DANIELE DOS SANTOS MARTINS

**Caracterização de células tronco germinativas caninas para o
tratamento da distrofia muscular do
Golden Retriever (GRMD)**

São Paulo
2006

DANIELE DOS SANTOS MARTINS

**Caracterização de células tronco germinativas caninas para o
tratamento da distrofia muscular do
Golden Retriever (GRMD)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências

Departamento:

Cirurgia

Área de Concentração:

Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientador:

Profa. Dra. Maria Angélica Miglino

Co-orientador:

Prof. Dr. Joaquim Mansano Garcia

São Paulo
2006

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.1821
FMVZ

Martins, Daniele dos Santos

Caracterização de células tronco germinativas caninas para o tratamento da distrofia muscular do Golden Retriever (GRMD) / Daniele dos Santos Martins. – São Paulo: D. S. Martins, 2006.

105 f. : il.

Tese (doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, 2006.

Programa de Pós-graduação: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Orientador: Profa. Dra. Maria Angélica Miglino.

Co-orientador: Prof. Dr. Joaquim Mansano Garcia.

1. Distrofia muscular animal. 2. Células germinativas. 3. Marcador celular. 4. Golden Retriever. 5. Embrião. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Caracterização de células tronco germinativas caninas para o tratamento da distrofia muscular do Golden Retriever (GRMD)", Protocolo nº469/2004, utilizando 16 (dezesesseis) cães, sob a responsabilidade da Profª Drª Maria Angélica Miglino, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado "ad referendum".

(We certify that the Research "Characterization of canine embryonic germ cells for the treatment of the muscular dystrophy in Golden Retriever (GRMD)" protocol number 469/2004, utilizing 16 (sixteen) dogs, under the responsibility of Prof. Dr. Maria Angélica Miglino, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the Faculty of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved "ad referendum", meeting.

São Paulo, 08 de dezembro de 2006

Prof. Dr. José Luis Bernardino Merusse
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: MARTINS, Daniele dos Santos

Título: Caracterização de células tronco germinativas caninas para o tratamento da distrofia muscular do Golden Retriever (GRMD)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Data: 20/12/06

Banca Examinadora

Prof.Dr. Marcia Ingrid D. B. B. Instituição: FM VZ USP
Assinatura: [assinatura] Julgamento: Aprovada

Prof.Dr. IRINA KERRIS Instituição: Instituto Butantan
Assinatura: [assinatura] Julgamento: aprovada

Prof.Dr. Camila I. Vannucchi Instituição: FMVZ - US
Assinatura: [assinatura] Julgamento: aprovada

Prof.Dr. Joãoquim Mariano Gars Instituição: UNESP - Jaboatão Sur.
Assinatura: [assinatura] Julgamento: Aprovada

Prof.Dr. Tatiana C. Santos Instituição: Autônomo
Assinatura: [assinatura] Julgamento: Aprovada

*“.... guardo na memória o precioso tempo desta
nossa convivência; de alegrias, expectativas,
surpresas, decepções, trabalho, estudo e lazer.*

*Talvez... por algum motivo, eu não tenha
respondido a tantos olhares pensativos, a tantos
questionamentos, ... mas gostaria de agradecer a
você, pela amizade, carinho, abraços e a tantas
lambidas...*

*Agradeço de coração a vocês meus queridos cães
por qualquer que tenha sido as manifestações de
amizade, acolhimento e conforto que recebi !!!”*

**Aos meninos: Atchim, Bacco, Franck, Ringo, Peter, Thor, Zeus,
Hércules, Winner, Oddy, Lucky, Panda, Bis, Galack, Choquito,
Lancy e as Loucas: Beth, Brenda, Vicky, Hope, Cher, Lady,
Kyra, Xenna, Atena, Winne, Clara, Bianca, Laka, Amandita e
Traquinas.**

*“Creio em ti ao ver
Que a chuva cai e faz
A flor nascer
Creio em ti pois sei
Que em quanto é noite aqui
É dia ali
Creio em ti porque
Me deste o riso e a dor*

*Me deste o Amor, do meu amor
Cada vez que neste mundo
Eu escutar
Alguém cantar
Alguém chorar
Direi então
Creio em ti “
(Altemar Dutra)*

À DEUS, pelo dom da vida.

"Quando vocês pensavam que eu não estava olhando, ouvi vocês fazendo uma oração e aprendi que existe um Deus com quem eu posso sempre falar e em quem eu posso sempre confiar.

Quando vocês pensavam que eu não estava olhando eu vi vocês dando seu tempo e seu dinheiro para ajudar as pessoas mais necessitadas e aprendi que aqueles que tem alguma coisa devem ajudar quem nada tem.

Quando vocês pensavam que eu não estava olhando eu senti vocês me dando um beijo de boa noite e me senti amado e seguro.

Quando vocês pensavam que eu não estava olhando eu vi vocês tomando conta da nossa casa e de todos nós e eu aprendi que nós temos que cuidar com carinho daquilo que temos e das pessoas que gostamos.

Quando vocês pensavam que eu não estava olhando eu vi lágrimas nos seus olhos e eu aprendi que, às vezes, acontecem coisas que nos machucam mas que não tem nenhum problema a gente chorar.

Quando vocês pensavam que eu não estava olhando foi quando eu aprendi a maior parte das lições de vida que eu precisava para ser uma pessoa boa e produtiva quando eu crescesse.

Quando vocês pensavam que eu não estava olhando, eu olhava para vocês e queria te dizer: Obrigado por todas as coisas que eu vi e aprendi quando vocês pensavam que eu não estava olhando!"

