

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Pedro Cervo Calderaro

Caracterização de uma linhagem de células-tronco embrionárias humanas para uso em estudos futuros em medicina regenerativa

Porto Alegre

2013

Pedro Cervo Calderaro

Caracterização de uma linhagem de células-tronco embrionárias humanas para uso em estudos futuros em medicina regenerativa

Monografia apresentada à Disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso, do Curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: Prof^a Dr^a Patricia Pranke
Co-orientadora: Dr^a Andrea Giannotti Galuppo

Porto Alegre

2013

Pedro Cervo Calderaro

Caracterização de uma linhagem de células-tronco embrionárias humanas para uso em estudos futuros em medicina regenerativa

Trabalho de Conclusão de Curso aprovado como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas na Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pela comissão formada por:

Orientadora: Prof^a Dr^a Patricia Pranke
Faculdade de Farmácia - UFRGS

Dr^a Fernanda dos Santos Oliveira
Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Dr^a Natasha Maurmann
Faculdade de Farmácia - UFRGS

Porto Alegre, 5 de Dezembro de 2013.

Agradecimentos

Desenvolver um TCC é um desafio de final de curso que exige muita dedicação e esforço do aluno. Apesar de esse trabalho ser individual, muitos contribuíram para o seu desenvolvimento de forma direta ou indireta. Sendo assim, nada mais justo que agradecer aqueles que me acompanharam nesta trajetória.

Agradeço primeiramente à minha mãe, Sandra Luisa Cervo Calderaro, por todo apoio e carinho e aos meus avós, Decrides Cervo e Eny Maria Biacchi Cervo, que, igualmente, me prestaram todo apoio e auxílio nessa fase de final de curso.

À minha orientadora, Prof^a Dr^a Patricia Pranke, pela eficiente orientação e por me conceder a oportunidade de fazer parte do seu grupo de pesquisa, onde ampliei muito os meus conhecimentos e me aprimorei como profissional.

À minha co-orientadora, Dr^a Andrea Giannotti Galuppo, por todas as lições passadas para elaborar um trabalho acadêmico, além da orientação nas atividades práticas do laboratório.

Ao Dr. Pedro Chagastelles, pela confiança ao permitir minha participação em seus projetos e pelos ensinamentos práticos e teóricos.

E aos meus colegas de laboratório, Régis Oliveira e Gabriel Corrêa, pela ótima convivência, coleguismo e auxílio nas atividades de rotina no laboratório.

Resumo

As células-tronco embrionárias são derivadas da massa celular interna de embriões no estágio de blastocisto. Essas células são pluripotentes, podendo diferenciar-se em qualquer tipo celular do organismo. Após o processo de obtenção dessas células, é importante a realização de sua caracterização. A caracterização das células permite verificar a presença dos marcadores indicativos de pluripotência, bem como a sua capacidade de se diferenciar em derivados das três camadas germinativas. Dessa forma, o objetivo do presente trabalho foi caracterizar uma linhagem de células-tronco embrionárias humanas que serão futuramente utilizadas em experimentos visando a medicina regenerativa. A linhagem de células-tronco embrionárias humanas utilizada para esse trabalho foi a H9. Ela foi cultivada sobre uma monocamada de fibroblastos embrionários murinos pré-tratados com mitomicina C. O meio utilizado para manutenção das células foi o DMEM/F-12 suplementado com soro *Knockout*, antibióticos, aminoácidos não-essenciais, β -mercaptoetanol, Glutamax, Y-27632 e FGF2. As células foram mantidas em estufa a 37°C com 5% de CO₂ e 95% de umidade. A caracterização teve início com a observação da morfologia das colônias, com a contagem cromossômica e com a avaliação da atividade da fosfatase alcalina. Após, realizou-se a avaliação por imunofluorescência utilizando-se anticorpos anti-OCT4, SOX2 e TRA-1-81, bem como RT-PCR dos marcadores de pluripotência OCT4, NANOG, SOX2 e REX1. Para analisar o potencial de diferenciação foi feito o teste de formação de corpos embrioides, os quais foram avaliados por imunofluorescência para marcação de ectoderme (nestina e β -III-tubulina) e endoderme (SOX17). Também se realizou a avaliação da diferenciação sem a formação de corpos embrioides, sendo feita ao final a coloração com *Oil red O*. A análise dos resultados mostrou que as colônias apresentavam a morfologia típica de células-tronco embrionárias humanas, além do número cromossômico normal e a presença da atividade da fosfatase alcalina. Todos os marcadores analisados por imunofluorescência foram identificados, assim como os analisados por RT-PCR e foi comprovada a capacidade da linhagem diferenciar derivados das três camadas germinativas. Portanto, todos os testes demonstraram que a linhagem utilizada possui as características determinantes para sua classificação como célula-tronco embrionária humana.

Palavras-chave: Células-tronco embrionárias humanas. Caracterização. Medicina regenerativa

Sumário

1	Introdução.....	6
2	Revisão bibliográfica.....	8
2.1	As células-tronco embrionárias humanas.....	8
2.2	Caracterização das células-tronco embrionárias humanas.....	9
2.3	A linhagem H9.....	12
2.4	Desvantagens do uso de células-tronco embrionárias humanas.....	12
2.5	Alternativas ao uso das células-tronco embrionárias humanas.....	13
3	Objetivos.....	15
3.1	Objetivo geral.....	15
3.2	Objetivos específicos.....	15
4	Materiais e métodos.....	15
4.1	Obtenção da linhagem H9 de células-tronco embrionárias humanas.....	15
4.2	Aspectos éticos.....	15
4.3	Preparo da placa de cultura com gelatina.....	15
4.4	Preparo da placa com fibroblastos embrionários murinos.....	16
4.5	Descongelamento e cultivo das células-tronco embrionárias humanas.....	16
4.6	Remoção das colônias em diferenciação e passagem das culturas.....	17
4.7	Ensaio de contagem cromossômica.....	17
4.8	Ensaio da atividade da fosfatase alcalina.....	18
4.9	Ensaio de imunofluorescência para os marcadores de pluripotência.....	18
4.10	Expressão dos genes de pluripotência.....	19
4.10.1	Extração de RNA.....	19
4.10.2	Síntese de cDNA.....	20
4.10.3	Reação em cadeia da polimerase.....	20
4.11	Diferenciação <i>in vitro</i> das células-tronco embrionárias humanas.....	21
5	Resultados.....	22
6	Discussão.....	26
7	Perspectivas para o uso das células-tronco embrionárias humanas.....	29
8	Referências.....	30

1 Introdução

A medicina regenerativa e suas vertentes, a terapia celular e a engenharia de tecidos, são tratamentos emergentes que despertam grande entusiasmo na comunidade científica e na população leiga. Essas novas tecnologias buscam criar condições ideais para o reparo, a regeneração ou a substituição de tecidos lesados usando células, fatores de diferenciação e proliferação celular, além de biomateriais que forneçam a organização estrutural e funcional dos novos tecidos gerados (BOROJEVIC, 2008). Dessa forma, essa nova tecnologia visa substituir ou repor células e suas estruturas associadas (terapia celular) ou, ainda, gerando um novo órgão ou parte dele (engenharia de tecidos). Portanto, pacientes portadores de diferentes doenças, atualmente incuráveis, poderiam ser beneficiados com o desenvolvimento de protocolos na medicina regenerativa.

Doenças associadas ao envelhecimento, tais como Mal de Alzheimer, Mal de Parkinson, diabetes tipo II, insuficiência cardíaca, osteoartrite e imunosenescência são exemplos de doenças onde se espera que tais tecnologias possam auxiliar em seu controle ou mesmo em sua cura. No caso de lesões como trauma, enfarte e queimaduras, pode-se promover reparos em parte do tecido para melhor restabelecer a saúde dos pacientes (SYKOVA & FOROSTYAK, 2013; GIATSIDIS *et al.*, 2013). Outro problema grave a ser considerado seria o comprometimento de um órgão inteiro, como no caso da presença de tumores, sendo necessária a remoção do órgão seguido de um transplante. Atualmente, há uma escassez de órgãos disponíveis para transplantes, o que atrasa e impede o tratamento de muitos pacientes. Além disso, estimativas apontam que a demanda por transplantes irá se agravar na próxima década, principalmente devido a mudanças no perfil etário, demográfico e epidemiológico da população (PLATT & CASCALHO, 2013). Todos esses problemas de saúde são alvos de pesquisas relacionadas à medicina regenerativa.

Para tanto, é fundamental encontrar células que possam ser cultivadas de forma extensiva, indiferenciadas e com capacidade de se diferenciar nos tipos celulares desejados. As células mais adequadas a serem usadas para atingir esses objetivos seriam as células-tronco e por possuírem propriedades únicas, a revista científica *Science* as elegeu como *Scientific Breakthrough of the Year* (o avanço científico do ano) em 1999 (VOGEL, 1999). Dessa forma, as células-tronco podem ser consideradas como a principal ferramenta utilizada pela medicina regenerativa para o desenvolvimento de protocolos em pesquisa básica, pré-

clínica e clínica. O uso das células-tronco aplicado para a medicina regenerativa possui um potencial revolucionário. A nova era na medicina refere-se à regeneração tecidual baseando-se nos avanços dos estudos com as células-tronco (PRANKE, 2004).

As células-tronco podem ser definidas como células com grande capacidade de proliferação e auto-renovação, além de responder a estímulos externos e dar origem a diferentes linhagens celulares mais especializadas (PEREIRA, 2008). Elas podem ser de origem embrionária ou adulta.

