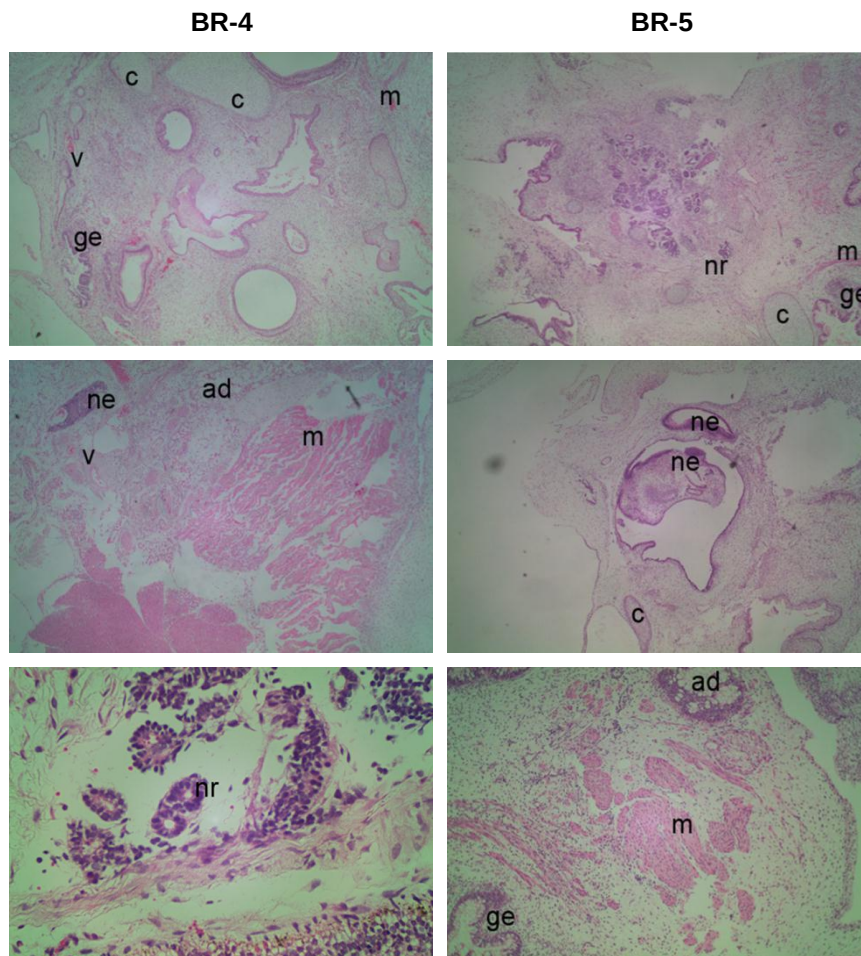


Figura 7 – Análise histológica das linhagens de *hESCs*, BR-4 e BR-5, realizada pelo método de coloração HE (Hematoxilina-Eosina). Imagens de seções de teratomas derivados das linhagens de *hESCs*, BR-4 e BR-5, mostrando derivações dos três tecidos germinativos embrionário. As linhagens se diferenciaram em vários tecidos representativos da ectoderme, mesoderme e endoderme como (ad) adiposo; (c) cartilagem; (ge) epitélio glandular; (m) tecido muscular; (ne) epitélio neural; (nr) rosetas neural; (v) vasos. Escala: 100µm.

6 CONCLUSÕES

Neste estudo foi abordado a derivação das primeiras linhagens brasileiras de células-tronco embrionárias humanas em condições ambientais ideais com 5% de O₂.

Concluímos que, dos dezesseis embriões doados para a realização deste estudo, descongelados e cultivados, de acordo com a Lei de Biossegurança (nº 11.105, de 24 de março de 2005), até o estágio de *BL* pela FERTIVITRO - Centro de Reprodução Humana, somente dois destes embriões tiveram a *ICM* aderida na placa de cultivo e seguiram no estabelecimento das linhagens de *hESCs*.

As primeiras linhagens brasileiras de *hESCs* foram estabelecidas, após dois meses em cultivo, denominadas BR-4 e BR-5 e foram cultivadas por sete meses para expansão e caracterização das mesmas.

Quanto as caracterizações, as linhagens de *hESCs*, BR-4 e BR-5, derivadas sob estas condições de O₂, apresentaram (i) morfologia com colônias compactas e bordas bem definidas, (ii) células uniformes, (iii) controle da pluripotência sem diferenciação espontânea, (iv) congelamento e descongelamento estável, (v) comprovação positiva de pluripotência para os genes OCT 3 / 4, SSEA-4 e NANOG, (vi) cariótipo normal, (vii) aptidez à formação de corpos embrióides e à diferenciação espontânea, (viii) comprovação positiva de diferenciação para os genes Sox17, MyoD e NESTIN e (ix) formação de teratoma com diferenciação nos tecidos dos três folhetos embrionários, (x) aumento da proliferação celular, (xi) controle da diferenciação e (xii) controle de anormalidades cromossômicas.

Com os resultados positivos destas caracterizações, o estabelecimento das linhagens de *hESCs*, BR-4 e BR-5, foi concluído com sucesso.

Estas linhagens podem ser multiplicadas quase que indefinidamente e suprir a necessidade de pesquisa de vários pesquisadores. Assim, se tornam ferramentas experimentais importantes para a compreensão da diferenciação e desenvolvimento celular, e podem oferecer uma ampla gama de aplicações potenciais, incluindo a prevenção, diagnóstico e tratamento de doenças humanas.

REFERÊNCIAS

ALLEGRUCCI, C. and YOUNG, L. E. Differences between human embryonic stem cell lines. **Hum. Reprod. Update**, (13) 103-120. 2007.

ANDREWS, P. W. Embryonic Stem (ES) cells and Embryonal Carcinoma (EC) cells: opposite sides of the same coin. **Biochem. Soc. Trans.**, (33) 1526-1530. 2005.

BLUM, B. & BENVENISTY, N. The tumorigenicity of human embryonic stem cells. **Adv. Cancer Res.**, (100) 133-158. 2008.

BOLSOVER, S. R.; HYAMS, J. S.; SHEPHARD, E. A.; WHITE, H. A.; WIEDEMANN, C. G. Cell Biology. **Hoboken**, (1) 531. 2004.

BRADLEY, A.; EVANS, M.; KAUFMAN, M.H. and ROBERTSON, E. Formation of germ-line chimaeras from embryo derived teratocarcinoma cell lines. **Nature**, (309) 255-256. 1984.

BROOK, F. A.; GARDNER, R. L. The origin and efficient derivation of embryonic stem cells in the mouse. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA.**, (94) 5709-5712. 1997.

BUZZARD, J. J.; GOUGH, M. M.; CROOK, J. M. and COLMAN, A. Karyotype of human embryonic stem cells during extended culture. **Nat. Biotechnol.**, (22) 381-382. 2004.

CHOI, D.; OH, H. J.; CHANG, U. J.; KOO, S. K.; JIANG, J. X.; HWANG, S. Y.; LEE, J. D.; YEOH, G. C.; SHIN, H. S.; LEE, J. S.; OH, B. *In vitro* differentiation of mouse embryonic stem cells into hepatocytes. **Cell Transplantation**, (11) 359-368. 2002.

COMMITTEE FOR THE UPDATE OF THE GUIDE FOR THE CARE AND USE OF LABORATORY ANIMALS. Guide for the care and use of laboratory animals. **The National Academies Press**, 8 ed. Washington, D.C. Disponível em: <<http://grants.nih.gov/grants/olaw/Guide-for-the-care-and-use-of-laboratory-animals.pdf>>. Acesso em: 13 jun. 2011.

COOKE, M. J.; STOJKOVIC, M.; PRZYBORSKI, S. A. Growth of teratomas derived from human pluripotent stem cell is influenced by the graft site. **Stem Cells Dev.**, (15) 254-259. 2006.

COWAN, C. A.; KLIMANSKAYA, I.; MCMAHON, J.; ATIENZA, J.; WITMYER, J.; ZUCKER, J. P.; WANG, S.; MORTON, C. C.; MCMAHON, A. P.; POWERS, D.; MELTON, D. A. Derivation of embryonic stem-cell lines from human blastocysts. **N. Engl. J. Med.**, (350) 1353-1356. 2004.

DONAVAN, J. P. and GEARHART, J. The end of the beginning for pluripotent stem cells. **Nature**, (414) 399-405. 2001.

EVANS, M. J.; KAUFMAN, M. H. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. **Nature**, (292) 154-156, 1981.

EZASHI, T.; DAS, P. and ROBERTS, R. M. Low O_2 tensions and the prevention of differentiation of human embryonic stem cells. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA**, (102) 4783-4788. 2005.