Aos meus pais amados Terezinha Fabrício dos Santos Martins e Antônio de Jesus Martins, e a minha querida irmã Daiene dos Santos Martins, Obrigado!

“Nada lhe posso dar que já não existam em você mesmo. Não posso abrir-lhe outro mundo de imagens, além daquele que há em sua própria alma. Nada lhe posso dar a não ser a oportunidade, o impulso, a chave. Eu o ajudarei a tornar visível o seu próprio mundo”.

(Hermann Hesse)

*À Carlos Eduardo Ambrósio, pelo amor,
companheirismo, paciência e felicidade, obrigado!*

*"CAMINHANTE, NÃO HÁ CAMINHO,
O CAMINHO É FEITO AO ANDAR"*

*Aos meus amigos Juliana Jarra, Juliana Passos,
Marta, Alida, Thais, Karla, Maran, André,
Marcelo, Matheus, Flávio e Augusto, pelo caminho
percorrido e ensinamentos aprendidos!*

“Amigos que chegam e que ficam, amigos que passam, amigos que retornam...

Novos e velhos amigos e os eternos...

Amigos eternos estão sempre em nossos corações.

Para estes não existem barreiras, distâncias e tempo...

Tempo... é sempre o presente

E o presente é vivo.”

*Aos meus amigos Adriana Caroprez
Morini, Sylvia Boncci, Antonio Chaves,
Cristiane V. Wenceslau e Marina Brollo,
pelo companheirismo, paciência e profundo
carinho!*

*“Aprender uma coisa significa entrar
em contato com um mundo do qual
não se tem a menor idéia”.*

*Ao Professor Joaquim Mansano Garcia, pelos
ensinamentos compartilhados.*

“Mestre é aquele que estende a mão, inicia o diálogo e encaminha para a aventura da vida. Não é o que ensina fórmulas, regras, raciocínios, mas o que questiona e desperta para a realidade . Não é aquele que dá de seu saber, mas aquele que faz germinar o saber do discípulo.”

À Maria Angélica Miglino, que através dos seus ensinamentos, estimula, comunica e enriquece o meu saber. Eu serei sempre seu discípulo.

Agradecimentos

À Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, pela oportunidade de realização deste trabalho.

Aos professores da FMVZ/USP: José Roberto Kfoury Jr., Paula Pappa de Carvalho, Francisco Hernandez Blasques, Antônio Coppi Maciel Ribeiro, Irvênia Prada e Pedro Primo Bombonato pelos ensinamentos e convivência;

À Naiara S. Zoccal, Lorivaldo Paes Landin Jr. e a Cristiane Ramires Ferreira, pela amizade, dedicação, companheirismo e ensinamentos; e a toda equipe do Departamento de Reprodução Animal da FCAV UNESP Jaboticabal, nos nomes de Simone, Felipe, Roberta, Max., Gabriel e Alexandre Wolf;

À Érika Branco, Rosa Maria Cabral, Guilherme Ferreira, Guilherme Buzon, Walkiria Ferreira, André Franciulli e Tatiana Carlesso dos Santos, grandes amigos que cultivei durante todo esse tempo, os quais possibilitaram a excelência deste projeto.

Aos funcionários do Departamento de Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da FMVZ/USP pela amizade e companheirismo, especialmente ao Cauê, Ronaldo, Sandra, Maicon, Jaqueline e Índio;

A pesquisadora Irina Kerkis, pelos grandes ensinamentos;

À todos os colegas de Pós-graduação pela troca de experiências e convivência;

À FAPESP e CAPES pelo apoio financeiro para o desenvolvimento desta pesquisa.

RESUMO

MARTINS, D. S. **Caracterização de células tronco germinativas caninas para o tratamento da distrofia muscular do Golden Retriever (GRMD)** [Characterization of canine embryonic germ cells for the treatment of the muscular dystrophy in Golden Retriever (GRMD)]. 2006. 105 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

A domesticação dos cães produziu-se simultaneamente em várias partes do globo o que ocasionou, o aparecimento por seleção de várias raças. Desde então o cão passou a ser utilizado para várias e diferentes tarefas, dentre elas acompanhar o homem, que usufruiu da sua conveniência, descobrindo que muitas vezes ambos podem sofrer dos mesmos males. Cães da raça Golden Retriever apresentam uma doença geneticamente degenerativa, homóloga a distrofia muscular de Duchenne (DMD) no homem; ambas doenças afetam o gene que produz a distrofina; uma proteína citoesquelética muscular. Uma possível forma de fornecer uma cópia normal do gene para os grupos musculares afetados de um indivíduo consiste no transplante de células tronco os quais podem ser obtidas de células embrionárias, células germinativas, células do sangue de cordão umbilical, células de medula óssea e células de sangue periférico. Estudos com modelos animais tem mostrado que transplante de células tronco fetais ou células tronco pluripotentes podem ter sucesso no tratamento de muitas doenças crônicas, sendo assim, objetivamos delinear uma linha de tratamento para distrofia muscular em cães da raça Golden Retriever, mediante caracterização e uso das células germinativas embrionárias para terapia celular. Foram utilizados 16 fêmeas sem raça definida (SRD), e as cadelas foram selecionadas a partir do exame citológico; as fêmeas foram inseminadas artificialmente, e após 30 dias de gestação os animais foram castrados pela técnica de ovário-salpingohisterectomia. Os embriões coletados possibilitaram a obtenção e estabelecimento de células tronco germinativas embrionárias, de fibroblastos fetais, de células musculares, os quais analisamos através de citometria de fluxo, interação no co-cultivo de células musculares caninas e células germinativas embrionárias e a imunopositividade das células na detecção de Oct-4. Os resultados nos possibilitam afirmar que em embriões com 22 dias de idade gestacional

a região paramesonéfrica apresenta-se indiferenciada, diferentemente do que encontramos com 24 dias de idade, no qual o rim primitivo apresenta-se visível diferenciado. As células tronco germinativas embrionárias apresentaram colônias compactas e com alta proliferação de células mononucleares indiferenciadas e que as células tronco germinativas embrionárias apresentaram como principal problema a manutenção das culturas por períodos significativos.