As células-tronco adultas (CTA) são derivadas de tecidos e órgãos já formados, como gordura, polpa de dente, medula óssea, entre outros, e são capazes de se diferenciar em diversos tipos celulares, mas não em todos (BYDLOWSKI *et al.*, 2009). Historicamente, as CTA presentes na medula óssea são as mais estudadas, sendo utilizadas nos tratamentos de diferentes doenças que afetam o sistema hematopoético, desde a década de 50, devido à sua conhecida capacidade de se diferenciar em todos os tipos celulares do sangue. No final da década de 80, o sangue do cordão umbilical e placentário de recém-nascidos tornou-se uma fonte alternativa de células-tronco hematopoéticas, sendo criados, posteriormente, diversos bancos públicos de sangue de cordão umbilical no Brasil e no mundo (PEREIRA, 2008). Segundo dados do INCA, há mais de 350 bancos de sangue de cordão umbilical em todo o mundo e, no Brasil, cerca de 12 bancos públicos de sangue de cordão umbilical (INCA). Estudos demonstraram que as CTA poderiam derivar tipos celulares diferentes dos presentes nos tecidos onde residem. Desde então, têm sido identificadas e estudadas novas fontes de CTA, assim como, sua capacidade de diferenciação e aplicação em tratamentos clínicos (PEREIRA, 2008).

As células-tronco embrionárias (CTE) são derivadas da massa celular interna de embriões no estágio de blastocisto e são denominadas pluripotentes. A pluripotência é a capacidade de originar todos os tecidos das três camadas germinativas. As CTE foram primeiramente derivadas de embriões de camundongo em 1981 por Martin J. Evans e Matthew Kaufman e independentemente por Gail R. Martin. O estabelecimento de linhagens de CTE contribuiu muito para o maior conhecimento sobre as células-tronco e para estudos de biologia do desenvolvimento (EVANS & KAUFMAN, 1981; MARTIN, 1981). Posteriormente, James Thomson e colaboradores estabeleceram a primeira linhagem de células-tronco embrionárias humanas (CTEh) em 1998 (THOMSON *et al.*, 1998).

O Laboratório de Hematologia e Células-tronco da Faculdade de Farmácia da UFRGS foi o primeiro laboratório da Região Sul do Brasil a cultivar CTEh. O projeto desenvolvido objetivou o cultivo, expansão e caracterização da linhagem H9 de CTEh, visando utilizá-las

em futuros trabalhos com biomateriais produzidos por nanotecnologia no campo da medicina regenerativa.

2 Revisão bibliográfica

2.1 As células-tronco embrionárias humanas

O estabelecimento da primeira linhagem de CTEh por James Thomson e colaboradores gerou um grande entusiasmo na possibilidade de uso dessas células na medicina regenerativa, por elas serem capazes de originar qualquer tipo celular adulto e possuírem extensiva capacidade proliferativa *in vitro* (THOMSON *et al.*, 1998). Posteriormente, diversas linhagens de CTEh foram estabelecidas ao redor do mundo. Em 2008, foi estabelecida a primeira linhagem brasileira, a BR-1 (FRAGA *et al.*, 2011).

As primeiras derivações de CTEh foram realizadas sobre uma camada alimentadora tipicamente composta por fibroblastos embrionários murinos (*murine embryonic fibroblasts* - MEFs), previamente inativados com mitomicina C. A camada de MEFs fornece citocinas que promovem o crescimento indiferenciado das CTEh (BEATTIE *et al.*, 2005). Atualmente, as CTEh podem ser cultivadas sobre diferentes substratos, desde camadas alimentadoras até matrizes extracelulares, como o Matrigel (VILLA-DIAZ *et al.*, 2013). O meio de cultura utilizado deve ser suplementado com uma fonte proteica, que pode ser o soro *Knockout*, ou até mesmo o soro fetal bovino. Outros componentes frequentemente adicionados ao meio de cultura são o fator de crescimento de fibroblasto (FGF2), que estimula as células a permanecerem no estado indiferenciado, bem como a glutamina, o β -mercaptoetanol e os aminoácidos não essenciais (AMÉEN *et al.*, 2008; LASLETT *et al.*, 2003). Entretanto, apesar da suplementação auxiliar na proliferação e manutenção das CTEh, é importante considerar que muitos desses suplementos são de origem animal, sendo potenciais fontes de patógenos. Por esse motivo, metodologias livres do uso de camada alimentadora e de componentes de origem animal têm sido desenvolvidas (RAYMEN & WILLIAMS, 2010).

2.2 Caracterização das células-tronco embrionárias humanas

Após o estabelecimento da primeira linhagem de CTEh, diversos laboratórios ao redor do mundo conseguiram derivar suas próprias linhagens. No entanto, as variações na derivação, na qualidade dos embriões, na fase de desenvolvimento no momento da derivação e manutenção e passagem das culturas podem acarretar diferenças nas linhagens estabelecidas (HOFFMAN & CARPENTER, 2005). Por isso, é fundamental estabelecer protocolos específicos, rápidos e confiáveis para a caracterização das CTEh (MARTÍ *et al.*, 2013). Apenas dessa forma será possível comparar de forma imparcial e objetiva os resultados obtidos com as diferentes linhagens (ALLEGRUCCI & YOUNG, 2007). Assim, quando uma linhagem de CTEh é estabelecida ou adquirida é fundamental realizar a caracterização a fim de demonstrar a identidade e pluripotência dessas células.

O Fórum Internacional de Células-tronco (*International Stem Cell Forum*) foi fundado por pesquisadores de todo o mundo em 2003 para promover uma colaboração internacional que tem como objetivo principal padronizar boas práticas globais e acelerar os avanços nos estudos com células-tronco. Entre os trabalhos desse grupo, está o projeto *The International Stem Cell Initiative* que surgiu com o objetivo de estabelecer um conjunto de normas para a caracterização das linhagens de CTEh. Para identificar as características comuns das CTEh, o grupo coletou o máximo possível de linhagens e realizou um conjunto básico de estudos de caracterização em condições definidas. Para esse projeto, foram estudadas 75 linhagens de CTEh em 17 diferentes laboratórios em 11 países membros do grupo. Os resultados dos estudos apontaram que todas as linhagens apresentam um notável grau de semelhança fenotípica e possuem um conjunto de marcadores que representam indicadores confiáveis de identidade dessas células (LENSCH & DALEY, 2007; THE INTERNATIONAL STEM CELL INITIATIVE, 2007; INTERNATIONAL STEM CELL FORUM).

O Fórum Internacional de Células-tronco também criou o *International Stem Cell Banking Initiative* (ISCBI), que visa criar uma rede global de bancos de células-tronco e promover as boas práticas nos estudos e compartilhamento das células (INTERNATIONAL STEM CELL FORUM). Os testes recomendados pelo Fórum Internacional de Células-tronco são requisitos para uma linhagem de CTEh fazer parte do ISCBI. Os testes realizados são: análise de pluripotência, de diferenciação *in vitro* e *in vivo*, análise cariotípica, determinação da identidade celular por DNA (*deoxyribonucleic acid/ ácido desoxirribonucleico*), *fingerprinting*

e análise de HLA (*human leukocyte antigen/ antígeno leucocitário humano*), além de testes microbiológicos (CROOK *et al.*, 2010).

Os testes de pluripotência frequentemente empregados são a análise da morfologia das colônias de CTEh, a atividade da fosfatase alcalina, imunofluorescência dos marcadores de pluripotência e RT-PCR (*Reverse transcription polymerase chain reaction*) dos genes de pluripotência. Em relação à avaliação da morfologia das colônias no estado indiferenciado, é importante observar que as colônias apresentam diferenças dependendo do substrato. Quando se usa MEFs, podem-se observar duas morfologias distintas com relação à densidade das MEFs. No caso de estarem em alta densidade de células por cm², as colônias tendem a ser densas e com bordas bem delimitadas. Em baixa densidade, as colônias tendem a ser achatadas e as células individuais apresentam nucléolo proeminente. Porém, em ambos os casos, as colônias apresentam-se indiferenciadas e com todas as características de CTEh (BRESAGEN, 2004). A morfologia das colônias com diferenciação espontânea é claramente diferente, podendo apresentar várias formas. Essas colônias podem perder a borda delimitada e as células na parte interna das colônias podem empilhar-se tornando a região interna grossa e opaca (AMÉEN *et al.*, 2008).

Outra avaliação de pluripotência importante é a atividade da fosfatase alcalina. Apesar da ocorrência de diferentes tipos dessa enzima em vários tecidos, a fosfatase alcalina placentária humana (*human placental alkaline phosphatase - hPLAP*) é relacionada à pluripotência. A detecção é possível devido à capacidade da enzima em alterar a conformação de um reagente colorimétrico de um estado solúvel para um precipitado (MARTÍ *et al.*, 2013). Considerando os marcadores de pluripotência das CTEh, o projeto *The International Stem Cell Initiative* documentou a expressão uniforme dos vários antígenos de superfície (SSEA3, SSEA4, TRA-1-60 e TRA-1-81, entre outros) e um elevado grau de correlação entre a expressão dos genes *NANOG*, *OCT4*, *TDGF*, *DNMT3B*, *GABRB3* e *GDF3* nas linhagens estudadas. Os autores concluem que esses antígenos e genes representam um conjunto básico de indicadores que definem as CTEh (LENSCH & DALEY, 2007). No entanto, ainda não se chegou a um consenso quanto a um painel de marcadores fenotípicos definitivos (BROSNAN *et al.*, 2013). De acordo com o projeto *The International Stem Cells Initiative*, para definir os marcadores fenotípicos universais para as CTEh, seria necessário padronizar as condições de culturas entre os laboratórios. Dessa forma, definir e entender profundamente a caracterização dessas células permanece sendo um grande desafio.