FORSYTH, N. R.; MUSIO, A.; VEZZONI, P.; SIMPSON, A. H.; NOBLE, B. S.; MCWHIR, J. Physiologic oxygen enhances human embryonic stem cell clonal recovery and reduces chromosomal abnormalities. **Cloning and Stem Cells**, (8) 16-23. 2006.

FRAGA, A. M.; SUKOYAN, M.; RAJAN, P.; BRAGA, D. P.; IACONELLI JR, A.; FRANCO JR, J. G.; BORGES JR, E. and PEREIRA, L. V. Establishment of a brazilian line of human embryonic stem cells in defined medium: implications for cell therapy in an ethnically diverse population. **Cell Transplantation**, (20) 431-440. 2008.

FRESHNEY, R. I. Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique. **Wiley-Liss Inc.**, 255-265. 1994.

GERON. Study GRNOPC1 in patients with acute spinal cord injury: Geron to proceed with first human clinical trial of embryonic stem cell-based therapy. Menlo Park, Calif., Disponível em: <<http://www.geron.com/grnopc1trial/grnopc1-backgrounder.pdf>>. Acesso em: 11 out. 2010.

GUASCH, G. and FUCHS, E. Mice in the world of stem cell biology. **Nature Genetics**, (37) 1201-1206. 2005.

HARVEY, A. J.; KIND, K. L.; PANTALEON, M.; ARMSTRONG, D. T.; THOMPSON, J. G. Oxygen-regulated gene expression in bovine blastocysts. **Biology of Reproduction**, (71) 1108-1119. 2004.

HE, J. Q.; MA, Y.; LEE, Y.; THOMSON, J. A. and KAMP, T. J. Human embryonic stem cells develop into multiple types of cardiac myocytes: action potential characterization. **Circ. Res.**, (93) 32-39. 2003.

HOCHACHKA, P.W.; BUCK, L.T.; DOLL, C.J.; LAND, S. C. Unifying theory of hypoxia tolerance: molecular/metabolic defense and rescue mechanisms for surviving oxygen lack. **Proc Natl Acad Sci U S A**. (18) 9493-9498. 1996.

HOFFMAN, L. M. and CARPENTER, M. K. Characterization and culture of human embryonic stem cells. **Nat. Biotechnol.**, (23) 699-708. 2005.

KAPLOWITZ, N. Mechanisms of liver cell injury. **J Hepatol**. (32) 39-47. 2000.

KEHAT, I.; GEPSTEIN, A.; SPIRA, A.; ISKOVITZ-ELDOR, J. and GEPSTEIN, L. High-resolution electrophysiological assessment of human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes. **Circ. Res.**,

(91) 659-661. 2002.

KLEINSMITH, L. J. & PIERCE J. R, G. B. Multipotentiality of single embryonal carcinoma cells. **Cancer Res.**, (24) 1544-1551. 1964.

LENNON, D. P.; EDMISON, J. M.; CAPLAN, A. I. Cultivation of rat marrowderived mesenchymal stem cells in reduced oxygen tension: effects on in vitro and in vivo osteochondrogenesis. **Journal of Cellular Physiology**, (187) 345-355. 2001.

LIANG J.; SHANG, Y. Estrogen and cancer. **Annu Rev Physiol.** (75) 225-240. 2013.

LING, V. and NEBEN, S. *In vitro* differentiation of embryonic stem cells: immunophenotypic analysis of cultured embryoid bodies. **J. Cell Physiol.**, (171) 104-115. 1997.

LUDWIG, T. E.; LEVENSTEIN, M. E.; JONES, J. M.; BERGGREN, W. T.; MITCHEN, E. R.; FRANE, J. L.; CRANDALL, L. J.; DAIGH, C. A.; CONARD, K. R.; PIEKARCZYK, M. S. Derivation of human embryonic stem cells in defined conditions. **Nature Biotechnology**, (24) 185-187. 2006.

MARKERT, C. Neoplasia: a disease of cell differentiation. **Cancer Res.**, (28) 1908-1914. 1968.

MARTIN, G. R. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA**, (78) 7634-7638. 1981.

MARTIN, M. J.; MUOTRI, A.; GAGE, F. and VARKI. A. Human embryonic stem cells express an immunogenic nonhuman sialic acid. **Nat. Med.**, (11) 228-232. 2005.

MILLMAN, J. R.; TAN, J. H. and COLTON, C.K. The effect of low oxygen on self-renewal and differentiation of embryonic stem cells. **Curr. Opin. Organ. Transplant**, (14) 694-700. 2009.

MORRISON, S. J.; CSETE, M.; GROVES, A. K.; MELEGAW, W. B.; ANDERSON, D. J. Culture in reduced levels of oxygen promotes clonogenic sympathoadrenal differentiation by isolated neural crest stem cells. **Journal of Neuroscience**, (20) 7370-7376. 2000.

MUMMERY, C.; WARD, D.; VAN DEN BRINK, C. E. Cardiomyocyte differentiation of mouse and human embryonic stem cells. **J. Anat.**, (200) 489-493. 2002.

MUOTRI, A. R.; NAKASHIMA, K.; TONI, N.; SANDLER, V. M.; GAGE, F. H. Development of functional human embryonic stem cell-derived neurons in mouse brain. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA**, (102) 18644-18648. 2005.

NIETO, A.; CABRERA, C. M.; CATALINA, P.; COBO, F.; BARNIE, A.; CORTÉS, J. L. Effect of mitomycin-C on human foreskin fibroblasts used as feeders in human embryonic stem cells: Immunocytochemistry MIB1 score and DNA ploidy and apoptosis evaluated by flow cytometry. **Cell**

Biol. Int., (31) 269-278. 2007.

PIERCE JR, G. B.; DIXON JR, F. J. & VERNEY, E. L. Teratocarcinogenic and tissue-forming potentials of the cell types comprising neoplastic embryoid bodies. **Lab. Invest.**, (9) 583-602. 1960.

PLAIA, T. W.; JOSEPHSON, R.; LIU, Y.; ZENG, X.; ORDING, C.; TOUMADJE, A.; BRIMBLE, S. N.; SHERRER, E. S.; UHL, E. W.; FREED, W. J.; SCHULZ, T. C.; MAITRA, A.; RAO, M. S. and AUERBACH, J. M. Characterization of a new NIH-registered variant human embryonic stem cell line, bg01v: a tool for human embryonic stem cell research. **Stem Cells**, (24) 531-546. 2006.

POYTON, R. O. Models for oxygen sensing in yeast: implications for oxygen-regulated gene expression in higher eucaryotes. **Respir Physiol.** (2) 119-133. 1999.

PROKHOROVA, T. A.; HARKNESS, L. M.; FRANDSEN, U.; DITZEL, N.; SCHRODER, H. D.; BURNS, J. S. and KASSEM, M. Teratoma formation by human embryonic stem cells is site-dependent and enhanced by the presence of matrigel. **Stem Cells and Development.** (18) 47-54. 2009.

PRZYBORSKI, S. A. Differentiation of human embryonic stem cells after transplantation in immune-deficient mice. **Stem Cells**, (23) 1242-1250. 2005.

REUBINOFF, B. E.; PERA, M. F.; FONG, C. Y.; TROUNSON, A. and BONGSO, A. Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro. **Nat. Biotechnol.**, (18) 399-404. 2000.

ROUNSON, A. Human embryonic stem cell derivation and directed differentiation. **Ernst. Schering Res. found workshop**, 27-44. 2005.

ROY, A.; KRZYKWA, E.; LEMIEUX, R.; NÉRON, S. Increased efficiency of gamma-irradiated versus mitomycin C-treated feeder cells for the expansion of normal human cells in longterm cultures. **J. Hemato. Ther. Stem Cell Res.**, (10) 873-880. 2001.

SALAMAN, M. H. and GWYNN, R. H. The histology of co-carcinogenesis in mouse skin. **British Journal of Cancer**, (2) 252-263. 1951.

SCHULDINER, M.; YANUKA, O.; ITSKOVITZ-ELDOR, J.; MELTON, D. A.; BENVENISTY, N. Effects of eight growth factors on the differentiation of cells derived from human embryonic stem cells. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA**, (97) 11307-11312. 2000.

SCOTT, R. E. Differentiation, differentiation/gene therapy and cancer. **Pharmacol. Ther.**, (73) 51-65. 1997.

SMITH, A. G. Origins and properties of mouse embryonic stem cells. **Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.**

2001.