Palavras-chave: Distrofia muscular animal. Células germinativas. Marcador celular.

Golden Retriever. Embrião.

ABSTRACT

MARTINS, D. S. **Characterization of canine embryonic germ cells for the treatment of the muscular dystrophy in Golden Retriever (GRMD)** [Caracterização de células tronco germinativas caninas para o tratamento da distrofia muscular do Golden Retriever (GRMD)]. 2006. 105 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

The canine domesticity generated simultaneously in different parts of the World, that created, the begin of selection of many breeds. Since that time, dogs become to be used for different works, since follow men, that usufructed their convenience discovering most of the time that both are suffering the same ill. Dogs from the Golden Retriever breed presented a degenerative and genetically disease, homologous to Duchenne Muscular Dystrophy (DMD) in human, the dystrophin gene affection; a muscle cytoskeletal protein. A possibility way to supply a correct gene shape for the affected muscle could be from the stem cell therapy from embrionic stem cell, germ cells, umbilical cord blood cells, bone marrow and perific blood. Researches with animal models are showing sucess on the treatment with fetal stem cells or pluripotents ones in different types of cronic illness, then, we aimed a treatment of the Golden Retriever Muscular Dystrophy using embrionic germ cells meantime characterization and their use on cell therapy. Were uses 16 females crossbreed (SRD), bitches were selected by the vaginal cytology exams; females were artificially inseminated and after 30 days of pregnancy, the animals were histectomized. Embryos were collected to stabilish embrionic germ cells, canine fibroblasts, muscle cells, which were analysed by flow cytometre, co culture and OCT-4 detection. The results showed the paramesonephic region of embryos with 22 days of pregnancy presents undifferentiate cells(germ cells), what differs from embryos with 24 days, which primitive kidneys presented differentiated types of cells. Under culture conditions, these cells formed compact colonies with high proliferative potential, but without capacity of maintenance after 30 days.

Key words: Animal muscular dystrophy. Embryonic stem cells. Cell marker. Golden Retriever. Embryo.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	18
2 OBJETIVOS	21
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	22
3.1 Formação Embrionária.....	22
3.2 Distrofia Muscular.....	23
3.3 Células tronco embrionárias.....	25
3.4 Marcadores Celulares.....	29
3.5 Células Musculares.....	30
3.5.1 Co-culturas de células musculares e células tronco germinativas.....	34
3.6 Reação de imonohistoquímica para detecção de Oct-4.....	34
4 MATERAIS E MÉTODOS.....	38
4.1 Obtenção de células tronco germinativas embrionárias.....	40
4.2 Obtenção de fibroblastos fetais caninos.....	44
4.3. Citometria de Fluxo.....	46
4.4.1 Co-cultivo de células musculares caninas e células germinativas embrionárias.....	48
4.5 Protocolo imunohistoquímico para detecção de Oct-4.....	50
5 RESULTADOS PARCIAIS.....	52
5.1 Obtenção de fibroblastos fetais caninos.....	52
5.2 Obtenção de células tronco germinativas embrionárias.....	54
5.3. Citometria de Fluxo.....	59
5.4 Obtenção e cultivo de células musculares caninas.....	64
5.4.1 Co-culturas de células musculares e células tronco germinativas.....	72
5.5 Reação de imunohistoquímica para detecção de Oct-4.....	76
6 DISCUSSÃO.....	81
7 CONCLUSÕES.....	86
REFERÊNCIAS	88
ANEXOS.....	97

1 INTRODUÇÃO

A aproximadamente 7.000 anos A.C. o cão encontrava-se presente nos morros de conchas das praias do mar do norte, nas paredes pintadas do Tassil do Ajjer no Saara e nas rochas gravadas do lago Omega, na Rússia. A domesticação dos cães produziu-se simultaneamente em várias partes do globo durante o Mesolítico, o que ocasionou, no Neolítico, o aparecimento por seleção de várias raças. Desde então o cão passou a ser utilizado para várias e diferentes tarefas, dentre elas acompanhar o homem, que usufruiu da sua conveniência, descobrindo que muitas vezes ambos podem sofrer dos mesmos males.

Cães da raça Golden Retriever apresentam uma doença geneticamente degenerativa, homóloga a distrofia muscular de Duchenne (DMD) no homem; ambas doenças afetam o gene que produz a distrofina; uma proteína citoesquelética do músculo cardíaco liso e do músculo esquelético (HOFFMAN; BROWN; KUNKEL, 1987). A deficiência de distrofina é bem reportada em outros dois modelos animais de DMD: os camundongos MDX (distrofia muscular ligada ao cromossomo X), que apresentam uma longevidade normal (BULFIED; SILLER; WIGHT; MOORE, 1984), e os gatos HFMD (Distrofia muscular hipertrófica felina), os quais freqüentemente morrem por hipertrofia diafragmática causada por megaesôfago (CARPENTER, 1989; GASCHEN, 1994). A deficiência de distrofina em camundongos MDX e em felinos HFMD não causa significativa fraqueza muscular (HOFFMAN; GOROSPE, 1991), enquanto que em cães GRMD os sinais clínicos são semelhantes aos encontrados em humanos com DMD, ou seja, ambos freqüentemente morrem por falência respiratória e cardíaca (VALENTINE, 1988)