O passo seguinte à confirmação do estado pluripotente de uma linhagem são os testes de diferenciação celular, realizados por meio da avaliação do potencial de diferenciação das

CTEh em células derivadas das três camadas germinativas do embrião. Esses testes podem ser realizados *in vitro* ou *in vivo*. Atualmente, há debates em relação à necessidade de usar o teste *in vivo*, além do *in vitro*, para confirmação da capacidade de diferenciação das células, pois evitaria o sacrifício de camundongos (MARTÍ *et al.*, 2013). Para o teste de diferenciação *in vitro*, são colocadas CTEh em placas não aderentes, na ausência de inibidores de diferenciação. Assim, as células tendem a se agregar e diferenciar, resultando na formação de corpos embrioides. Durante a diferenciação, os corpos embrioides sofrem uma transformação morfológica e passam a expressar marcadores celulares das três camadas germinativas embrionárias, embora, não apresentem padrões de organogênese (ITSKOVITZ-ELDOR *et al.*, 2000). O teste *in vivo*, por sua vez, consiste em injetar as CTEh em camundongos imunodeficientes. As células deverão se proliferar e diferenciar no local onde foram injetadas e, ao final do processo, originar um teratoma. O teratoma é um tumor com diversos tecidos derivados das três camadas germinativas. Após a formação do teratoma, as diferenciações devem ser confirmadas por imunofluorescência para os marcadores de diferenciação (MARTÍ *et al.*, 2013).

A análise do cariótipo é necessária para avaliar a integridade do conjunto cromossômico dessas células. A técnica baseia-se na paralisação da divisão das células na fase de metáfase. Existem análises mais complexas como cariótipo espectral (*Spectral karyotyping* - SKY), que utiliza corantes fluorescentes que se ligam a regiões específicas do cromossomo, aumentando muito a resolução e detecção de anormalidades (MARTÍ *et al.*, 2013). O DNA *fingerprinting* e a análise isotípica de HLA são técnicas necessárias para identificar a linhagem. O DNA *fingerprinting* é baseado na amplificação por PCR (*Polymerase Chain Reaction*) de regiões altamente polimórficas com repetições curtas de sequências de DNA que, após a eletroforese, apresentam um padrão de bandas que identifica a linhagem. Outra forma de identificação é por análise isotípica de HLA, no qual os locos HLA-A, HLA-B, HLA-DRB1 e HLA-DQB1 são tipados por PCR (MARTÍ *et al.*, 2013). Por fim, devem ser realizados testes microbiológicos para identificação da presença de bactérias, fungos e leveduras, além de PCR para micoplasma, para garantir que a linhagem esteja livre de contaminantes (MARTÍ *et al.*, 2013).

2.3 A linhagem H9

Em um levantamento quanto as linhagens estabelecidas de CTEh e seu uso, constatou-se que as linhagens H9 e H1, ambas derivadas pelo Instituto de Pesquisa *WiCell*, são as mais utilizadas em estudos, predominando a linhagem H9 (LÖSER *et al.*, 2010). Provavelmente, esse fato ocorre devido a essas linhagens terem sido as primeiras a serem derivadas em 1998 por Thomson e colaboradores. A linhagem H9 foi derivada a partir de embriões doados por clínicas de fertilização *in vitro*. Os embriões foram cultivados até o estágio de blastocisto e, posteriormente, as massas celulares internas foram isoladas. Ao final do processo, cinco linhagens foram estabelecidas: H1, H7, H9, H13, e H14 (THOMSON, 1998).

A linhagem H9 apresentou um cariótipo normal XX, que se manteve normal em cultivo durante oito meses e submetida durante esse período a 32 passagens, sendo, ao final, criopreservada (THOMSON *et al.*, 1998). Em 2010 essa linhagem foi novamente aprovada pelo *National Institutes of Health* (Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos) para continuar sendo usada (WICELL, 2010).

2.4 Desvantagens do uso de células-tronco embrionárias humanas

Apesar de todas as vantagens relacionadas ao uso de CTEh para o desenvolvimento de protocolos de pesquisas, deve-se considerar que o uso dessas células também apresenta algumas desvantagens. Uma desvantagem do uso das CTEh seria a baixa taxa de derivação obtida a partir do uso de embriões humanos, sendo necessário um grande número de embriões para a obtenção de uma única linhagem (BRYJA *et al.*, 2006). Também pode ser considerado como desvantagem o alto custo para a manutenção dessas células, uma vez que os meios de cultura e suplementos utilizados em geral são obtidos em pequena quantidade e alto valor. Em relação ao uso em protocolos clínicos, uma desvantagem das CTEh é o potencial de rejeição dos transplantes. Apesar das CTEh expressarem baixos níveis de antígenos HLA de classe I, conhecido como complexo principal de histocompatibilidade (*major histocompatibility complex class I* - MHC-I), com a diferenciação há um aumento moderado na expressão do MHC-I. Esse aumento pode ser progressivo, ativando o sistema imunológico do receptor por meio do reconhecimento aloantigênio. Como alternativa para contornar o problema da rejeição, autores sugerem a criação de um banco de linhagens de CTEh com representação da diversidade genética da população para haver isotipos correspondentes com os pacientes (DRUKKER *et al.*, 2002; YANG *et al.*, 2013).

Outra grande repercussão que emergiu com o estabelecimento das CTEh foram os debates éticos quanto à obtenção das linhagens. Essa questão deve-se ao fato que no processo de derivação das CTEh o embrião é destruído. Esse debate levou muitos países a normalizarem ou proibirem as pesquisas com CTEh. No Brasil, há um grande número de embriões congelados que certamente serão descartados. O descarte desses embriões, ao invés de usá-los nas pesquisas, seria um desperdício (PRANKE, 2004).

O Brasil regulamentou o uso de embriões humanos com a Lei de Biossegurança (Lei 11.105), de 24 de março de 2005. A lei permite a utilização de CTEh obtidas de embriões produzidos por fecundação *in vitro* e não transferidos para o útero para fins de pesquisa e terapia, desde que os embriões sejam inviáveis ou estejam congelados há três anos ou mais. Entende-se como “embriões inviáveis” aqueles com alterações morfológicas, com ausência de clivagem e comprometimento de seu desenvolvimento, o que impede a sua transferência para o útero materno. Também é exigido o consentimento dos genitores e a submissão dos projetos à Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP). A lei proíbe a clonagem, incluindo, assim, o uso dos embriões na clonagem terapêutica (BRASIL, LEI Nº 11.105, 2005). Assim, foi permitido ao Brasil estabelecer suas próprias linhagens de CTEh representantes da sua população, passo fundamental para consolidação desses estudos no país.

2.5 Alternativas ao uso das células-tronco embrionárias humanas

Recentemente, novas formas de obtenção de linhagens de células-tronco pluripotentes surgiram como alternativas para contornar os problemas éticos e de histocompatibilidade das CTEh. No entanto, até o momento, nenhuma concilia plenamente as questões éticas e os interesses científicos (VENTURA-JUNCÁ *et al.*, 2009). As células-tronco pluripotentes induzidas (CTPi, do inglês *iPS cells - induced pluripotent somatic cells* ou *induced pluripotent stem cells*) e as CTEh partenogênicas são duas dessas novas estratégias estudadas.

As CTPi são derivadas a partir de células somáticas reprogramadas com indutores que são conhecidamente responsáveis pela manutenção da pluripotência e auto-renovação, tornando as células indiferenciadas, como as CTEh. Os indutores de pluripotência em células humanas são os fatores de transcrição Oct3/4, Sox2, Nanog, e Lin28. Esses genes são inseridos nas células somáticas por meio de transdução retroviral ou via plasmídeos por eletroporação (YU *et al.*, 2007). As CTPi apresentam os marcadores de superfície e expressão de genes que caracterizam as CTE e são capazes de diferenciar em derivados das três camadas germinativas.

As principais vantagens desse método são o contorno das questões éticas e a possibilidade de realizar transplantes autólogos, não havendo risco de rejeição. Entre os pontos contra destacam-se a falta de clareza na determinação do papel de cada fator nos mecanismos de reprogramação celular, o não conhecimento das alterações epigenéticas, a falta de protocolos padronizados, a utilização de transduções retrovirais, conhecidos por causarem mutagênese de inserção, bem como o risco de ativação de oncogenes pelos fatores de transcrição. Além disso, há as possíveis consequências negativas na eficácia e a segurança do CTPi em relação as alterações genético-epigenéticas que as células somáticas iniciais do genoma podem ter sofrido durante a vida do doador, devido a vários fatores, como idade, predisposição e estilo de vida. Também não é possível utilizá-las para o tratamento de doenças genéticas no caso de transplantes autólogos (PAPPAS & YANG, 2008).

As CTEh partenogênicas são geradas a partir de um método, *in vitro*, que mimetiza a onda de cálcio induzida pela fertilização do espermatozoide no oócito desencadeando as clivagens e o desenvolvimento embrionário (BREVINI *et al.*, 2008). As CTE partenogênicas são capazes de diferenciar em derivados das três camadas germinativas como as CTE. Como embriões partenogênicos em mamíferos rapidamente morrem depois de implantados no útero, sendo inviáveis, não há controvérsias éticas. Além disso, eles são homocigotos, expressando apenas um conjunto de antígenos de histocompatibilidade e, assim, há menor risco de rejeição nos futuros transplantes (LIN *et al.*, 2007). Por outro lado, estudos indicam que a falta dos genes paternos pode gerar instabilidade intrínseca nos controles de proliferação e diferenciação, gerando tumores. Outra desvantagem da homocigose é devido à expressão de genes recessivos prejudiciais (BREVINI *et al.*, 2011).

Apesar do desenvolvimento de novas técnicas que buscam substituir as CTEh para o uso na medicina regenerativa, todas são muito recentes e necessitam de mais estudos. Já as CTEh, apesar dos questionamentos éticos e problemas referentes a histocompatibilidade, são estudadas há mais tempo e suas técnicas estão sendo cada vez mais aperfeiçoadas na busca por uma padronização em relação a segurança e qualidade das culturas (PAPPAS & YANG, 2008). As CTEh continuam sendo uma importante ferramenta de pesquisa e até mesmo necessárias como modelo comparativo em relação as novas técnicas, além de permanecer sendo consideradas promissoras para o desenvolvimento de terapias regenerativas (ANDREWS, 2009).