STABA, L.; ESCOLAR, M. L.; POE, M.; KIM, Y.; MARTIN, P. L.; SZABOLCS, P.; ALLISON-THACKER, J.; WOOD, S.; WENGER, D. A.; RUBINSTEIN, P.; HOPWOOD, J. J.; KRIVIT, W.; KURTZBERG, J. Cord-blood transplants from unrelated donors in patients with hurler's syndrome. **N. Engl. J. Med.**, (350) 1960-1969. 2004.

SUDA Y, SUZUKI M, IKAWA Y, AIZAWA S. Mouse embryonic stem cells exhibit indefinite proliferative potential. **J Cell Physiol.**, (133)197-201. 1987.

THOMSON, J. A.; ITSKOVITZ-ELDOR, J.; SHAPIRO, S. S.; WAKNITZ, M. A.; SWIERGIEL, J. J.; MARSHALL, V. S. and JONES, J. M. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. **Science**, (282) 1145-1147. 1998.

TROSKO, J. E.; CHANG, C. C.; MADHUKAR, B. V.; KLAUNIG, J. E. Chemical, oncogene and growth factor inhibition of gap junctional intercellular communication: an integrative hypothesis of carcinogenesis. **Pathobiology**, (58) 265-278. 1990.

VOGEL, G. Breakthrough of the year. Capturing the promise of youth. **Science**. (286) 2238-2239. 1999.

WATT, F. M. and HOGAN, B. L. Out of eden: stem cells and their niches. **Science**, (287) 1427-30. 2000.

WILLE JR, J. J. and SCOTT, R. E. Suppression of tumorigenicity by the cell-cycle-dependent control of cellular differentiation and proliferation. **Int. J. Cancer**, (37) 875-881. 1986.

WOBUS, A. M. and BOHELER, K. R. Embryonic stem cells: prospects for developmental biology and cell therapy. **Phys. Rev.**, (85) 635-678. 2005.

YAMADA, T.; YOSHIKAWA, M.; KANDA, S.; KATO, Y.; NAKAJIMA, Y.; ISHIZAKA, S.; TSUNODA Y. *In vitro* differentiation of embryonic stem cells into hepatocyte-like cells identified by cellular uptake of indocyanine green. **Stem Cells**, (20) 146-154. 2002.

ZHANG, S. C.; WERNIG, M.; DUNCAN, I. D.; BRUSTLE, O.; THOMSON, J.A. *In vitro* differentiation of transplantable neural precursors from human embryonic stem cells. **Nat. Biotech.**, (19) 1129-1133. 2001.

ANEXOS

Anexo 1 – Protocolo Nº 044/2006

 UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS

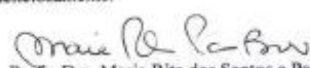
OF.CEP/IB/037/2006

São Paulo, 21 de setembro de 2006.

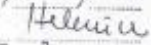
Prezada Senhora

Dirijo-me a V. Sa. para informar que o Comitê de Ética em Pesquisa deste Instituto, em reunião realizada em 19 de setembro de 2006, **APROVOU** o Projeto de Pesquisa “Estabelecimento de novas linhagens de células-tronco embrionárias humanas” de sua responsabilidade (Protocolo nº 044/2006), conforme cópia do Parecer em anexo.

Atenciosamente,


Profª. Dra. Maria Rita dos Santos e Passos Bueno
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa – Seres Humanos
IBUSP

Ilma. Sra.
Profª. Dra. LYGIA DA VEIGA PEREIRA CARRAMASCHI
Departamento de Genética e Biologia Evolutiva do IBUSP.

RECEBIDO EM
22/09/06
POR: 
AS 15:30 HORAS



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS

PARECER CONSUBSTANCIADO DE PROJETO DE PESQUISA

PROTOCOLO CEP-IBUSP – 044/2006

TÍTULO DO PROJETO DE PESQUISA: “Estabelecimento de novas linhagens de células-tronco embrionárias humanas”

Pesquisadora Responsável: Profa. Dra. Lygia da Veiga Pereira Carramaschi

Objetivo do projeto de pesquisa: O projeto tem como objetivo principal o desenvolvimento de pesquisas com células-tronco embrionárias humanas (CTEh) no Brasil, a partir do estabelecimento de linhagens destas células no país e disponibilização das mesmas para grupos de pesquisa nacionais. Mais especificamente os objetivos são: a) Cultivo de embriões humanos de acordo com o permitido pela Lei de Biossegurança de março de 2005, até o estágio de blastocisto; b) estabelecimento de linhagens de CTEh a partir da massa celular interna dos embriões; c) avaliação de diferentes tipos celulares como alternativa aos fibroblastos embrionários de camundongos como suporte para o cultivo das CTEh não diferenciadas de forma a gerar linhagens humanas que não tenham contato com produtos de origem animal; d) avaliação das linhagens; e) treinamento de pessoal no estabelecimento e cultivo de CTE murinas e humanas e f) disponibilização das linhagens de CTEh para grupos de pesquisa nacionais.

Local da realização do projeto, duração e financiamento: Trata-se de um projeto com vários colaboradores, inclusive internacionais. A duração prevista é de 02 anos e conta com uma verba de R\$400.000,00.

Instituições participantes e colaboradores nacionais: Sra. Sílvia Maria Gomes Massironi - trabalha no Biotério de Experimentação do Instituto de Ciências Biomédicas (4) da USP; Dr. Stevens Rehen - trabalha no Laboratório de Neurobiologia Celular II no Departamento de Anatomia da Universidade Federal do Rio de Janeiro; Dr. Edson Borges Junior da Fertility - Centro de Fertilização Assistida em São Paulo. Colaboradores Internacionais: Dra. Jaenne Loring - Professora Associada do Burnham Institute em La Jolla, Califórnia; Dr. Alysson R. Muotri - pesquisador associado ao Instituto de Pesquisas Salk da Califórnia; Dra. Marina Soukoian - pesquisadora que colabora com a Dra. Lygia da Veiga Pereira Carramaschi, há vários anos.

Comentários: O Projeto de Pesquisa é muito bem estruturado e muito bem redigido. A Dra. Maria Soukoian deverá participar do projeto como professora visitante. A Dra. Jaenne Loring e o Dr. Alysson R. Muotri deverão vir ao Brasil para ajudar no projeto sendo que o Dr. Alysson será professor visitante do Departamento de Anatomia da Universidade Federal do Rio de Janeiro. A pesquisadora comenta que o projeto deverá ser apresentado aos CEPs das outras Instituições envolvidas, o que significa certamente que será visto na Comissão de Ética em Uso de Animais em Experimentação do Instituto de Biociências. O Protocolo conta com um “Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)” adequado que será assinado pelos doadores do embrião. Ainda, conforme consta deste Termo, não haverá identificação das linhagens estabelecidas. A pesquisadora declara que estas linhagens ficarão armazenadas no Instituto de Biociências, sob sua responsabilidade. Só serão incluídos embriões congelados há pelo menos 3 anos, conforme Lei de Biossegurança Nacional.



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS

Considerações: O projeto apresentado contempla todos os atributos para ser aprovado. O projeto preenche também todos os pré-requisitos éticos conforme resolução CNS 196/96. Diante do Exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa – Seres Humanos, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS – 196/96, aprova o projeto de pesquisa proposto. A pesquisadora responsável deverá apresentar, ao CEP, relatórios anual e final.

Situação: Projeto APROVADO.

São Paulo, 19 de setembro de 2006.

Maria Rita dos Santos e Passos Bueno
Profª. Dra. Maria Rita dos Santos e Passos Bueno
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa – Seres Humanos
IBUSP

ARTIGOS

Artigo 1 – Derivation of new Brazilian lineages of human embryonic stem cells under physiological oxygen conditions.



São Carlos, 07 de novembro de 2013.

AP-B-C034/13

Ref.: **Submissão de artigo / BJB-208/13**

Título: DERIVATION OF NEW BRAZILIAN LINEAGES OF HUMAN EMBRYONICSTEM CELLS UNDER PHYSIOLOGICAL OXYGEN CONDITIONS.

Prezados Autores: Georges, JAO, Vergani, N., Fonseca, SAS, Fraga, AM, Silva, IS, Castro, FJG, Albuquerque, MCRM, Fujihara, LS and Pereira, LV.

Comunicamos o recebimento do manuscrito acima citado e, de acordo com os critérios do *Brazilian Journal of Biology*, o trabalho será submetido ao processo de análise e avaliação.

Sem mais para o momento, despedimo-nos.

Atenciosamente.

A handwritten signature in black ink, likely belonging to Prof. Takako Matsumura-Tundisi.