A distrofina faz parte de um complexo de proteínas responsáveis pela permeabilidade da membrana das células musculares. Tais proteínas pertencem ao complexo distrofina-glicoproteínas; uma deficiência primária em qualquer uma das proteínas do complexo acarreta uma desintegração de todo o complexo, com uma deficiência secundária dos outros componentes, provocando vários tipos diferentes de distrofias musculares (VAINZOF, 1996). As distrofias musculares progressivas (DMP) englobam um grupo de doenças caracterizadas por uma degeneração progressiva e irreversível da musculatura esquelética, dentre as mais graves e mais

comuns está a distrofia de Duchenne, que tem incidência de 1/3500 nascimentos masculinos (ZATZ, 2000). Várias tentativas terapêuticas já foram propostas ou testadas, incluindo a administração de diferentes drogas (CAMIRAND, 2001; EMERY, 1993) e o transplante de mioblastos, sem sucesso (CAMIRAND, 2001; PASSOS-BUENO, 1994; RAGOT et al., 1993).

Uma possível forma de fornecer uma cópia normal do gene para os grupos musculares afetados de um indivíduo consiste no transplante de células tronco (FUCHS; SEGRE, 2000) os quais podem ser obtidas de células embrionárias, células germinativas, células do sangue de cordão umbilical, células de medula óssea e células de sangue periférico. Entretanto, pesquisas realizadas em cães GRMD, nas quais poderiam ser utilizadas células obtidas do cordão umbilical de animais compatíveis, apresentaram como principal dificuldade o volume por ml de sangue e o tamanho do cordão umbilical de cães, o qual não possibilitou a extração de significativa quantidade de células tronco. O mesmo ocorreu com a obtenção de células tronco pela extração de sangue periférico, uma vez que as células tronco circulantes decrescem com o passar dos dias. Outro problema enfrentado encontra-se na extração de células tronco pela punção de medula óssea, pois as células encontradas neste tecido tendem a diferenciar-se em células do grupo sangüíneo e não em células miogênicas; portanto, as células embrionárias e as células germinativas são as principais fontes de obtenção de células tronco, por possuírem a capacidade de diferenciação em tecidos não pré estabelecidos, tendo como características essenciais: o formato, a auto regeneração e o potencial de indiferenciação mantido por longos períodos.

Cada célula do estágio de clivagem do embrião do mamífero possui potencial de desenvolvimento que contribui com células de linhagem embrionária ou extra-embrionária. Após a implantação, as células são progressivamente restritas à linhagens específicas, durante este tempo as células derivadas do epiblasto formam as células germinativas primordiais (LAWSON, 1994). Células embrionárias e células germinativas diferem-se por exigirem diferentes condições de isolamento e cultura, de habilidades e de períodos de vida "*in vitro*". Células embrionárias podem proliferar 300 populações e sobreviver por um ano em cultura, enquanto que células germinativas podem proliferar somente 80 populações (ODORICO; KAUFMAN; THOMSON, 2001; THOMSON et al., 1998).

Estudos com modelos animais tem mostrado que transplante de células tronco fetais ou células tronco pluripotentes podem ter sucesso no tratamento de muitas doenças crônicas, como Parkinson, diabetes, doenças da medula espinhal, degeneração das células de Purkinje, distrofia muscular de Duchenne, falência de fígado e coração e imperfeições osteogênicas (KIN, 2002; KOBAYASHI; SORIA et al., 2000; MCDONALD; HORWITZ, 1999).

Avaliando que no Brasil existem cerca de 80.000 crianças portadoras de distrofias musculares, e sabendo do sofrimento enfrentado pelos pais e pelos pacientes afetados, ao se depararem com tal fraqueza, o presente trabalho pretende contribuir com o tratamento desta enfermidade, mediante utilização da terapia celular pela obtenção de células tronco germinativas, uma vez que estas células são originadas do mesoderma embrionário e pré-dispostas a diferenciação em células musculares.

2 OBJETIVOS

Delinear uma linha de tratamento para distrofia muscular em cães da raça Golden Retriever, mediante caracterização e uso das células germinativas embrionárias para terapia celular.

2.1 Objetivos específicos

1. Identificar as células germinativas embrionárias.
2. Isolar as células germinativas embrionárias.
3. Testar diferentes métodos de cultivo ideal, para esta linhagem celular.
4. Obter método de diferenciação celular por fusão de células miogênicas.
5. Estabelecer marcadores para células germinativas.

3 REVISÃO DE LITERATURA

Para tornar a leitura mais compreensível, a literatura foi sistematizada nos seguintes tópicos: 3.1 Formação Embrionária, 3.2 Distrofia Muscular, 3.3 Células tronco embrionárias, 3.4 Marcadores Celulares, 3.5 Células Musculares, 3.5.1 Co-culturas de células musculares e células tronco germinativas, 3.6 Reação de imonohistoquímica para detecção de Oct-4 OCT-4.

3.1 Formação Embrionária

O evento de gestação canina parece ocorrer concomitantemente com o surgimento de pico preovulação do hormônio luteinizante. O intervalo desde a fertilização até o estágio de oito células foi de cinco dias após a inseminação artificial, antes da maturação do oócito e somente três dias, seguindo a inseminação após a maturação do oócito. Observações indicam que o cessar da migração e o final do posicionamento do embrião ocorrem entre o 16º e 20º dia, as vesículas do lúmen uterino são maiores que 1mm de diâmetro, no 17º-19º dia; vesículas são maiores que 2mm de diâmetro e alongadas de 3 a 6mm depois do 20º e 22º dia (CONCANNON; TSUTSUI; SHILLE, 2001).