3 Objetivos

3.1 Objetivo geral

- Caracterizar a linhagem H9 de células-tronco embrionárias humanas para estudos futuros em experimentos com biomateriais produzidos com nanotecnologia visando à medicina regenerativa.

3.2 Objetivos específicos

- Verificar a morfologia da colônia e a atividade da fosfatase alcalina.
- Confirmar a normalidade cromossômica após estabelecimento do cultivo.
- Avaliar a presença e expressão de marcadores de pluripotência para CTEh.
- Analisar o potencial de diferenciação nas três camadas germinativas *in vitro*.

4 Materiais e métodos

4.1 Obtenção da linhagem H9 de células-tronco embrionárias humanas

A linhagem a H9 foi obtida por meio do Laboratório Nacional de Células-tronco Embrionárias (LaNCE) da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). O LaNCE foi criado em 2009 com o objetivo de produzir e distribuir CTEh certificadamente livres de micoplasma e anormalidades cromossômicas.

4.2 Aspectos éticos

O projeto para o trabalho com a linhagem H9 foi submetido e aprovado pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP). Número de identificação: 15812.

4.3 Preparo da placa de cultura com gelatina

As placas de cultura de 100 mm de diâmetro utilizadas para o cultivo das MEFs foram pré-tratadas com solução aquosa de gelatina a 0,1% (w/v), para garantir maior aderência celular.

Foram adicionados 3 mL de solução de gelatina em cada placa, após 20 minutos a gelatina foi retirada e as placas foram armazenadas para uso posterior.

4.4 Preparo da placa com fibroblastos embrionários murinos

No dia anterior ao repique ou descongelamento das CTEh, foram preparadas placas de cultivo com MEFs pré-tratadas com mitomicina C (Sigma). Para tal, 6×10^5 MEFs, criopreservados foram descongelados em banho-maria e seu conteúdo passado para um tubo cônico de 15 mL contendo 9 mL de meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*), baixa glicose, suplementado com 10% de soro fetal bovino e 50 U/mL de penicilina e 50 µg/mL de estreptomicina (Sigma). Posteriormente, as células foram centrifugadas a 300 x g por 7 minutos e o sobrenadante desprezado. O *pellet* foi resuspendido em 5 mL de meio de cultura, sendo adicionado a uma placa de cultura de 100 mm de diâmetro pré-tratada com solução aquosa de gelatina. Ao final, a placa foi incubada a 37°C em incubadora celular contendo 5% de CO₂ na atmosfera e 95% umidade.

4.5 Descongelamento e cultivo das células-tronco embrionárias humanas

O tubo com CTEh criopreservado foi descongelado em banho-maria e seu conteúdo foi transferido para um tubo cônico de 15 mL com 9 mL de meio de cultivo de CTEh, composto de DMEM/F-12 suplementado com 20% *Knockout Serum Replacement* (KSR), 50 U/mL de penicilina e 50 µg/mL de estreptomicina (Sigma), 0,1 mM de aminoácidos não-essenciais (Sigma), 50 µM de β-mercaptoetanol (Sigma) e 2 mM de Glutamax (Life Technologies).

Posteriormente, as células foram centrifugadas a 300 x g por 7 minutos e o sobrenadante desprezado. O *pellet* foi resuspendido em 5 mL de meio de cultura, sendo adicionado a uma placa de cultura de 100 mm de diâmetro contendo uma monocamada de MEFs. Ao final, foi adicionado ao meio 10 mM de Y-27632 (Santa Cruz Biotechnology) e FGF2 (4 ng/mL) (Invitrogen) e, então, colocada na incubadora celular. Após 48 horas, o meio foi trocado e seguiu-se a troca diária de meio até o momento em que se formaram colônias aptas para a primeira passagem. O FGF2 foi adicionado a cada troca de meio ou passagem, e o Y-27632 somente após as passagens. As demais passagens foram feitas a cada 6 ou 7 dias.

4.6 Remoção das colônias em diferenciação e passagem das culturas

As passagens foram realizadas de forma mecânica, utilizando uma agulha de insulina para cortar as colônias e MEFs de maneira a formar um “xadrez” na placa. Após, o meio de cultura foi removido e adicionado 3 mL de tampão fosfato-salino (*phosphate-buffered saline* - PBS), incubando por 3 minutos à 37°C. Passado o tempo, o PBS foi removido e adicionado meio de cultura novo previamente aquecido. Os fragmentos de colônias foram desprendidos da placa com o auxílio de uma espátula (*Cell Lifter, TPP*). Após isso, os agregados de células foram passados para novas placas previamente prontas com MEFs e meio de cultura, sendo incubadas novamente na incubadora celular. Para o início dos testes de caracterização, além de ser cultivadas quantidades suficientes de CTEh, foram utilizadas culturas que atingiram pelo menos a quinta passagem. Quando regiões de diferenciação na cultura de CTEh foram observadas ao microscópio, essas porções foram removidas mecanicamente antes da realização das passagens. O procedimento ocorria sob visualização no microscópio, com a remoção das regiões em diferenciação usando uma seringa de insulina com agulha.

4.7 Ensaio de contagem cromossômica

Para o ensaio de contagem cromossômica, removeu-se o meio de cultivo da placa contendo as células a serem tratadas e foi adicionado o meio DMEM/F-12, KSR (20%), FGF2 (4 ng/mL), Demecolcine (0,5 µg/mL), sendo incubado por 1 hora. Após, o meio foi removido e a placa lavada com tampão PBS. Posteriormente, foram adicionados 4 mL de solução de tripsina-EDTA (0,25%), deixando-se atuar por 5 minutos. Depois, a tripsina foi neutralizada com meio contendo soro e as células foram centrifugadas por 5 minutos a 300 x g. Em seguida, o sobrenadante foi removido e o *pellet* ressuspensionado em 1,5 mL de PBS. No próximo passo, foram adicionados 10 mL de solução hipotônica de 0,075 M de KCl, deixando-se atuar por 15 minutos. As células foram centrifugadas por 5 minutos a 300 x g e, ao final, o sobrenadante foi removido, deixando um resíduo de 1 mL junto com o *pellet*. A fixação foi feita adicionando 10 mL de metanol/ácido acético glacial (3:1) seguido de centrifugação por 5 minutos a 300 x g, depois desprezando o sobrenadante, mas deixando 1 mL junto com o *pellet*. Esse passo foi repetido mais 2 vezes e, ao final da segunda vez, o *pellet* foi ressuspensionado em 1 mL do fixador deixado no tubo. Então, adicionaram-se 3 gotas da solução, que foi ressuspensionada, em cada lâmina, a uma distância de 10 cm, deixando-se secar a temperatura ambiente e posteriormente

corando-se com Giemsa. Ao final, as lâminas foram levadas ao microscópio ótico e 20 conjuntos cromossômicos em metáfases foram contados.

4.8 Ensaio da atividade da fosfatase alcalina

A atividade da enzima fosfatase alcalina foi realizada com o kit de detecção *Alkaline Phosphatase Live Stain* (Life Technologies), seguindo as instruções do fabricante. O procedimento iniciou com a remoção do meio de cultura da placa seguido de três lavagens com DMEM/F-12 previamente aquecido. O substrato do kit foi diluído em DMEM/F-12 e a solução incubada por 30 minutos em incubadora celular. Ao final da incubação, o meio foi removido e lavado duas vezes com DMEM-F12, deixando-se atuar por 5 minutos em cada lavagem. Ao final, adicionou-se DMEM/F-12 novo à placa e a amostra foi analisada em microscópio de fluorescência.

4.9 Ensaio de imunofluorescência para os marcadores de pluripotência

Para a identificação dos marcadores celulares típicos das CTEh, OCT4, SOX2 e TRA-1-81, foram feitas imunofluorescências com os anticorpos primários específicos. Para o Sox2 foi utilizado o anticorpo anti-Sox2 (Chemicon) e o anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado com Alexa Fluor® 568 (Life Technologies). Para o Oct4 foi utilizado o anticorpo anti-Oct4 (Santa Cruz Biotechnology) e o secundário anti-IgG de camundongo conjugado com Alexa Fluor® 488 (Life Technologies). Já para o TRA-1-81, foi utilizado o anticorpo monoclonal de camundongo conjugado com Alexa Fluor® 647 (BD Biosciences).

O procedimento iniciou-se com a passagem das CTEh da placa de cultura de 100 mm para placa de 24 poços, sendo cultivadas até a formação de colônias em número e qualidade suficientes para o ensaio. Um dos poços foi utilizado como controle negativo. Após a remoção do meio de cultura e lavagem com tampão PBS, as células foram fixadas com paraformaldeído a 4% por 20 minutos, sendo realizadas mais duas lavagens com PBS. Em seguida, as células foram bloqueadas e permeabilizadas em solução de PBS contendo 1% de albumina sérica bovina e 0,1% de Triton X-100 por 30 minutos. Após esse procedimento, os anticorpos primários foram diluídos (1:200) na solução de bloqueio e permeabilização e adicionados aos poços da placa, sendo incubados à temperatura ambiente por 1 hora. Não foram colocados anticorpos primários no controle negativo. Após, todos os poços foram lavados 3 vezes com PBS e incubados com anticorpos secundários (1:300) conjugados com fluorocromos por 30

minutos a temperatura ambiente e ao abrigo da luz. No caso da imunofluorescência do TRA-1-81, o anticorpo secundário não foi adicionado. Em seguida, a marcação do núcleo celular foi realizada com adição de solução de DAPI em todos os poços, deixando por 3 minutos, seguido de 3 lavagens com PBS. Ao final, foi adicionado PBS nos poços e foram analisados em microscópio de fluorescência.

4.10 Expressão dos genes de pluripotência

Através do RT-PCR foi verificada a expressão dos genes *OCT4*, *SOX2*, *REX1* e *NANOG* para a confirmação do fenótipo das CTEh. A β -actina (*ACTB*) foi utilizada como controle endógeno e foi feito um controle negativo por reação.