Prof. Takako Matsumura-Tundisi
Editora-Chefe
Brazilian Journal of Biology



Juliana Georges <julianageorges@gmail.com>

Autores para correções BJB-208/13

Brazilian Journal of Biology <bjb@bjb.com.br>
Para: Juliana Georges <julianageorges@gmail.com>

20 de fevereiro de 2014 14:39

Prezado(a) Autor(a) Juliana A.O. Georges

Estamos lhe enviando em anexo o parecer do referee indicado que analisou e avaliou o manuscrito (artigo científico) de V.Sa. intitulado "DERIVATION OF NEW BRAZILIAN LINEAGES OF HUMAN EMBRYONIC STEM CELLS UNDER PHYSIOLOGICAL OXYGEN CONDITIONS", submetido para publicação no Brazilian Journal of Biology.

Solicitamos que faça as alterações de acordo com o parecer, e nos devolva o manuscrito revisto, acompanhado de uma lista itemizada das mudanças, o mais cedo possível.

Por favor, envie 2 (duas) cópias impressas e os arquivos da nova versão e da lista itemizada em mídia (em duas extensões: docx e pdf), via correio.

Revisões recebidas após um prazo de três semanas serão consideradas como ressubmissões.

Atenciosamente

Rogério Pessa – assessor editorial

Brazilian Journal of Biology

Rua Bento Carlos, 750

13560-060 São Carlos SP

Obs.

1-A Comissão Editorial enfatiza aos autores e co-autores do Brazilian Journal of Biology, a necessidade de ampliar o número de citações do Brazilian Journal of Biology em seus artigos.

Por outro lado ao citar artigos referentes à antiga Revista Brasileira de Biologia (anterior a novembro de 2000, ou seja, volume 60.4) recomenda-se a seguinte citação: Rev. Brasil. Biol. = Braz. J. Biol. . Exemplo: CHIARELLO, A. G., 1995. Density and habitat use of primates at an Atlantic forest reserve of south-eastern Brazil. Rev. Brasil. Biol. = Braz. J. Biol., 55: 105-110.

2- Por favor, recepcionar esta mensagem.

Manuscript: BJB-208/13

Título:

DERIVATION OF NEW BRAZILIAN LINEAGES OF HUMAN EMBRYONIC STEM CELLS UNDER PHYSIOLOGICAL OXYGEN CONDITIONS

Autoria de:

Georges, JAO.^{1,2,3}, Vergani, N.^{2,3}, Fonseca, SAS.^{2,3}, Fraga, AM.^{2,3}, Silva, IS.¹, Castro, FJG.¹, Albuquerque, MCRM.⁴, Fujihara, LS.⁴ and Pereira, LV.^{2,3}

1. Aspectos gerais:

a) O trabalho contribui com inovação ou avanços científicos na área?

☒ sim ☐ não

b) Caso positivo, em que aspecto? O presente trabalho tem uma contribuição tanto no que diz respeito a inovação quanto avanços científicos na área do conhecimento. Gerando uma nova linhagem Brasileira de células tronco embrionárias sob condições diferenciadas.

c) A redação do artigo se encontra no estilo científico preciso?

☒ sim ☐ não

d) O inglês requer revisão do revisor de língua de origem nativa?

☐ sim ☒ não2. Relevância científica na área: ☐ alta ☒ média ☐ baixa ☐ não é relevante

3. Título:

☐ não apropriado ☒ apropriado ☐ requer modificações menores ☐ requer reestruturação

4. Abstract / Resumo em português:

☐ não apropriado ☒ apropriado ☐ requer modificações menores ☐ requer reestruturação
☐ diminuir ou remover trechos ☐ tornar mais informativo

5. Keywords / Palavras-chave:

☒ apropriado sugestões:☐ não apropriado

6. Introdução:

☐ não apropriado ☒ apropriado ☐ requer modificações menores ☐ requer reestruturação
☐ requer mais elementos para situar o problema enfocado
☐ objetivos do estudo não estão claros ☐ diminuir ou remover trechos

7. Material e Métodos:

☐ não apropriado ☒ apropriado ☐ requer modificações menores ☐ requer reestruturação
☐ a metodologia não é adequada ao experimento ou análise
☐ análises estatísticas estão incorretas ou inadequadas ☐ diminuir ou remover trechos

8. Resultados:

☐ não apropriado ☒ apropriado ☐ requer modificações menores ☐ requer reestruturação
☐ não apresenta dados suficientes para a avaliação adequada do problema
☐ diminuir ou remover trechos

9. Discussão:

☐ não apropriado ☐ apropriado ☒ requer modificações menores ☐ requer reestruturação
☐ discussão não está adequada aos resultados obtidos ☐ diminuir ou remover trechos

Discutir as diferenças e/ou semelhanças desta nova linhagem com as previamente obtidas, pelo menos no Brasil.

10. Conclusão:

☐ não apropriado ☒ apropriado ☐ requer modificações menores ☐ requer reestruturação
☐ não está adequada aos resultados obtidos e discussões apresentadas ☐ diminuir ou remover trechos

11. Referências Bibliográficas:

☐ utilização exagerada de bibliografia pouco relevante
☒ utilização de bibliografia adequada estritamente necessária e atualizada
☐ utilização de bibliografia atual relevante, porém excessiva ou desnecessária

Brazilian Journal of Biology

Instituto Internacional de Ecologia
Associação da Revista Brasileira de Biologia

12. Ilustrações e Tabelas:

- ☐ não apropriado ☒ apropriado ☐ requer modificações menores ☐ requer reestruturação
☐ remover figuras ☐ remover tabelas

Recomendo à Comissão:

- ☐ aceitar como está
☐ aceitar com pequenas modificações
☒ solicitar reformulação e condicionar o aceite ao atendimento das modificações sugeridas
☐ rejeitar

Considera necessária nova avaliação da nova versão do manuscrito:

- ☐ sim ☐ não

Parecer Conclusivo

Discutir as diferenças e/ou semelhanças desta nova linhagem com as previamente obtidas, pelo menos no Brasil.

1 **DERIVATION OF NEW BRAZILIAN LINEAGES OF HUMAN EMBRYONIC STEM**
 2 **CELLS UNDER PHYSIOLOGICAL OXYGEN CONDITIONS**

3

4 Georges, JAO.^{*1, 2,3}, Vergani, N.^{2,3}, Fonseca, SAS.^{2,3}, Fraga, AM.^{2,3}, Silva, IS.¹, Castro, FJG.¹,
 5 Albuquerque, MCRM.⁴, Fujihara, LS.⁴ and Pereira, LV.^{2,3}

6

7 ¹Faculdade de Medicina (FAMED), Programa de Pós-Graduação em Saúde e
 8 Desenvolvimento Regional, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS) - Av.
 9 Senador Filinto Muller, Caixa Postal 549, Unidade 9, Cidade Universitária, Campo Grande,
 10 MS, Brazil, CEP: 79070-900.

11

12 ²Laboratório de Genética Molecular e ³Laboratório Nacional de Células-Tronco Embrionárias
 13 (LaNCE), Instituto de Biociências (USP-IB), Departamento de Genética e Biologia Evolutiva,
 14 Universidade de São Paulo - Rua do Matão, Travessa 14, nº 321, Cidade Universitária, São
 15 Paulo, SP, Brazil, CEP: 05508-900.

16

17 ⁴Fertivtro - Centro de Reprodução Humana - Av. Indianópolis, nº 843, Moema, São Paulo,
 18 SP, Brazil, CEP: 04063-001.

19

20 *e-mail: julianageorges@gmail.com

21

22 (With 8 figures)

23

24

25

26 **Resumo - Inglês**

27 The development and application of human embryonic stem (hES) cells is an important
28 experimental tool for understanding differentiation and development, and offer a wide range
29 of potential applications, including prevention, diagnosis and treatment of human diseases.
30 This area is one of the most promising and fascinating contemporary biology. The essential
31 components of the process of embryonic stem cells derivation are the embryos, embryo
32 manipulation methods, feeder cells, culture media, the oxygen level and the general culture
33 conditions *in vitro*. In 2008, Pereira's group generated the first hES cell Brazilian lineage
34 (Fraga et al., 2010). It is important to continue deriving hES cells lines for both basic research
35 and clinical applications due to loss of genetic and epigenetic stability during hES cells
36 culture and the manipulation. Therefore, the more lineages are generated, we will have a
37 clearer idea about what is happening.