Em relação às características externas do embrião do cão foi observado que aos 15 dias de gestação, o embrião apresenta perfeita característica primitiva. Aos 16 dias forma o tubo neural e a parte do segmento da espinha dorsal embrionária. Aos 17 dias de gestação, três primárias vesículas cerebrais estão presentes. O tubo neural está fechado a nível do oitavo segmento da espinha dorsal embrionária. A formação do alantóide ocorre aos 18 dias de gestação. Aos 20 dias, a flexura cefálica está presente e constata-se nesta data a presença do segundo e primeiro arco braquial, ocorrendo uma torção na região caudal do embrião. Aos 22 dias de

gestação o embrião apresenta “forma de C”, o âmnio está completo e o terceiro arco braquial se encontram presente. Forma-se a cavidade olfatória e os membros torácicos e pélvicos já estão formados (EVANS; SACK, 1973).

Os órgãos genitais apresentam-se compactos no mesoderma intermediário por volta de 4-5 semanas de gestação em humanos e 11-11,5 dias após o coito em camundongos (GASKELL, et al., 2004).

Os tecidos conjuntivos caracterizam-se, morfológicamente, por apresentar diversos tipos de células, separadas por abundante material intercelular sintetizado. O papel do conjuntivo na nutrição dos outros tecidos decorre de sua íntima associação com os vasos sanguíneos. Tanto os nutrientes trazidos pelo sangue quanto produtos de refugo do metabolismo, que são levados para os órgãos de eliminação, atravessam o conjuntivo que envolve os capilares. O aperfeiçoamento das técnicas de estudo revelou que os colágenos constituem uma família de proteínas, produzidas por diversos tipos de células, e que se distinguem na composição química, propriedades físicas, morfológicas, distribuição nos tecidos e funções (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1990).

O colágeno é sintetizado por diversos tipos celulares, como fibroblasto, osteoblasto, odontoblasto, condrócito e célula muscular lisa. O fibroblasto sintetiza colágeno, elastina e proteoglicanas, é a célula mais comum no tecido conjuntivo e a principal responsável pela formação das fibras e do material amorfo. Há dois tipos de extremos de fibroblasto, separados por tipos intermediários. A célula em intensa atividade sintética tem morfologia diferente do fibroblasto que já sintetizou muito e que se situa entre as fibras por ele fabricadas. O fibroblasto tem prolongamentos citoplasmáticos irregulares, seu núcleo é claro, grande, de formato ovóide, com cromatina fina e nucléolo evidente. O citoplasma é rico em retículo endoplasmático granular e o aparelho de Golgi é desenvolvido (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1990).

3.2 Distrofia Muscular

O termo distrofia muscular é amplamente usado para referir a doença primária do músculo esquelético, que resulta da degeneração progressiva limitada e

da fibrose das miofibras (BEGMAN, et al., 2002). A forma mais comum de distrofia muscular em cães e humanos é causada pela mutação do gene da distrofina. O gene da distrofina localiza-se no cromossomo “X” e por essa razão, a doença ocorre mais freqüentemente em machos (SHELTON, et al., 2001).

O gene da DMD é o maior dos genes conhecidos do genoma humano ocupando cerca de 2,5 Mb do DNA genômico no cromossomo “X”. A maioria das mutações conhecidas da DMD é devido a deleção do exon, o que provoca uma mudança no esqueleto da cadeia. A distrofina é uma grande proteína intracelular que forma a porção central do complexo protéico para a formação da membrana plasmática do músculo (CHILDERS et al., 2002; LEAVITT, 2000).

Esse tipo de distrofia manifesta-se na idade de três a cinco anos, através de dificuldades na atividade locomotora, hipertrofia das panturrilhas, baixa estatura, altos níveis de atividade da creatina quinase (LEAVITT, 2000; LIU et al., 2004) e em algumas crianças retardamento mental. (IWANNICZAK et al., 2000).

A incapacidade de andar manifesta-se por volta dos dez anos de idade, a morte ocorre entre trinta anos e se dá normalmente devido à falência respiratória ou do músculo cardíaco (LEAVITT, 2000; LIU et al., 2004).

A descoberta da proteína distrofina defeituosa na DMD permitiu a avaliação crítica e a utilização de modelos animais. As formas de distrofias musculares associadas ao “X”, onde há ausência de distrofina, foram descritas em camundongos *mdx*, cães GRMD e gatos. Camundongos com distrofia normalmente não manifestam sinais clínicos da doença. No caso do cão, a maioria dos sinais clínicos é semelhante aos sinais da DMD, os cães afetados possuem fraqueza progressiva e desenvolvimento de contraturas debilitantes (BERGMAN et al., 2002; BOGDANOVICH et al., 2004; CHILDERS et al., 2002; KORNEGAY et al., 1999; LIU et al., 2004; NGUYEN et al., 2002; SHELTON et al., 2001).

O diagnóstico de distrofia muscular nos cães se dá na primeira semana de vida baseado em provas genéticas e localização imunohistoquímica da distrofina (NGUYEN et al., 2005). Os sinais clínicos em cães progridem rapidamente entre três e seis meses de idade. DMD e GRMD são caracterizadas por uma progressiva evolução clínica que leva à morte prematura. Uma alta mortalidade é observada em GRMDs durante as duas primeiras semanas de vida, quando uma alta concentração de creatinino-quinase no soro permite um diagnóstico precoce da doença. Em neonatos GRMD o diafragma, músculos intercostais, língua e musculatura

esquelética do tronco, do pescoço e da porção proximal dos membros, são particularmente afetados (BERGMAN et al., 2002; BOGDANOVICH et al., 2004; CHILDERS et al., 2002; KORNEGAY et al., 1999; LIU et al., 2004; NGUYEN et al., 2002; SHELTON et al., 2001).