4.10.1 Extração de RNA

Para a extração de RNA (*ribonucleic acid/* ácido ribonucleico), uma amostra de CTEh cultivada foi separada em um microtubo após o procedimento de passagem. O microtubo com a amostra foi centrifugado por 5 minutos a 300 x g e o sobrenadante foi removido. Após foi adicionado 1 mL de reagente TRIzol (Life Technologies), para a lise das células. Após, foi adicionado 0,2 mL de clorofórmio, seguido de agitação e incubação a temperatura ambiente por 3 minutos. Em seguida, o microtubo foi centrifugado a 12.000 x g por 15 minutos a 4°C e o sobrenadante passado para um novo microtubo. No passo seguinte, foram adicionados 0,5 mL de isopropanol e incubados a temperatura ambiente por 10 minutos, seguido de centrifugação a 12.000 x g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspensionado em 1 mL de etanol (75%), sendo, posteriormente, centrifugado a 7500 x g por 5 minutos a 4°C. Ao final, o sobrenadante foi descartado e foi deixado o *pellet* secar por 10-15 minutos a temperatura ambiente. O *pellet* foi ressuspensionado em 30 μ L de água tratada com dietilpirocabonato (DEPC). A quantificação do RNA extraído foi feita utilizando o espectrofotômetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific).

4.10.2 Síntese de cDNA

Para a síntese de cDNA foi realizada a reação com o kit *M-MLV Reverse Transcriptase* (M-MLV RT) (Invitrogen). Na reação foi colocado em microtubo um volume total de 20 μL , contendo 3 μg de RNA extraído, 150 ng de iniciadores (*primers*) randômicos, 10mM dNTPs (*deoxynucleotide triphosphates*/ desoxinucleotídeo trifosfatos) e água ultrapura completando o volume. A mistura foi aquecida a 65°C por 5 minutos e, rapidamente, resfriada em gelo. Em seguida foram adicionados 4 μL de tampão (*5x First-Strand Buffer*) e 2 μL 0,1 M de DTT (*Dithiothreitol*). O microtubo foi, então, incubado a 37°C por 2 minutos. Ao final, foram adicionadas 200 unidades de M-MLV RT, sendo incubado a 25°C por 10 minutos e depois a 37°C por 50 minutos. A reação foi inativada elevando a temperatura a 70°C por 15 minutos.

4.10.3 Reação em cadeia da polimerase

Para a reação de PCR foi utilizado 1 μL de cDNA, 1 μL de iniciadores senso, 1 μL de iniciadores anti-senso e 17 μL de SuperMix (Invitrogen) contendo 22 mM de Tris-HCl (pH 8,4), 55 mM de KCl, 1,65 mM de MgCl_2 , 220 μM de cada dNTP e 22 U/mL de *Taq* DNA polimerase recombinante. A sequência dos iniciadores dos genes de pluripotência, temperatura de anelamento e tamanho dos fragmentos amplificados estão apresentados no Quadro 1.

A reação foi realizada no termociclador Veriti (Life Technologies), iniciando o processo a 80°C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos com os passos de 95°C por 15 segundos, 60°C por 15 segundos, 72°C por 20 segundo e último passo 72°C por 7 minutos.

Ao final, as amostras amplificadas foram aplicadas em gel de agarose 2% com gel *red* (Biotium), sendo visualizadas sob luz ultravioleta. O tamanho dos fragmentos foi confirmado por meio da comparação com marcador de peso molecular.

Quadro 1: Iniciadores utilizados na RT-PCR.

Genes	Sentido	Sequência dos Iniciadores	Temp. Anelamento (°C)	Fragmento (pares de base)
OCT 4	Senso	GTGGAGGAAGCTGACAACAA	58	223
	Anti-senso	GCCGGTTACAGAACCACACT	60	
SOX 2	Senso	ACGGCAGCTACAGCATGA	59	104
	Anti-senso	GACGTCGTAGCGGTGCAT	60	
NANOG	Senso	AATACCTCAGCCTCCAGCAG	59	175
	Anti-senso	CTGGGGTAGGTAGGTGCTGA	60	
REX 1	Senso	TGGAGCCTGTGTGAACAGAA	59	162
	Anti-senso	GCTCATGTTTTCTGCCTGT	59	
ACTB	Senso	AGCACAGAGCCTCGCCTTT	60	77
	Anti-senso	CGGCGATATCATCATCCAT	60	

4.11 Diferenciação *in vitro* das células-tronco embrionárias humanas

Para determinação de pluripotência, foi realizada a indução da formação de corpos embrioides e sua posterior caracterização. Para a formação dos corpos embrioides, as CTEh foram repicadas conforme descrito anteriormente e cultivadas em placas de baixa aderência (placas não tratadas) no mesmo meio usado para manutenção, porém na ausência de FGF2. Após 4 dias em suspensão, os corpos embrioides foram coletados e transferidos para placas cobertas com gelatina (0,1%), e cultivados por mais 10 dias, com trocas de meio a cada 2-3 dias. Ao final do protocolo as células foram lavadas com PBS e fixadas em paraformaldeído 4% por 30 min. Em seguida, foram submetidas à imunofluorescência, como descrito anteriormente para detecção de marcadores que correspondam às três camadas germinativas. Foi utilizado anticorpo primário policlonal de coelho anti-Sox17 (Millipore) para marcação de células derivadas da endoderme.

Para marcação de células derivadas da camada ectoderme, utilizou-se o anticorpo primário monoclonal de camundongo anti-nestina (Santa Cruz Biotechnology) e anticorpo primário monoclonal de camundongo anti- β -III-tubulina (Millipore). Para marcação de células derivadas da mesoderme, foi utilizado anticorpo primário monoclonal de camundongo anti- α -actina (músculo liso) (Invitrogen). O anticorpo secundário utilizado em conjunto com os anticorpos anti-nestina e anti- β -III-tubulina foi o anti-IgG de camundongo conjugado com Alexa Fluor® 488 (Life Technologies). O anticorpo secundário utilizado junto com o anti-

Sox17 e anti-actina (músculo liso) foi o anti-IgG de coelho conjugado com Alexa Fluor® 568 (Life Technologies).

A diferenciação em células de origem mesodérmica foi feita sem a formação de corpos embrioides, apenas retirando-se o FGF2 do meio e mantendo as células em cultura por 20 dias com trocas de meio a cada 3-4 dias. Ao final, a cultura foi lavada com PBS e corada com *Oil red O* para revelação dos vacúolos lipídicos.

5 Resultados

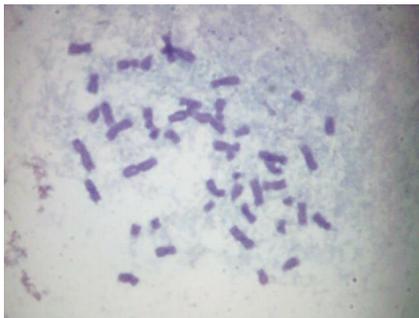
Foram realizados três descongelamentos da linhagem H9, até que fosse possível o estabelecimento da cultura. Para isso, no terceiro descongelamento foi utilizado como suplemento no meio de cultura o composto denominado Y-27632. Esse composto é um inibidor da enzima Rho quinase, a qual está envolvida na cascata de ativação do processo de apoptose (KUROSAWA, 2012). Dessa forma, foi possível evitar que um grande número de células entrasse em apoptose após o descongelamento, o que possibilitou o sucesso no cultivo. Após aproximadamente 2-3 dias de cultivo, foi possível observar a organização das CTEh em colônias (Figura 1).

Figura 1 - Morfologia característica de uma colônia indiferenciada de células-tronco embrionárias humanas cultivada sobre monocamada de MEFs. Aumento de 100x.



Com o controle das passagens, evitou-se que as colônias crescessem a ponto de formarem uma monocamada, visto que a confluência poderia promover a diferenciação celular. Após 6 a 7 passagens, realizou-se a contagem cromossômica para verificação do número $2n$ nas CTEh (Figura 2).

Figura 2 - Cromossomos em metáfase com $2n=46$. Aumento de 1000x.



Com a observação da morfologia característica de CTEh foi realizado o teste para verificação da atividade da fosfatase alcalina (Figura 3), assim como a imunofluorescência para os marcadores de pluripotência OCT-4, SOX-2 e -TRA-1-81 (Figura 4). Também foi realizado a RT-PCR, através do qual foi verificada a expressão dos seguintes genes de pluripotência: *OCT4*, *SOX2*, *NANOG* e *REX1* (Figura 5).

Figura 3 - Marcação positiva da atividade da fosfatase alcalina. Aumento de 200x.

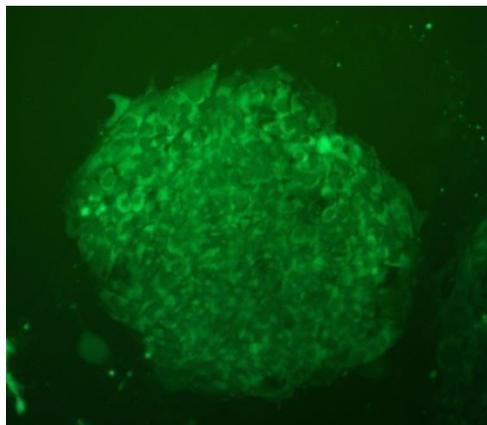


Figura 4 - Imunofluorescência dos marcadores de pluripotência nas colônias de células-tronco embrionárias humanas utilizando anticorpos anti-OCT-4 (B), -SOX-2 (D) e -TRA-1-81 (F). Núcleos marcados com DAPI (A, C, E). Aumento de 200x.