38

39

40

41

42

43

44

45

46

47

48

49

50

51 **Resumo - Português**

52 O desenvolvimento e a aplicação das células-tronco embrionárias humanas (hES) é uma
53 importante ferramenta experimental para a compreensão da diferenciação e desenvolvimento,
54 e oferece uma ampla gama de aplicações potenciais, incluindo a prevenção, diagnóstico e
55 tratamento de doenças humanas. Os componentes essenciais do processo de derivação das
56 células-tronco embrionárias são os embriões, os métodos de manipulação de embriões, as
57 matrizes celulares, os meios de cultura, o nível de oxigênio e as condições gerais de cultura *in*
58 *vitro*. Em 2008, o grupo da Dra. Lygia da Veiga Pereira gerou a primeira linhagem brasileira
59 de células-tronco embrionárias humanas (Fraga et al., 2010). É importante continuar a derivar
60 linhagens de células-tronco embrionárias humanas para a investigação básica e as aplicações
61 clínicas devido à perda de estabilidade genética e epigenética durante a cultura de células
62 embrionárias humanas e a manipulação. Portanto, quanto mais linhagens são geradas, teremos
63 uma idéia mais clara sobre o que está acontecendo.

64

65

66

67

68

69

70

71

72

73

74

75

ABSTRACT

The development and application of human embryonic stem (hES) cells is an important experimental tool for understanding differentiation and development, and offer a wide range of potential applications, including prevention, diagnosis and treatment of human diseases. This area is one of the most promising and fascinating contemporary biology. The essential components of the process of embryonic stem cells derivation are the embryos, embryo manipulation methods, feeder cells, culture media, the oxygen level and the general culture conditions *in vitro*. In 2008, Pereira's group generated the first hES cell Brazilian lineage (Fraga et al., 2010). It is important to continue deriving hES cells lines for both basic research and clinical applications due to loss of genetic and epigenetic stability during hES cells culture and the manipulation. Therefore, the more lineages are generated, we will have a clearer idea about what is happening. In the current study, we has generated two lineages of hES cells, designated BR-4 (46, XY) and BR-5 (46, XX), under physiological oxygen condition. To our knowledge, these are the first reported lineages of hES cells derived in South America under physiological oxygen condition, which was fundamental to the consolidation of this research area in our country to study the epigenetic status of these cells.

Keywords: Human Embryonic Stem Cells; Hypoxia; Derivation.

101 **RESUMO**102 **DERIVAÇÃO DE NOVAS LINHAGENS BRASILEIRAS DE CÉLULAS-TRONCO**
103 **EMBRIONÁRIAS HUMANAS SOB CONDIÇÕES FISIOLÓGICAS DE OXIGÊNIO**

104 O desenvolvimento e a aplicação das células-tronco embrionárias humanas (hES) é uma
 105 importante ferramenta experimental para a compreensão da diferenciação e desenvolvimento,
 106 e oferece uma ampla gama de aplicações potenciais, incluindo a prevenção, diagnóstico e
 107 tratamento de doenças humanas. Os componentes essenciais do processo de derivação das
 108 células-tronco embrionárias são os embriões, os métodos de manipulação de embriões, as
 109 matrizes celulares, os meios de cultura, o nível de oxigênio e as condições gerais de cultura *in*
 110 *vitro*. Em 2008, o grupo da Dra. Lygia da Veiga Pereira gerou a primeira linhagem brasileira
 111 de células-tronco embrionárias humanas (Fraga et al., 2010). É importante continuar a derivar
 112 linhagens de células-tronco embrionárias humanas para a investigação básica e as aplicações
 113 clínicas devido à perda de estabilidade genética e epigenética durante a cultura de células
 114 embrionárias humanas e a manipulação. Portanto, quanto mais linhagens são geradas, teremos
 115 uma ideia mais clara sobre o que está acontecendo. No estudo atual, nós geramos duas
 116 linhagens de células-tronco embrionárias humanas, denominadas BR-4 (46,XY) e BR-5
 117 (46,XX), sob a condição fisiológica de oxigênio. Para nosso conhecimento, estas são as
 118 primeiras linhagens de células-tronco embrionárias humanas reportados derivados na América
 119 do Sul sob a condição fisiológica de oxigênio, o que foi fundamental para a consolidação
 120 desta área de pesquisa em nosso país para estudar o estado epigenético dessas células.

121

122 *Palavras-chave:* Células-Tronco Embrionárias Humanas; Hipóxia; Derivação.

123

124

125

Juliana Andrea de Oliveira Georges
 Rua Manoel Inácio de Souza, 507 sala 03 • Jardim dos Estados
 CEP 79020-220 • Campo Grande, MS • Brazil

126 **INTRODUCTION**

127 Over the years, many different organs and tissues of the human body progressively lose
 128 their ability to function, thus creating a demand for transplant. Today, the stem cells offer the
 129 possibility of a source of replacement cells and tissues to treat a number of diseases is one of
 130 the main applications for medical therapies (Mummery et al., 2002).

131 Stem cells are primitive cells produced during development of the organism and are
 132 defined as cells with large capacity of proliferation and self-renewal, and have the ability to
 133 respond to external stimuli and give rise to different cell lines more specialized. They can be
 134 found in (i) newly fertilized embryos (blastocysts), (ii) in germ cells or organs from aborted
 135 fetuses, (iii) in blood cells of the umbilical cord at birth in some adult tissues and (iv) in
 136 mature adult tissue cells to be reprogrammed behavior of stem cells (Kehat et al., 2002).

137 The development of embryonic stem (ES) cell technology has been heralded as the
 138 dawn of a new era in cell transplantation therapy, drug discovery, and genomics (Odorico et
 139 al., 2001).

140 The first ES cell line was derived in 1981 from mouse embryos (Evans and Kaufman,
 141 1981), and in 1998 established the first human embryonic stem (hES) cell line derived from
 142 human embryos directly from the inner cell mass (ICM) of the developing blastocyst, created
 143 by *in vitro* fertilization (IVF) (Thomson et al., 1998).

144 The hES cells are found only in the initial stage of embryonic development, and derived
 145 from each of three primary germ layers (endoderm, mesoderm, and ectoderm), along with
 146 extra embryonic tissues that support development (Martin, 1981).

147 Once in culture, under appropriate conditions, hES cells are able to differentiate into
 148 every cell type of the human being, offering the possibility of a source replacement cells and
 149 tissues, such as an important experimental system for studying development and modeling

150 disease. This feature is called pluripotency (Reubinoff et al., 2000; He et al., 2003; Buzzard et
 151 al., 2004; Wobus and Boheler, 2005; Trounson, 2005).

152 However, *in vitro* cell culture brings a number of challenges; the cells and the cell
 153 culture environment are ideal for the growth of numerous microorganisms, and the cells
 154 themselves are prone to genetic changes. Somatic stem cells reside in specific
 155 microenvironments, called niches, and environmental changes, such as stromal cell contacts,
 156 extracellular matrix proteins, temperature, and oxygen level, have a great influence on stem
 157 cells function and differentiation (Danet et al., 2003).

158 The oxygen level to which hES cells are exposed is an important environmental
 159 parameter (Millman et al., 2009). Under conditions maintaining the undifferentiated
 160 phenotype, low oxygen reduces spontaneous differentiation of hES cells. It was reported that
 161 exposure to low oxygen partial tension can support the maintenance of hES cells
 162 undifferentiated phenotype for up to two weeks (Ezashi et al., 2005). It is still not know why
 163 the specific lines have different levels of robustness and proclivities to differentiate into
 164 specific lineages (Allegrucci and Young, 2006).

165 hES cells grow in tightly packed colonies and maintain defined borders at the periphery
 166 of colonies. High nucleus to cytoplasm ration and prominent nucleoli are typical features of
 167 individual hES cells within colonies. In order to obtain uniform hES cells colonies, it is
 168 important to use techniques and methods that can be used to test more hES cell lineages. To
 169 meet the strict criteria for ease of handling, including mechanical and/or enzymatic passages,
 170 defined culture media, karyotyping analysis, immunocytochemistry (ICC), embryoid bodies
 171 (EBs) formation, teratoma assays, simplified cryopreservation and thawing procedures,
 172 viability, and stability are important factors to characterize and qualify their use in stem cell
 173 research. It is important to continue deriving hES cells lines for both basic research and
 174 clinical applications due to loss of genetic and epigenetic stability during hES cells culture,

175 and the manipulation. Therefore, the more lineages are generated, we will have a clearer idea
 176 about what is happening (Lengner et al., 2010).

177 In the current study, according to the norms of Biosafety Law (Nº 11.105, March 24th,
 178 2005), our group obtained of Fertilivito - Center of Human Reproduction, human embryos
 179 produced by IVF and we has generated together two lineages of hES cells, designated BR-4
 180 (46, XY) and BR-5 (46, XX), under physiological oxygen condition. To our knowledge, these
 181 are the first reported lineages of hES cells derived in South America under physiological
 182 oxygen condition, which was fundamental to the consolidation of this research area in our
 183 country to study the epigenetic status of these cells.