O conhecido ponto de mutação do gene da distrofia que leva a deleção do exon sete do mRNA da distrofina é quem desenvolve a fraqueza muscular progressiva no GRMD, fenotipicamente semelhante a DMD (LEAVITT, 2000).

A distrofia muscular de Golden Retriever (GRMD) é um excelente modelo para estudo da eficácia da terapia gênica em miopatias deficientes de distrofina, pelo fato deles serem muito similares entre os cães e os meninos com distrofia muscular de Duchenne (DMD) (HOWELL et al., 1997).

3.3 Células Tronco Embrionárias

Historicamente as células tronco tem sido estudadas na diferenciação de diferentes tipos celulares durante a embriologia e a organogênese, mas recentemente elas tem apresentado grande interesse pelo potencial de exploração clínica, no reparo e substituição de órgãos (HADJANTONAKIS; PAPAIONNOU, 2001). As células tronco são populações únicas com habilidade de auto regeneração e diferenciação. A vasta variedade de tecidos mamíferos adultos abriga células tronco, estas células tronco “adultas” são capazes de desenvolver somente um número limitado de células típicas, em contraste, as células tronco embrionárias, derivadas de embriões mamíferos, do estágio prematuro de blastocisto, tem a habilidade de diferenciar-se em qualquer célula do corpo (ODORICO; KAUFMAN; THOMSON, 2001).

A diferenciação do embrião de mamíferos comanda o desenvolvimento de duas linhagens celulares distintas – as células da massa celular interna (ICM) e as células do trofoectoderma. Células da ICM são pluripotentes e dão sustentação para todos os tecidos e para o feto, enquanto que as células do trofoectoderma são restritas quanto a estes potenciais (ROSSANT, 2001). O trofoectoderma é

comumente formador de lâminas da placenta, mas a massa celular interna retem a habilidade de formar qualquer célula do corpo. Células tronco embrionárias são derivadas do isolamento das massas celulares internas; células tronco germinativas são derivadas das células germinativas primordiais no estágio prematuro do embrião (THOMSON; ODORICO, 2000).

Inúmeros critérios são aplicados na definição de células tronco embrionárias e células tronco germinativas, incluindo a capacidade prolongada de auto regeneração “*in vitro*”, estágio de indiferenciação e retenção da pluripotência, a capacidade da forma diferenciada deriva de três lâminas germinativas embrionárias: ectoderma, mesoderma e endoderma (TURNPENNY, et al., 2003). No princípio do desenvolvimento todos os embriões de vertebrados são formados por 3 lâminas circulares, das quais derivam os tecidos e órgãos. A capa superficial externa é o ectoderma, que formará a epiderme, tecido nervoso e alguns tecidos conjuntivos e esqueléticos da cabeça. A capa mais profunda é o endoderma, que dará lugar ao revestimento interno dos aparelhos digestivo e respiratório e dos órgãos associados com a digestão; entre ambas capas se dispõe uma terceira, o mesoderma, formado por células dispostas que serão as precursoras de formação da maior parte dos tecidos musculares e esquelético, parte do sistema urogenital, assim como o coração e os vasos sanguíneos (NODEN; LAHUNTA, 1990).

No estágio de blastocisto, o embrião é composto pela massa celular interna e trofoectoderma. O trofoectoderma forma uma outra linha de placenta, mas a massa celular interna retem a habilidade de formar qualquer célula do corpo. Células tronco embrionárias (ESC) são derivadas do isolamento da massa celular interna, células tronco germinativas embrionárias são derivadas das células germinativas primordiais (PGCs). Comparando células tronco embrionárias de camundongos com células tronco germinativas de humanos e primatas, estas exibem uma morfologia achatada com as borda mais distintas entre células individuais. As células tronco germinativas humanas formam colônias mais compactas (THONSON; ODORICO, 2000).

Células tronco pluripotentes são capazes de produzir muitos, mas não todos, os tecidos do corpo. Elas são usualmente reconhecidas como células tronco embrionárias (ES) ou células tronco germinativas (Gs). Células tronco germinativas humanas são bem produzidas através da gônadas fetais e apresentam habilidade de diferenciação em vários tipos celulares “*in vitro*” e “*in vivo*” (TROUNSON, 2001).

As células germinativas primordiais humanas, que se formam no epiblasto durante a segunda semana, movem-se até a parede do saco vitelino. Durante a quarta semana essas células começam a migrar do saco vitelino para as gônadas em desenvolvimento, onde chegam ao final da quinta semana (SADLER, 2004)

Em secções transversais de testículos de ratos no início da diferenciação testicular (13 dpc) apresentam células embrionária germinativas distribuídas aleatoriamente na gônada primordial, consistindo em células mesenquimais e que com 15 dpc são observadas camadas de células de Sertoli apresentando membrana basal caracteristicamente clara (ROOIJ; DISSEL-EMILIANI, 1997).

Na embriogênese as células germinativas precursoras, encontram-se dentro da área de justaposição do rim (LAWSON; HAGE, 1994). Estas células atravessam da parte posterior para a linha primitiva e permanecem localizadas dentro do mesoderma extraembrionário na base do alantoide, onde as células germinativas são primeiramente reorganizadas ao redor dos 7 dias após o coito (GINSBURG; SNOW, MCLAREN, 1990).