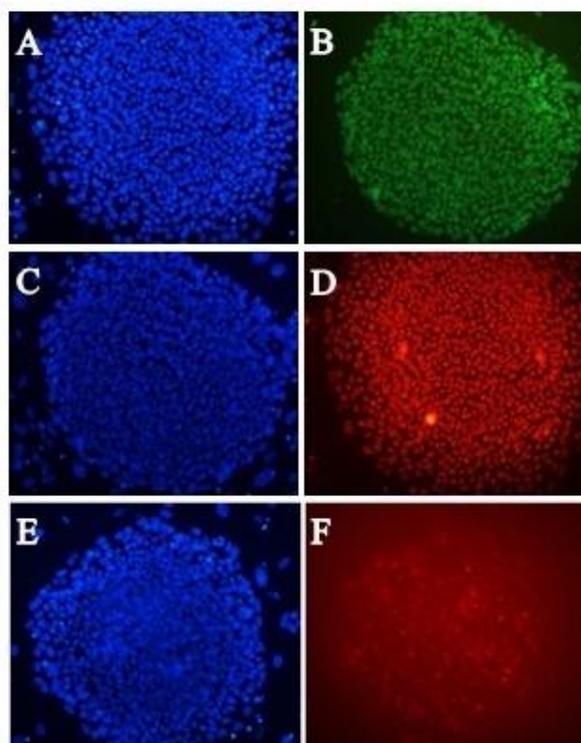
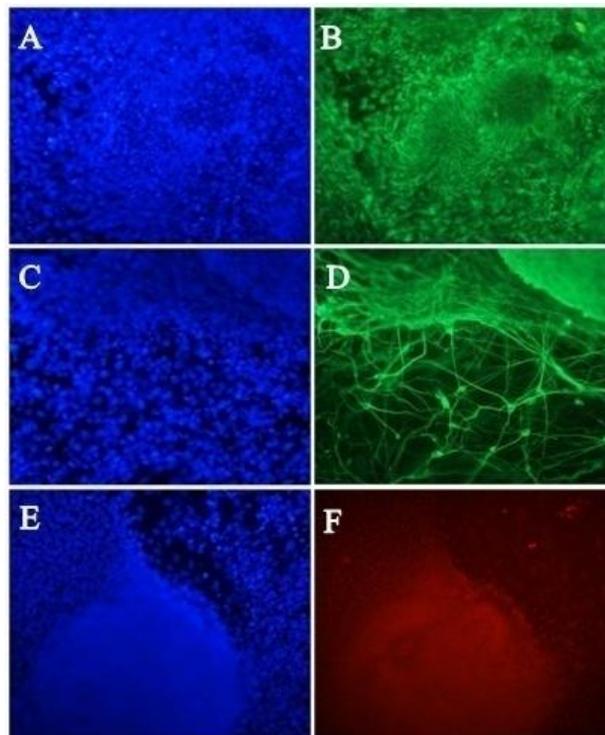


Figura 5 - Expressão dos genes de pluripotência de células-tronco embrionárias humanas por RT-PCR.

Genes	+	-
OCT4		
NANOG		
SOX2		
REX1		
ACTB		

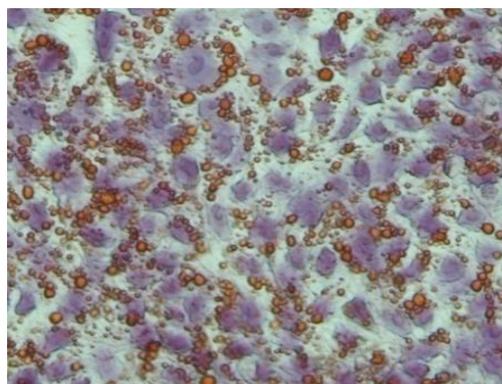
Também foram realizadas análises de capacidade de diferenciação celular, através da formação de corpos embrióides, para identificação de marcadores referentes às camadas endoderme e ectoderme. Avaliou-se a marcação por imunofluorescência para nestina (ectoderme) e β -III-tubulina (ectoderme) e SOX-17 (endoderme) (Figura 6).

Figura 6 - Imunofluorescência dos marcadores de diferenciação das células-tronco embrionárias humanas. Marcação anti-nestina (B) e anti- β -III-tubulina (D) e anti-SOX-17 (F). Os núcleos foram marcados com DAPI (A, C, E). Aumento de 200x.



Realizou-se, também, a análise referente a capacidade de diferenciação das CTEs em células da camada da mesoderme, sem a formação de corpos embrióides. Nesse caso, foi possível visualizar vacúolos lipídicos característicos de adipócitos, após 20 dias em diferenciação (Figura 7).

Figura 7 - Diferenciação espontânea das células-tronco embrionárias humanas sem formação dos corpos embrióides. Presença de vacúolos lipídicos no interior do citoplasma com coloração amarelo-alaranjada indicando diferenciação em adipócitos. Aumento de 200x



6 Discussão

As linhagens de CTEh estabelecidas ao redor do mundo possuem grande diversidade alélica. Esse achado difere do que é observado em relação às linhagens de CTE murinas, as quais são derivadas de embriões provenientes de animais endogâmicos, possuindo baixa diversidade genética. Tal fato faz com que as linhagens de CTEh apresentem-se com grande variação na expressão de suas características de pluripotência (CARPENTER *et al.*, 2003; ABEYTA *et al.*, 2004). Além disso, as condições de cultura também possuem grande influência na expressão das características de pluripotência. (ALLEGRUCCI & YOUNG, 2007). Apesar das diferenças entre as linhagens e as metodologias de cultivo, há características que são intrínsecas das CTEh. Sendo assim, comparar os resultados obtidos com outros trabalhos semelhantes a fim de corroborar o observado reforça a validação da linhagem H9 para futuros estudos na medicina regenerativa. Para isso, foi analisada a morfologia das colônias de CTEh formadas, a normalidade cromossômica, os marcadores de pluripotência, bem como a capacidade de diferenciação das CTEh por meio da formação de derivados das três camadas germinativas.

Já foi relatado que se pode observar frequentemente diferenciação espontânea nos cultivos das linhagens de CTEh (REUBINOFF *et al.*, 2000). Tal fato foi corroborado no presente estudo, uma vez que durante a primeira semana de cultivo da linhagem H9 foi possível observar a ocorrência de diferenciação em algumas colônias nas placas de cultura. Entretanto, após a quinta passagem observou-se que a frequência de diferenciação espontânea diminuía consideravelmente.

As colônias de CTEh cultivadas sobre MEFs apresentaram-se com morfologia arredondada, aspecto denso e com bordas bem definidas (Figura 1), semelhante ao relatado por Thomson e colaboradores (1998), quanto a morfologia das colônias da linhagem H9, e Reubinoff e colaboradores (2000), em relação a morfologia das colônias das linhagens HES-1 e HES-2, no qual observou-se que as colônias apresentam forma bem compactadas sobre MEFs e morfologia semelhante às células encontradas no presente trabalho (Figura 1). Essas características demonstram o estado indiferenciado das CTEh, uma vez que o achatamento das bordas das colônias indica processo de diferenciação (ALVAREZ *et al.*, 2012). A análise da morfologia foi importante para a manutenção do cultivo, pois possibilitou a remoção das colônias que apresentavam indício de diferenciação.

A análise citogenética é outro passo de grande importância para garantir a qualidade de uma linhagem, visto que em culturas de linhagens somáticas com elevado número de passagens

é comum a ocorrência de mudanças espontâneas no cariótipo (MOORE *et al.*, 1956). Além disso, tem-se relatado com frequência a trissomia do cromossomo 12 e 17 em linhagens de CTEh, sendo que essas anormalidades cromossômicas retêm a expressão dos marcadores de pluripotência (DRAPER *et al.*, 2004). Rosler e colaboradores (2004) afirmam que a trissomia do cromossomo 20 é a aneuploidia prevalente na linhagem H9. Na contagem cromossômica realizada, 80% das metáfases apresentaram-se euploides normais, como representado na figura 2. Deve-se observar que para a metodologia empregada, considera-se que as culturas possuem normalidade cromossômica quando mais de 70% das metáfases analisadas apresentam número cromossômico normal (NAGY *et al.*, 2009).

Após a confirmação da morfologia como característica de CTEh e da citogenética, foi executada a avaliação da atividade da fosfatase alcalina. Esse teste é rápido e eficaz para indicação de pluripotência e frequentemente usado na caracterização das linhagens (XU, 2009). Foi possível observar a coloração verde fluorescente indicando a presença da atividade da enzima, como é esperado para as CTEh (Figura 3).

A identificação de marcadores específicos de pluripotência das CTEh foi avaliada por imunofluorescência e RT-PCR. A análise por imunofluorescência permite monitorar a expressão dos marcadores das CTEh junto à morfologia da colônia, exibindo a localização do antígeno, tornando possível conferir se a colônia de CTEh apresenta o referido antígeno. A RT-PCR, por sua vez, é um método alternativo de confirmação da presença dos marcadores de CTEh que também pode ser usado para reforçar a ocorrência de um marcador (XU, 2009).

A expressão dos glicolipídios SSEA (SSEA-3, SSEA-4) e dos antígenos de sulfato de queratano TRA (TRA-1-60, TRA-1-81) e fatores de transcrição OCT4 e NANOG são comuns entre as linhagens CTEh, sendo considerados os critérios gerais para a caracterização dessas células (HOFFMAN & CARPENTER, 2005). Recentemente, estudos apontam que o grau de expressão de um grupo de quatro fatores de transcrição de primeiro nível (OCT4, SOX2, KLF4, e NANOG) é responsável por manter a célula em estágio pluripotente. Esses quatro fatores coordenam a expressão de fatores de transcrição secundários (DPP3 ou STELLA, REX1 ou ZNF42, e GBX2), marcadores de superfície celular (SSEA4) e atividade de enzimas (fosfatase alcalina e telomerase) características de células pluripotentes (ALLEGRUCCI & YOUNG, 2007; PERA & TAM, 2010). No entanto, ainda não se pode considerar esse grupo de marcadores como definitivos para caracterizar uma linhagem como pluripotente, pois o Oct4 e o Nanog não são exclusivos de CTEh, sendo o primeiro também encontrado em células germinativas e o segundo em tecidos diferenciados adultos (HART *et al.*, 2004; NIWA *et al.*,

2000). Além disso, ambos possuem pseudogenes, o que dificulta o desenho de iniciadores específicos que não amplifiquem os pseudogenes junto (PAIN *et al.*, 2005).