184

185 MATERIALS AND METHODS

186 *Embryos*

187 Embryos were donated for research according to the Brazilian legislation (Biosafety
 188 Law Nº 11.105, March 24th, 2005), with written informed consents signed by biological
 189 parents, and with the approval of the Ethics Committee of the Bioscience Institute of the
 190 University of São Paulo (<http://www.ib.usp.br/formularios.php?menu=1> - protocol number
 191 044/2006). Embryos were thawed and cultured until blastocyst stage at a temperature of 37
 192 °C with 5% CO₂ and 5% O₂.

193

194 *Derivation of hES Cells*

195 The ICMs were mechanically isolated and plated individually in cell culture 4-well
 196 plates (Nunc) pre-treated with 0,1% gelatin solution (Sigma) and containing mouse
 197 embryonic fibroblast (MEF) (Chemicon International) cells, and cultured in KnockOut hESC
 198 media with Knockout Dulbecco's Modified Eagle medium (KO-DMEM) (Invitrogen), 20%
 199 KnockOut Serum Replacer (KO SR) (Hyclone), 50U/ml penicillin/streptomycin, 1x

glutaMAX 200mM (Invitrogen), 1x MEM non-essential amino acids 100X (NEAA) (Cambrex), 50µM B-mercaptoethanol 50mM (Invitrogen), 10ng/ml Basic Fibroblast Growth Factor (bFGF) (Invitrogen) human recombinant 10µg, and incubated at a temperature of 37 °C with 5% CO₂ and 5% O₂. Between days 4-5, were added MEFs cells to maintain the cells in culture until split at the first passage. We established two hES cells lineages under physiological oxygen conditions, BR-4 and BR-5. Immediately after stable establishment, each hES cell line was split at the first passage. Our new hES cells lines were cultured for prolonged periods. BR-4 and BR-5 lineages, every 4-6 days, there were mechanical passages colony to a new 6-well plates-adherent cell culture (Corning Costar) previously treated with BD Matrigel hESC-qualified Matrix (BD Biosciences) supplemented with Dulbecco's Modified Eagle medium (DMEM F-12) (Invitrogen) and grown in mTeSR1 basal medium (StemCell Technologies) supplemented with mTeSR1 5X Supplement (StemCell Technologies) and incubated at a temperature of 37 °C with 5% CO₂ and 5% O₂. This process of cell culture was followed by two months, until the establishment and characterization of BR-4 and BR-5 lineages.

215

216 *Karyotyping Analysis*

To analyze the Karyotype of the hES cell lines, the cells were cultivated under physiological oxygen condition in 6-well plates-adherent cell culture previously treated with BD Matrigel hESC-qualified Matrix supplemented with DMEM F-12 and grown in mTeSR1 basal medium supplemented with mTeSR1 5X Supplement and incubated at a temperature of 37 °C with 5% CO₂ and 5% O₂. When the cells were at passage eleven, the colchicines (Sigma) was added in the culture for one hour at 37 °C. After this time, the cells were trypsinized, centrifuged and the pellet was resuspended in the hypotonic solution 0.075M (KCL) (Sigma) incubated at 37 °C for fifteen minutes and centrifuged again. The fixation was

made using methanol (3:1) acetic acid solution (Sigma) and the material was dropped in slides to proceed with Standard G-banding karyotype analysis as described (Gosden et al., 1992). At least twenty metaphases for each cell line were analyzed to determine the karyotype. The metaphases analyzed were captured in Metasystem and Zeiss Microscope.

229

230 *Immunocytochemistry*

The cells were cultivated in 4-well slides chambers (BD Biosciences) under physiological oxygen conditions. For ICC assay, cells from passage 10 were fixed with 4% paraformaldehyde (PFA) (Sigma) for ten minutes, permeabilized in 0,1% Triton X-100 solution (Sigma), and blocked in 1% fetal bovine serum (FBS) (Hyclone) for one hour. The immunostaining was made according to the manufacture procedure of each antibody including the dilution. Briefly, the cells were washed three times in Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (1x) (PBS) pH 7,4 (Invitrogen) for five minutes, removed the liquid and incubated with 0,5% Triton X-100 solution for fifteen minutes at room temperature (RT) prior to blocking. The cells were blocked for one hour at RT with 1% Bovine Serum Albumin (BSA) (Sigma) diluted in PBS. The cells were incubated with each primary antibody OCT 3/4 (1:100; Santa Cruz Biotechnology), SSEA-4 (1:50; Chemicon), and NANOG (1:25; R&D Systems) were diluted in block solution according to the specification of the manufacture and were incubated overnight at 4°C. After incubation, the cells were washed three times with PBS for five minutes at RT and incubated with the secondary antibody Alexa Fluor 488 (1:1000; Molecular Probes) was diluted in block solution was then added to cell preparations for one hour at RT, in the dark, followed by three washes with PBS for five minutes each, prior visualization. The nuclei were counterstained with DAPI and the slides were mounted in VectaShield mounting medium (Vector Laboratories, Burlingame, CA). All colonies present in the slides were analyzed to confirm the positive signal of each antibody. The analysis was

done using an Axiophot 2 (Carl Zeiss) and images were captured by CCD camera using the
ISIS software (MetaSystem).

252

253 *Embryoid Bodies Formation*

254 To form EBs, BR-4 and BR-5 hES cells grown in mTeSR1 basal medium supplemented
255 with mTeSR1 5X Supplement and incubated at a temperature of 37 °C with 5% CO₂ and 5%
256 O₂. The cells were cultivated and mechanically, the colonies were cut in small pieces and put
257 in a 6-well plates-non-adherent cell culture (Corning Costar) pre-treated with 0,1% gelatin
258 solution that allow the formation of EBs. Initially the cells were DMEM F-12, 15% FBS ES
259 qualified (Gibco, Life Technologies), 50U/ml penicillin/streptomycin, 1x glutaMAX 200mM,
260 sodium pyruvate, 1x MEM NEAA 100X, 50µM B-mercaptoethanol 50mM. EBs formation
261 media was changed every other day. After one week, the EBs formed were transferred to 4-
262 well slides chambers pre-treated with 0,1% gelatin solution in order to the attachment of the
263 EBs and spontaneous differentiation. After two weeks, the differentiated cells were prepared
264 to proceed with ICC assay with markers, such as SOX17 (1:250; R&D Systems) (endoderm);
265 MyoD (1:50; BD Pharmingen) (mesoderm) and NESTIN (1:100; Chemicon) (ectoderm).

266

267 *Teratoma Assays*

268 Cells from passage 11 were cultured on feeder cells were mechanically dissected in
269 small pieces, approximately 1x10⁵ cells (100 clumps) each vials, centrifuged and
270 resuspended in media contained PBS with 30% BD Matrigel hESC-qualified Matrix were
271 injected subcutaneously in immunocompromised mice (C57/B16 SCID mice) in order to
272 verify the capability of these cells form teratomas *in vivo* (Prokhorova et al., 2009).

273 Ten weeks after injection, mice were sacrificed by cervical dislocation, and all efforts
274 were made to minimize suffering, and we could see the formation of cystic and solid tumors.

275 *Histological Analysis*

276 Tumors were removed and were fixed in 4% PFA were embedded in paraffin and
 277 submitted to histological analysis as described (Salaman and Gwynn, 1951). Five-micron
 278 sections were stained with hematoxylin and eosin, and adjacent sections were assayed for
 279 Weigert coloration, specific for elastic fiber visualization. Slides were examined and
 280 photographed using an Axiovert 200 (Carl Zeiss).

281 This study was carried out in strict accordance with the recommendations in the Guide
 282 for the Care and Use of Laboratory Animals of the National Institutes of Health (NIH)
 283 (<http://grants.nih.gov/grants/olaw/Guide-for-the-care-and-use-of-laboratory-animals.pdf>). The
 284 protocol was approved by the Committee on the Ethics of Animal Experiments of the Institute
 285 of Biosciences, University of São Paulo (Protocol 123/2011).

286

287 *Cryopreservation*

288 Samples of the lineages were frozen used a slow freezing method. Up to 20 colonies
 289 were collected in a cryo-tube (Corning Costar) with as a small amount of medium as possible,
 290 and 400-500 µl serum replacement (SR) (Hyclone) medium without basic fibroblast growth
 291 factor (bFGF) (R&H Systems) supplemented with 10% Dimethyl sulfoxide (DMSO) (Sigma)
 292 was added. The cryo-tube was then placed in a Nalgene Cryo 1°C Freezing Container (5100-
 293 0001) (Nalge Nunc International) with isopropanol and placed in -70°C freezer overnight.
 294 The cryo-tube was then stored in liquid nitrogen. Thawed samples could be grown from the
 295 thawed aggregates.