As células germinativas são bem identificadas e rastreadas em numerosos embriões de vertebrados, a sua existência é demonstrada por processos experimentais, particularmente em anfíbios e embriões de aves. Porém em embriões de mamíferos, a existência das células germinativas é bem esclarecidas por alguns autores e negada por outros. Em embriões de mamíferos as células germinativas foram usualmente caracterizadas como células grandes e redondas (CHIQUELINE, 1954).

Ao nascimento células primordiais germinativas humanas podem ser reconhecidas nos cordões sexuais dos testículos como células grandes e claras, circundadas por células de sustentação (LANGMAN, 2006).

As colônias multicelulares de células “imortais” de camundongos são bem propagadas em cultura por muitas gerações sem perder o status de pluripotência. Linhagens de células tronco germinativas tem tido bastante sucesso de obtenção através das células tronco primordiais originária dos 8,0 a 8,5 dias após o coito (dpc), imediatamente após a migração para o lado das futuras gônadas e de 11,5 e 12,5 dpc, após a migração completada. Separadamente as células tronco germinativas embrionárias (PGCs) proliferaram em monocamada com a presença de LIF e bFGF, após oito dias de cultura primaria as PGCs formaram colônias multicelulares (DURCOVA-HILLS; AINSCOUGH; MCLAREN, 2001).

Ao dissecar um fragmento de embrião de camundongo com 250 a 300 células da base do alantóide, composto de células mesodérmicas alantoideanas e células germinativas primordiais circundadas por células mesodérmicas, as quais geram células isoladas, após tratamento com tripsina. Entretanto essas células isoladas provam ser morfologicamente indistinguíveis uma das outras e apenas identificadas através da amplificação do cDNA (SAITOU; BARTON; SURANI, 2002).

Em camundongos a formação de colônias de células tronco germinativas embrionárias, isoladas no 8.5 dpc. As multilinhagens de colônias são bem isoladas e retêm características das células tronco primordiais. O maior problema no desenvolvimento de linhagens germinativas em mamíferos é a inability de manutenção das culturas de células tronco embrionárias germinativas por períodos significativos (RESNICK; BIXLER; CHENG; DONAVAN, 1992).

As células podem ser cultivadas em meios bem definidos, aos quais são adicionados nutrientes, hormônios e fatores de crescimento. Anteriormente, era necessário adicionar ao meio de cultivo 5 a 10% de soro, que continha os fatores de crescimento específicos a proliferação das células. Acredita-se que nos organismos multicelulares esses fatores de crescimento específicos para os tecidos sejam muito importantes para a coordenação da proliferação celular. Nestes últimos anos foram isolados numerosos fatores de crescimento, entre as quais: (a) fator de crescimento nervoso (FCN), um polipeptídio necessário para o desenvolvimento de neurônios simpáticos; (b) fator de crescimento epidérmico (FCE), um polipeptídio de 6.000 daltons; (c) fator de crescimento de fibroblasto (FCF) que estimula as células de origem mesenquimática; (d) fator de crescimento derivado das plaquetas (FCdp) e (e) linfocinas (ROBERTIS; ROBERTIS Jr, 1993).

No protocolo para expansão de células tronco humanas devem constar Dulbecco's modified eagle's médium (DMEM) suplementado com 20% de soro fetal bovino (FBS), glutamina, β -mercaptoetanol e aminoácidos não essenciais (LASLETT; FILIPCZYK; PÊRA, 2003), ou ainda o meio para proliferação de células tronco embrionárias humanas deve ser composto de 80% KnockOut DMEM (de Dulbecco's modified eagle's médium), 1mM L-glutamina, 1mM de β -mercaptoetanol e 1% de aminoácidos não essenciais, suplementados com 20% de soro fetal bovino ou 20% de KnockOut SR (AMIT; CARPENTER; INOKUMA; CHIU, et al., 2000).

3.4 Marcadores Celulares

A citometria de fluxo permite a análise individual de um número significativo de células, e em um tempo relativamente curto. A marcação prévia de células com anticorpos monoclonais fluorescentes permite a avaliação de um tipo celular com uma determinada característica física e/ou química, mesmo em amostras heterogêneas de células. Isto tem possibilitado o emprego desta metodologia em várias áreas da hematologia, notadamente na onco-hematologia, na caracterização de marcadores relacionados a processos leucêmicos, em condições de diagnóstico, prognóstico e monitoração terapêutica, nos transplantes de medula óssea, principalmente na avaliação do conteúdo de células tronco e outras áreas (JAROSZESKI; RADCLIFF, 1999).

A avaliação do tamanho relativo das células (“Forward scatter – FSC”) e da granulosidade ou complexidade interna da célula (“Side Scatter – SSC”) permite a classificação dos leucócitos em linfócitos, monócitos e granulócitos (GRINDEM, 1996). A imunofenotipagem consiste no isolamento de populações de células distintas com diferentes antígenos de superfície marcados com anticorpos fluorescentes específicos (ROITT et al., 1999). A avaliação da intensidade da fluorescência ocorre para detecção de antígenos de superfície diferentes, marcados com anticorpos monoclonais específicos ligados, a compostos químicos fluorescentes ou fluocromos (GRINDEM, 1996).