Apesar das dúvidas levantadas quanto a especificidade do Oct4 e do Nanog para caracterização das CTEh, eles são considerados marcadores chave, devido a sua participação na manutenção da pluripotência ou início do processo de diferenciação (AVERY *et al.*, 2006). Carpenter e colaboradores (2003) afirmaram que os marcadores de superfície Tra-1-81, junto com o SSEA-4, SSEA-3 e o Tra-1-60 estão no quadro de marcadores de superfície similares entre as diversas linhagens de CTEh caracterizadas. No teste dos marcadores de pluripotência para a linhagem H9, os antígenos Oct4, Sox2, TRA-1-81 foram positivos por imunofluorescência, demonstrados pela coloração verde no primeiro e vermelho nos dois últimos (Figura 4). A RT-PCR mostrou a expressão dos genes de pluripotência *NANOG*, *SOX2*, *OCT4*, *REX1* e do controle endógeno *ACTB* (β -actina) (Figura 5). Os resultados da análise da morfologia, da atividade da fosfatase alcalina, da imunofluorescência e do RT-PCR confirmaram que a linhagem cultivada encontra-se no estado indiferenciado e apresenta os marcadores característicos de CTEh.

Outro teste de grande importância para validação das células é demonstrar a capacidade das CTEh em gerar derivados das três camadas germinativas. Para as CTEh o teste definitivo é a formação de corpos embrioides *in vitro* ou teratoma *in vivo* (HOFFMAN & CARPENTER, 2005; ALLEGRUCCI & YOUNG, 2007). Como outros trabalhos já demonstraram a capacidade da linhagem H9 em gerar teratomas e há grupos que acreditam que apenas o teste *in vitro* é suficiente para validar as células, optou-se por realizar apenas a formação dos corpos embrioides. Além disso, tal metodologia é mais simples e não é necessário utilizar animais (THOMSON *et al.*, 1998; MARTÍ *et al.*, 2013), visto que testes experimentais cada vez mais têm sido desencorajados.

As CTEh formam corpos embrioides *in vitro* na ausência do supressor de diferenciação FGF2. Durante a diferenciação, os genes de pluripotência apresentam diminuição de sua expressão, enquanto os genes de diferenciação passam a ser expressos (FGF5, TGF β , b-III-tubulina, nestina e outros) (ALVAREZ *et al.*, 2012). No caso do teste realizado com a linhagem H9, após o processo de diferenciação, foi feita a marcação com nestina e b-III-tubulina para ectoderme, Sox 17 para endoderme e actina de músculo liso para mesoderme. O resultado foi positivo para os marcadores de ectoderme, marcados em verde, e endoderme, marcados em vermelho (Figura 6). Porém, para a diferenciação celular em células da camada mesodérmica, o resultado não foi o esperado, apresentando uma coloração fraca. Esses resultados corroboram com estudos anteriores, como o de Brimble e colaboradores (2004), os quais demonstraram que

o processo de diferenciação que ocorre nos corpos embrioides gera diferentes fenótipos. Além disso, esses autores afirmam que esse processo é concomitante com a redução da expressão dos genes Oct4 e Nanog, reforçando a importância desses dois marcadores na determinação do estado pluripotente.

O teste da diferenciação espontânea em presença de MEFs e ausência de FGF2 comprovou a capacidade da linhagem H9 em se diferenciar em derivados da mesoderme, visto que ao final dos 20 dias de diferenciação, vacúolos lipídicos foram visíveis nas células em cultura por avaliação microscópica. Esses vacúolos foram corados com *Oil red O* para confirmação, apresentando coloração amarelo-alaranjada (Figura 7). Devido a presença dos vacúolos lipídicos, constatou-se que as CTEh se diferenciaram, entre outros, em adipócitos, logo, um tipo celular derivado da mesoderme. Estudos semelhantes foram realizados por Thomson (1998) e Reubinoff (2000) e seus colaboradores, os quais detectaram nos sobrenadantes das culturas a presença de α -fetoproteína e β -subunidade da gonadotrofina coriônica humana por imunoenensaio. A α -fetoproteína é um produto derivado da endoderme e a β -subunidade da gonadotrofina coriônica é derivada do trofoblasto. Reubinoff e colaboradores (2000) afirmaram que culturas com alta densidade de células e longo período de cultivo promovem a diferenciação das CTEh em tipos celulares de diversos tecidos. Esse achado corrobora com o resultado apresentado no presente estudo em relação a diferenciação espontânea em presença de MEFs. Ao longo dos 20 dias de cultivo, sendo realizada apenas a troca do meio, as células estavam em grande densidade na placa e sofreram alta diferenciação. Além disso, adipócitos foram identificados, os quais são derivados da mesoderme, comprovando o potencial da diferenciação espontânea em derivados das camadas germinativas.

Concluiu-se, então, que os testes demonstraram que a linhagem de CTE humanas utilizada possui as características determinantes para sua classificação como tal. A próxima etapa será a adaptação dessas células para o cultivo na ausência de MEFs, utilizando Matrigel como substrato, além de estudos futuros de interação dessas células com biomateriais, visando a medicina regenerativa.

7 Perspectivas para o uso das células-tronco embrionárias humanas

O potencial terapêutico do uso das CTE tem se mostrado promissor em estudos realizados em modelos animais por meio do desenvolvimento de protocolos para tratamento de diferentes doenças. Porém, a maioria desses estudos está na fase pré-clínica e há apenas alguns

ensaios clínicos com derivados de CTEh realizados (KLIMANSKAYA *et al.*, 2008). Ainda não se sabe quais tipos de células cumprirão a promessa terapêutica e serão as mais adequadas para o tratamento de quais doenças. Além disto, os benefícios que as CTEh poderão trazer vão além do terapêutico, sendo um promissor modelo de pesquisa para estudos de diferenciação celular, desenvolvimento embrionário, farmacológicos, câncer, entre outros (PEREIRA, 2008).

A aplicação terapêutica dos derivados de CTEh ainda está muito longe. Porém os avanços no desenvolvimento dos protocolos para o uso terapêutico da CTEh e a busca por equivalentes são constantes. No Laboratório de Hematologia e Células-tronco da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, primeiro da região sul a cultivar CTEh, pretende-se utilizar as células da linhagem H9 para experimentos com biomateriais produzidos por nanotecnologia visando à medicina regenerativa.

8 Referências

ABEYTA, M.; CLARK, A.; RODRIGUEZ, R.; BODNAR, M.; REIJO PERA, R.; FIRPO, M. Unique gene expression signatures of independently-derived human embryonic stem cell lines. **Hum Mol Gen**, v. 13, n. 6, p. 601-608, 2004.

ALLEGRUCCI, C. & YOUNG, L. Differences between human embryonic stem cell lines. **Hum Reprod Update**, v. 13, n. 2, p. 103-120, 2007.

ALVAREZ, C.; GARCIA-LAVANDEIRA, M.; GARCIA-RENDUELES, M.; DIAZ-RODRIGUEZ, E.; GARCIA-RENDUELES, A.; PEREZ-ROMERO, S.; VILA, T.; RODRIGUES, J.; LEAR, P; BRAVO, S. Defining stem cell types: Understanding the therapeutic potential of ESCs, ASCs, and iPS cells. **J Mol Endocrinol**, v. 49, p. R89–R111, 2012.

AMÉEN, C.; STREHL, R.; BJÖRQUIST, P.; LINDAHL, A.; HYLLNER, J.; SARTIPY, P. Human embryonic stem cells: Current Technologies and emerging industrial applications. **Crit Rev Oncol Hematol**, v. 65, p. 54–80, 2008.

ANDREWS, P. An international perspective on the National Institute of Health guidelines for funding human embryonic stem cell research in the United States. **Stem Cell Devel**, v. 18, n. 8, p. 1113-1114, 2009.

AVERY, S.; INNISS, K.; MOORE, H. The regulation of self-renewal in human embryonic stem cells. **Stem Cell Dev**, v. 15, p. 729–740, 2006.

BEATTIE, G.; LOPEZ, A.; BUCAY, N.; HINTON, A.; FIRPO, M.; KING, C.; HAYEK, A. Activin a maintains pluripotency of human embryonic stem cells in the absence of feeder layers. **Stem Cells**, v. 23, p. 489-495, 2005.

BOROJEVIC, R. Terapias celulares e bioengenharia. **Gaz Med Bahia**, v. 78, p. 42-46, 2008.

BRASIL, Lei nº 11.105, 2005. Secretaria Especial dos Direitos Humanos, Conselho Nacional dos Direitos da Pessoa Portadora de Deficiência. Resolução Nº 28, de 15 de Junho de 2004. Projeto de Lei da Câmara dos Deputados nº 09/2004, Nº 118, terça-feira, 22 de junho de 2004. ISSN 1677-7042.

BRESAGEN. Human embryonic stem cell protocols. 2004, disponível em: <http://stemcells.nih.gov/staticresources/research/protocols/BresaGen_hESC_manual_2.1.pdf>, acesso em: 08/11/2013.

BREVINI, T. & GANDOLFI, F. Parthenotes as a source of embryonic stem cells. **Cell Prolif**, v. 41, n. 1, p. 20-30, 2008.

BREVINI, T.; PENNAROSSA, G.; EGUILEOR, M.; TETTAMANTI, G.; RAGNI, G.; PAFFONI, A.; GANDOLFI, F. Parthenogenetic cell lines: An unstable equilibrium between pluripotency and malignant transformation. **Curr Pharm Biotechnol**, v. 12, p. 206-212, 2011.