296

297 **RESULTS**

298 The essential components of the derivation process of hES cells are the embryos,
 299 embryo manipulation methods, feeder cells, culture media and general culture conditions.

300 All embryos were donated from IVF clinics after parents consent, and cultured until
301 reach blastocyst stage.

302 Forty-three embryos were thawed and cultured until the blastocyst stage at a
303 temperature of 37 °C with 5% CO₂ and 5% O₂. We received twenty-two human embryos that
304 sixteen were in the blastocyst stage and six were in the morula stage. The ICMs were
305 mechanically isolated and seeded on MEFs. Surviving outgrows were monitored daily until
306 stable ES-like growth was observed. After two months of culture, we established two hES
307 cells lineages under physiological oxygen conditions, designated BR-4 (46, XY) (Figure 1A)
308 and BR-5 (46, XX) (Figure 1B), were successfully propagated and characterized.

309 Our new hES cells lineages were cultured for prolonged periods (Figure 2). Colonies
310 exhibited the characteristic morphology of hES cells and expressed pluripotency using the
311 technique by ICC with pluripotency markers such as OCT3/4, SSEA-4 and NANOG.
312 Pluripotency of the new cell lines was demonstrated by immunostaining for OCT3/4, SSEA-4
313 and NANOG (Figure 3). Before we proceed with the characterization of these two new cells
314 lineages, we analyzed the karyotype of these cells in order to verify if any of these cell lines
315 do not present aneuploidies and to confirm the gender of these cells. The cytogenetic analysis
316 of these two cells lineages, after 10 passages, revealed the presence of normal euploid set of
317 chromosomes in both cells lineages. The BR-4 showed normal male karyotype (46, XY) and
318 BR-5 showed normal female karyotype (46, XX) (Figure 4). Both these lineages did not
319 present any type of rearrangements that could be detected in cytogenetic analysis. After
320 showed that these two new hES cells lineages expresses pluripotent markers and normal
321 karyotype, we proceed with the next step of characterization of these cells. The cells formed
322 EBs (Figure 5) when cultured in suspension and absence of hFGF. In adherent plates, EBs
323 cells could differentiate in endoderm, ectoderm and mesoderm (Figure 6), as verified by by
324 immunofluorescence showed that these cells when differentiated were positive for SOX17,

325 MyoD and NESTIN (Figure 7). These results demonstrated, *in vitro*, that these two new
 326 lineages, BR-4 and BR-5, were capable of differentiate in cells representative of the three
 327 germ layers. Approximately 150 clumps of undifferentiated cells were injected
 328 subcutaneously in immunodeficient SCID mice and could efficiently form teratomas. We
 329 observe the tumor formation after 10 weeks of surgery and when we analyzed the teratomas
 330 we could observe various cell/tissue types such as muscles, different types of epithelia,
 331 neurons-like, cells representative of blood and glandular tissues from intestine. Both hES cells
 332 lineages, BR-4 and BR-5, were able to differentiate in various tissue representative of
 333 ectoderm, mesoderm and endoderm like neural cells, cardiac, adipose, muscle and others
 334 (Figure 8).

335

336 DISCUSSION

337 In 2008, according to Biosafety Law (Nº 11.105, March 24th, 2005), Pereira's group
 338 generated the first hES cell Brazilian lineage, named BR-1 (46, XY) (Fraga et al., 2010).

339 In 2010, our group has generated the second hES cell lineage, named BR-2 (69, XXXX),
 340 derived through a 3PN embryo (unviable embryo), and although this lineage is not suitable
 341 for cell therapy, it will be interesting as an *in vitro* model of human polyploidy.

342 Pluripotent hES cells are an important experimental tool for understanding
 343 differentiation and development, and its application not only in basic but also in applied
 344 research make them a potential source of different tissues for transplantation. However, one
 345 important challenge for the clinical use of these cells in therapy is the issue of immune
 346 compatibility, which may be dealt with by the establishment of hES cells banks to attend
 347 different populations.

348 In conclusion, it can be affirm that studies with different types of hES cells must be
 349 accompanied with enthusiasm and caution. It is inherent in every research area in advances

development and setbacks, and still do not know what kind of cell therapy and fulfill the promise will be most appropriate to treat the diseases. Still, hES cells should be viewed not only as a therapeutic agent, but as a research model where we can study the mechanisms behind the cellular differentiation, embryonic development, cancer and epigenetic changes, among others. On the other hand, this knowledge of basic biology may lead to an improved quality of human life.

In the current study, we has generated two lineages of hES cells, designated BR-4 (46, XY) and BR-5 (46, XX), under physiological oxygen condition.

Our first and second hES cells Brazilian lineages, named BR-1 (46, XY) (Fraga et al., 2010) and BR-2 (69, XXX), were not cultured under physiological oxygen condition, in compared with BR-4 and BR-5 were demonstrated that the culture of hES cells under physiological oxygen condition decreases the amount of spontaneous hES cells differentiation, control of pluripotency, epigenetic status and the cells proliferation.

Therefore, the more lineages are generated, we will have a clearer idea about what is happening. To our knowledge, these are the first reported lineages of hES cells derived in South America under physiological oxygen condition, which was fundamental to the consolidation of this research area in our country to study the epigenetic status of these cells.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico/Departamento de Ciência e Tecnologia do Ministério da Saúde (CNPq/MS/DECT), Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social (BNDES) and Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP). JAOG, NV and SASF have a Ph.D fellowships from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES); AMF has a

- 374 Ph.D fellowship from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).
375 The authors declare no conflicts of interest.

REFERENCES

1. ALLEGRUCCI, C. and YOUNG, L., 2006. Differences between human embryonic stem cell lines. Hum Reprod Update 13:103-20.
2. BUZZARD, JJ., GOUGH, MM., CROOK, JM. and COLMAN, A., 2004. Karyotype of human ES cells during extended culture. Nat Biotechnol 22:381-382.
3. DANET, GH., PAN, Y., LUONGO, JL., BONNET, DA., and SIMON, MC., 2003. Expansion of human SCID-repopulating cells under hypoxic conditions. J. Clin Invest 112:126-135.
4. EVANS, MJ. and KAUFMAN, MH., 1981. Establishment in culture of pluripotent cells from mouse embryos. Nature 292:154-156.
5. EZASHI, T., DAS, P. and ROBERTS, RM., 2005. Low O₂ tensions and the prevention of differentiation of human embryonic stem cells. Proc Natl Acad Sci USA 102:4783-4788.
6. FRAGA, AM, SUKOYAN, M., RAJAN, P., BRAGA, DP., IACONELLI, A. JR., FRANCO, JG. JR., BORGES, E. JR. and PEREIRA, LV., 2011. Establishment of a Brazilian line of human embryonic stem cells in defined medium: implications for cell therapy in an ethnically diverse population. Cell Transplantation 20:431-440.
7. GOSDEN, C.; DAVIDSON, C. and ROBERTSON, M., 1992. Lymphocyte culture. In: ROONEY, DE., CZEPUKOWSKY, BH., Human Cytogenetics. Oxford, UK:Oxford University Press 37-47.
8. HE, JQ., MA, Y., LEE, Y., THOMSON, JA. and KAMP, TJ., 2003. Human embryonic stem cells develop into multiple types of cardiac myocytes: action potential characterization. Circ Res 93:32-39.

9. KEHAT, I., GEPSTEIN, A., SPIRA, A., ISKOVITZ-ELDOR, J. and GEPSTEIN, L., 2002. High-resolution electrophysiological assessment of human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes. Circ Res 91:659-661.
10. LENGNER, C.J., GIMELBRANT, A.A., ERWIN, J.A., CHENG, A.W., GUENTHER, M.G., WELSTEAD, G.G., ALAGAPPAN, R., FRAMPTON, G.M., XU, P., MUFFAT, J., SANTAGATA, S., POWERS, D., BARRETT, C.B., YOUNG, R.A., LEE, J.T., JAENISCH, R. AND MITALIPOVA, M., 2010. Derivation of pre-X inactivation human embryonic stem cells under physiological oxygen concentrations. Cell 141:872-83.
11. MARTIN, G.R., 1981. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. Proc Natl Acad Sci USA 78:7634-7638.
12. MILLMAN, JR., TAN, J.H. and COLTON CK., 2009. The effect of low oxygen on self-renewal and differentiation of embryonic stem cells. Curr Opin Organ Transplant 14:694-700.
13. MUMMERY, C., WARD, D. and VAN DEN BRINK, C.E., 2002. Cardiomyocyte differentiation of mouse and human embryonic stem cells. J. Anat 200:489-493.
14. ODORICO, J.S., KAUFMAN, D.S. and THOMSON, J.A., 2001. Multilineage differentiation from human embryonic stem cells. Stem Cells 19:193-204.
15. PROKHOROVA, T.A., HARKNESS, L.M., FRANDSEN, U., DITZEL, N., SCHRODER, H.D., BURNS, J.S. and KASSEM, M. 2009. Teratoma Formation by Human Embryonic Stem Cells is site-dependent and enhanced by the presence of Matrigel. Stem Cells and Development 18:47-54.

16. REUBINOFF, BE., PERA, MF., FONG, CY., TROUNSON, A. and BONGSO, A., 2000. Embryonic stem cell lines from human blastocysts: Somatic differentiation in vitro. *Nat Biotechnol* 18:399-404.
17. SALAMAN, MH. and GWYNN, RH., 1951. The histology of co-carcinogenesis in mouse skin. *British Journal of Cancer* 2:252-263.
18. THOMSON, JA., ITSKOVITZ-ELDOR, J., SHAPIRO, SS., WAKNITZ, MA., SWIERGIEL, JJ., MARSHALL, VS. and JONES, JM., 1998. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282:1145-1147.
19. ROUNSON, A., 2005. Human embryonic stem cell derivation and directed differentiation. *Ernst Schering Res Found Workshop* 27-44.
20. WOBUS, AM. and BOHELER, KR., 2005. Embryonic Stem Cells: Prospects for Developmental Biology and Cell Therapy. *Phys Rev* 85:635-678.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Derivation process of new Brazilian lineages of hES cells under physiological oxygen conditions designated (A) BR-4 and (B) BR-5. The ICMs were mechanically isolated and attached to mouse embryonic fibroblast feed layer after 9 days (D9), 10 days (D10), 11 days (D11) and 12 days (12D) of culture. Scale bar: 100µm.

Figure 2. Morphological analysis revealed the characteristic features of hES cells compact colony structure, high nucleus to cytoplasm ration and prominent nucleoli. Scale bar: 100µm.

Figure 3. Characterization of hES cells lineages (BR-4 and BR-5) by ICC technique. Colonies of BR-4 and BR-5 staining positive for markers of pluripotency such as OCT3/4 (red), SSEA-4 (red) and NANOG (green). Nuclei are counter-stained with DAPI (blue). Scale bar: 100µm.

Figure 4. Karyotypes analysis of hES cells lineages (BR-4 and BR-5) with G-banding of cells at passage 10. BR-4 showed normal male karyotype (46, XY) and BR-5 showed normal female karyotype (46, XX).

Figure 5. Embryoid Bodies (EBs) formation of hES cells lineages (BR-4 and BR-5), in suspension, in non-adherent plates cell culture. Scale bar: 100µm.

Figure 6. Spontaneous differentiation of hES cells lineages (BR-4 and BR-5) attached in adherent plates cell culture. Scale bar: 100µm.

Figure 7. Expression of pluripotency markers. Immunofluorescence of hES cells lineages (BR-4 and BR-5) showed that these cells lineages when differentiated were positive for SOX17 (green), MyoD (green) and NESTIN (green). Nuclei were stained with DAPI (blue). Scale bar: 100µm.

Figure 8. Histological analysis of hematoxylin-eosin stained images of sections of teratomas derived from BR-4 and BR-5 hES cells showing derivatives from the three embryonic germ layers. The lineages were able to differentiate in various tissue representative of ectoderm, mesoderm and endoderm like (ad) adipose; (c) cartilage; (ge) glandular epithelium; (m) muscle tissues; (ne) neural epithelium; (nr) neural rosettes; (v) vessel. Scale bar: 100µm.

Figure 1.

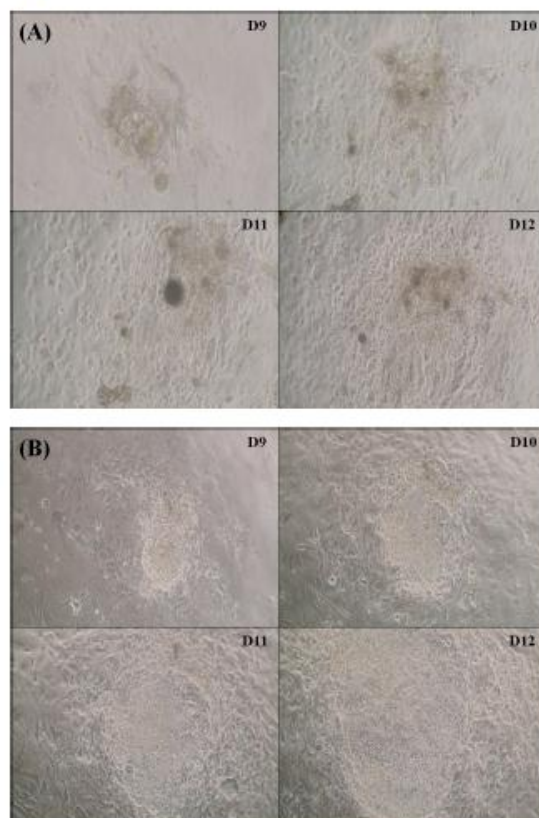


Figure 2.

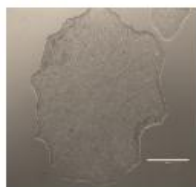


Figure 3.

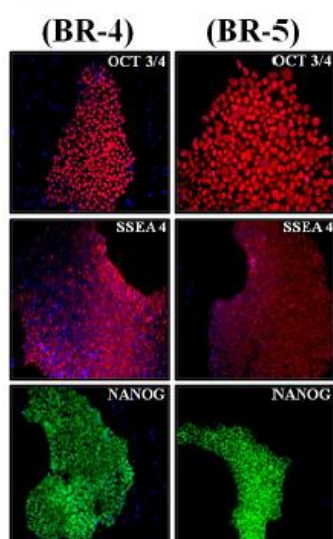


Figure 4.

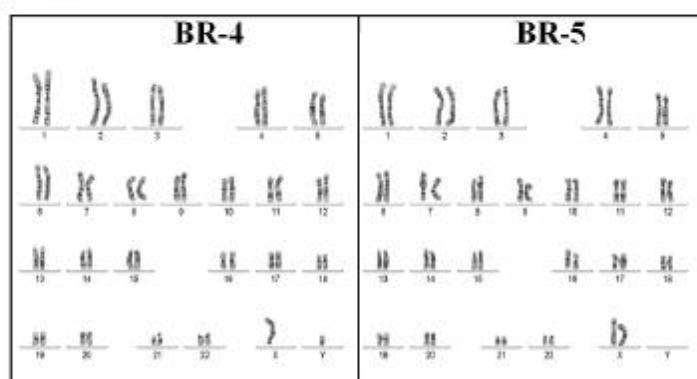


Figure 5.

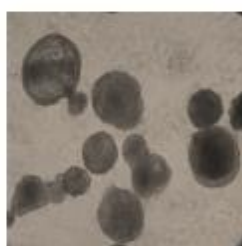


Figure 6.

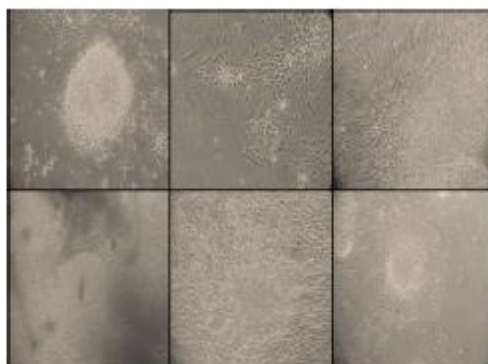


Figure 7.

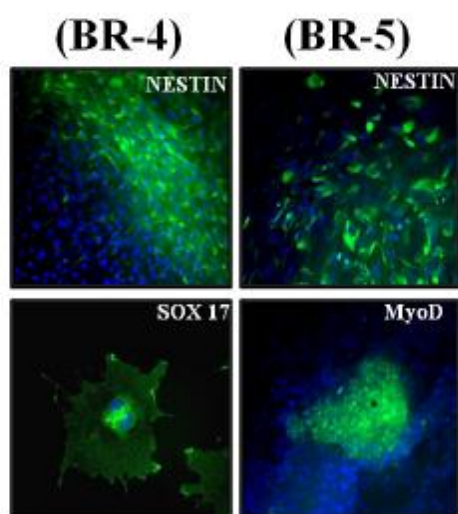


Figure 8.