BRIMBLE, S.; ZENG, X.; WEILER, D.; LUO, Y.; LIU, Y.; LYONS, I.; FREED, W.; ROBINS, A.; RAO, M.; SCHULZ, T. Karyotypic stability, genotyping, differentiation, feeder-free maintenance, and gene expression sampling in three human embryonic stem cell lines derived prior to August 9, 2001. **Stem Cell Dev**, v. 13, p. 585–596, 2004.

BROSNAN, K.; WANT, A.; COOPMAN, K.; HEWITT, C. Multiparameter flow cytometry for the characterization of human embryonic stem cells. **Biotechnol Lett**, v. 35, p. 55–65, 2013.

BRYJA, V.; BONILLA, S.; CAJANEK, L.; PARISH, C.; SCHWARTZ, C.; LUO, Y.; RAO, M.; ARENAS, E. An efficient method for the derivation of mouse embryonic stem cells. **Stem Cells**, v. 24, p. 844–849, 2006.

BYDLOWSKI, S.; DEBES, A.; DUARTE, S.; JANZ, F.; CAVAGLIERI, R.; MASELLI, L. Células-tronco do líquido amniótico. **Rev Bras Hematol Hemoter**, v. 31, p. 45-52, 2009.

CARPENTER, M.; ROSLER, E.; RAO, M. Characterization and differentiation of human embryonic stem cells. **Cloning Stem Cells**, v. 5, p. 79-88, 2003.

CROOK, J.; HEI, D.; STACEY, G. International Stem Cell Banking Initiative: raising standards to bank on. **In Vitro Cell Dev Biol Anim**, v. 46, p. 169–172, 2010.

DRAPER, J.; SMITH, K.; GOKHALE, P.; MOORE, H.; MALTBY, E.; JOHNSON, J.; MEISNER, L.; ZWAKA, T.; THOMSON, J.; ANDREWS, P. Recurrent gain of chromosomes 17q and 12 in cultured human embryonic stem cells. **Nat Biotechnol**, v. 22, p. 53–54, 2004.

DRUKKER, M.; KATZ, G.; URBACH, A.; SCHULDINER, M.; MARKEL, G.; ITSKOVITZ-ELDOR, J.; REUBINOFF, B.; MANDELBOIM, O.; BENVENISTY, N. Characterization of the expression of MHC proteins in human embryonic stem cells. **PNAS**, v. 99, p. 9864 –9869, 2002.

EVANS, M. & KAUFMAN, M. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. **Nature**, v. 292, p. 154-156, 1981.

FRAGA, A.; SUKOYAN, M.; RAJAN, P.; BRAGA, D.; IACONELLI, A.; FRANCO, J.; BORGES, E.; PEREIRA, L. Establishment of a brazilian line of human embryonic stem cells in defined medium: Implications for cell therapy in an ethnically diverse population. **Cell Transplant**, v. 20, p. 431–440, 2011.

GIATSIDIS, G.; DALLA VENEZIA, E.; BASSETTO, F. The role of gene therapy in regenerative surgery: Updated insights. **Plast Reconstr Surg**, v. 131, n. 6, p. 1425-35, 2013.

HART, A.; HARTLEY, L.; IBRAHIM, M.; ROBB, L. Identification, cloning and expression analysis of the pluripotency promoting Nanog genes in mouse and human. **Dev Dyn**, v. 230, p. 187–198, 2004.

HOFFMAN, L. & CARPENTER, M. Characterization and culture of human embryonic stem cells. **Nat Biotechnol**, v.23, p. 699-708, 2005.

INCA, disponível em <http://www1.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=2469>, acessado em: 08/12/2013.

INTERNATIONAL STEM CELL FORUM, disponível em <<http://www.stem-cell-forum.net/>>, acessado em: 06/11/2013.

ITSKOVITZ-ELDOR, J.; SCHULDINER, M.; KARSENTI, D.; EDEN, A.; YANUKA, O.; AMIT, M.; SOREQ, H.; BENVENISTY, N. Differentiation of human embryonic stem cells into embryoid bodies comprising the three embryonic germ layers. **Mol Med**, v. 6, p. 88–95, 2000.

KLIMANSKAYA, I.; ROSENTHAL, N.; LANZA, R. Derive and conquer: Sourcing and differentiating stem cells for therapeutic applications. **Nat Rev Drug Discov**, v.7, p. 131-142, 2008.

KUROSAWA, H. Application of Rho-associated protein kinase (ROCK) inhibitor to human pluripotent stem cells. **J Biosci Bioeng**, v. 114, p. 577-581, 2012.

LASLETT, A.; FILIPCZYK, A.; PERA, M. Characterization and culture of human embryonic stem cells. **Trends Cardiovasc Med**, v. 13, p. 295–301, 2003.

LENSCH, M. & DALEY, G. Human embryonic stem cells flock together. **Nat Biotech**, v. 25, p. 748-750, 2007.

LIN, G.; YANG, Q.; ZHOU, X.; GU, Y.; YUAN, D.; LI, W.; LIU, G.; LIU, T.; LU, G. A highly homozygous and parthenogenetic human embryonic stem cell line derived from a one pronuclear oocyte following in vitro fertilization procedure. **Cell Res**, v. 17, p. 999-1007, 2007.

LÖSER, P.; SCHIRM, J.; GUHR, A.; WOBUS, A.; SKURTZ, A. Human embryonic stem cell lines and their use in international research. **Stem Cells**, v. 28, p. 240–246, 2010.

MARTÍ, M.; MULERO L.; PARDO, C.; MORERA, C.; CARRIÓ, M.; LARICCHIA-ROBBIO, L.; ESTEBAN, C.; BELMONTE, J. Characterization of pluripotent stem cells. **Nat Prot**, v. 8, n. 2, p. 223-253, 2013.

MARTIN, G. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. **PNAS**, v. 78, n. 12, p. 7634-7638, 1981.

MOORE, A.; SOUTHAM, C.; STERNBERG, S. Neoplastic changes developing in epithelial cell lines derived from normal persons, **Science**, v. 124, p. 127-129, 1956.

NAGY, A.; GERTSENSTEIN, M.; VINTERSTEN, K.; BEHRINGER, R. Counting chromosomes in embryonic stem (ES) cells. **Cold Spring Harb Protoc**, v. 6, pdb. prot 4404, 2009.

NIWA, H.; MIYAZAKI, J.; SMITH, A. Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. **Nat Genet**, v. 24, p. 372-376, 2000.

PAIN, D.; CHIRN, G.; STRASSEL, C.; KEMP, D. Multiple retro pseudogenes from pluripotent cell-specific gene expression indicates a potential signature for novel gene identification. **J Biol Chem**, v. 280, p. 6265-6268, 2005.

PAPPAS, J. & YANG, P. Human ESC vs. iPSC - pros and cons. **J of Cardiovasc Trans Res**, v. 1, p. 96-99, 2008.

PERA, M. & TAM, P. Extrinsic regulation of pluripotent stem cells. **Nature**, v. 465, p. 713-720, 2010.

PLATT, J. & CASCALHO, M. New and old technologies for organ replacement. **Curr Opin Organ Transplant**, v. 18, p. 179-185, 2013.

PRANKE, P. A importância de discutir o uso de células tronco embrionárias para fins terapêuticos. **Ciênc Cult**, v. 56, p. 33-38, 2004.

RAYMEN, E. & WILLIAMS, D. Concise review: Mind the gap: Challenges in characterizing and quantifying cell and tissue based therapies for clinical translation. **Stem Cells**, v. 28, p. 996-1004, 2010.

REUBINOFF, B.; PERA, M.; FONG, C.; TROUNSON, A.; BONGSO, A. Embryonic stem cell lines from human blastocysts: Somatic differentiation *in vitro*. **Nat Biotechnol**, v. 18, p. 399-404, 2000.

ROSLER, E.; FISK, G.; ARES, X.; IRVING, J.; MIURA, T.; RAO, M.; CARPENTER, M. Long-term culture of human embryonic stem cells in feeder-free conditions. **Dev Dyn**, v. 229, p. 259-274, 2004.

SYKOVA, E. & FOROSTYAK, S. Stem cells in regenerative medicine. **Laser Ther**, v. 22, p. 87-92, 2013.

THE INTERNATIONAL STEM CELL INITIATIVE. Characterization of human embryonic stem cell lines by the International Stem Cell Initiative. **Nat Biotechnol**, v. 25, p. 803-816, 2007.

VOGEL, G. Capturing the promise of youth. **Science**, v. 286, p. 2238-2243, 1999.

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

VENTURA-JUNCA, P.; SANTOS, M. & LARRAÍN, J. Proposals for embryonic stem cell production without destroying human embryos: Scientific and bioethical challenges. **Acta Bioeth**, v. 15, p. 222-233, 2009.

VILLA-DIAZ, L.; ROSS, A.; LAHANN, J.; KREBSBACH, P. Concise review: The evolution of human pluripotent stem cell culture: From feeder cells to synthetic coatings. **Stem Cells**, v. 31, p. 1-7, 2013.

WICELL, 2010, disponível em: <<http://www.wicell.org/home/stem-cell-services/quality-control-testing/quality-control-testing.cmsx>>, acesso em: 09/11/2013.

YANG, H.; MOON, S.; CHOI, Y.; PARK, S.; LEE, Y.; LEE, H.; KIM, S.; CHUNG, H. Therapeutic efficacy of human embryonic stem cell derived endothelial cells in humanized mouse models harboring a human immune system. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 33, p. 2839- 2849, 2013.

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

XU, C. Human embryonic stem cells: Characterization and evaluation. In: LANZA, R. & KLIMANSKAYA, I. (Ed.). **Essential Stem Cell Methods**. Academic Press, p. 373-394, 2009.