As células germinativas e as células tronco de todos os embriões exibem pluripotencialidade e que cada tipo celular exibe propriedades únicas (SURANI, 2001), visando evidenciar essa pluripotencialidade todas as células sanguíneas se originam de uma célula tronco comum com linhagens diferentes e particulares (eritrócitos, megakariócito, granulócito, monócito e linfócito). Os marcadores de células tronco sanguíneas são ligados a duas proteínas CD34 e células tronco anti-1 (Sca-1) (ABBAS; LICHTMAN, 1991).

O marcador celular de superfície CD34 foi primeiro identificado em antígenos de superfície nas células hematopoiéticas humanas usada inicialmente em linhagens celulares mieloblásticas humanas KG-1a, o qual expressa CD34 e

proporciona forte potencial para formação de colônias de células mieloides (GOU; LUBBERT; ENGELHARDT, 2003)

Até pouco tempo acreditava-se que todas as células tronco hematopoiéticas possuíam um antígeno de membrana denominado CD34. Morel (1998) descobriu que também existem células tronco hematopoiéticas sem antígeno CD34, porém estas são muito mais raras em humanos (GUO; LUBBERT; ENGELHARDT 2003). Observou-se também que estas células CD34⁻, transformaram-se em CD34⁺, e somente após disso houve a diferenciação em células sangüíneas (MOREL; GALY; CHEN; SZILVASSY, 1998)

Células CD 34⁻negativas para célula tronco embrionária são demonstradas em corpos embrióides, no qual a diferenciação de eritróide e mielóide são significativamente retardadas na formação de colônias progenitoras (GUO; LUBBERT; ENGELHARDT, 2003).

O tecido hematopoiético foram bem utilizadas para reconstrução hematológica por muitos anos. Estas células são CD34⁺ e CD133⁺, as quais aumentam todas as linhagens de células sangüínea diferenciadas (GORDON; LEVICAR; PAI; BACHELLIER; DIMARAKIS et al., 2006).

3.5 Células Musculares

Certas células oriundas dos somitos de um embrião vertebrado num estágio bastante precoce tornam-se pré-determinadas a se diferenciar em mioblastos (células precursoras de músculo esquelético) e migram para tecido conjuntivo adjacentes. O comprometimento para ser mioblasto depende da ativação de um ou mais genes miogênicos, que codificam proteínas regulatórias da família hélice-volta-hélice. Depois de um período de proliferação os mioblastos se fundem uns com os outros para formar as células musculares esqueléticas multinucleadas. Uma célula típica de músculo esquelético de mamífero é extremamente grande e contém muitos núcleos. Ela é formada a partir da fusão de muitas células musculares precursoras, chamadas mioblastos (ALBERT; BRAY; LEWIS; RAFF et al., 1997).

As células musculares satélites humanas nascem durante a fase final da miogênese embrionária; mioblastos derivados de células satélites são bem

distinguível de mioblastos fetal por critérios morfológicos. A origem do desenvolvimento das células satélites aparecem bem separadas dos outros precursores miogênicos que se originam durante a vida embrionária e fetal (SEALE; ASAKURA; RUDNICKI, 2001).

O termo “músculo” cobre um grande número de tipos de células, todas especializadas em contração, mas diferentes em outros aspectos. Mamíferos possuem quatro categorias de células especializadas para contração: células musculares esqueléticas, células do músculo cardíaco, células do músculo liso e células mioepiteliais (ALBERTS; BRAY; LEWIS; RAFF; ROBERTS; WATSON, 1997).

O músculo desenvolve-se do mesoderma, exceto os músculos da íris e cardíaco. O músculo esquelético é derivado do mesoderma paraxial, como forma de somitos e na região rostral ao coração como somitômeros. As células mesodérmicas da região do miótomo de cada somito/somitômeros diferencia-se em mioblasto, os quais se fundem com as células multinucleadas que sintetizam miosina e actina (FLETCHER; WEBER, 2003), o músculo esquelético de vertebrados tem sua origem, durante o desenvolvimento embrionário, no mesoderma paraxial, situado em ambos os lados do tubo neural (POTTEN, 1997)

O tecido muscular dos vertebrados é constituído por células alongadas caracterizadas pela presença de grande quantidade de filamentos citoplasmáticos, responsáveis pela contração. As células musculares tem origem no mesoderma, e sua diferenciação ocorre principalmente devido a um processo de alongamento gradativo, com simultânea síntese de proteína filamentosa (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1995).

O músculo esquelético adulto de camundogos é um tecido altamente especializado, constituído por miofibras contráteis, o qual apresenta sincício celular simples contendo centena de mionúcleo pos-mitótico (COLLINS, 2006), sendo assim demonstrou-se que em humanos cada fibra é constituída por centenas a milhares de miofibrilas, ocupando de 85 a 90% do seu volume (DUBOWITZ, 1985).

A unidade de organização histológica do músculo esquelético é a fibra muscular, visível em microscópio de luz. Grupos de fibras musculares associam-se formando fascículos que se unem para formar os diferentes tipos musculares (GUYTON, 2001). Para as células musculares esqueléticas de vertebrados, podem ser grandes (2 ou 3 cm de comprimento e 100µm de diâmetro, em humano adulto) e

são freqüentemente referidas como fibras musculares. Cada um é um sincício, contendo muitos núcleos dentro de um citoplasma comum (ALBERTS; BRAY; LEWIS; RAFF; ROBERTS, 1997). O diâmetro das fibras musculares apresenta variações consideráveis, dentro de um mesmo músculo, alternando-se de 10 a 80µm. (BROOKE; ENGEL, 1969a e d)

Os músculos dos vertebrados são formados por feixes de células muito longas, cilíndricas e multinucleadas, com diâmetro que varia de 10 a 100µm, chamadas fibras musculares estriadas. Estas fibras musculares se originam no embrião através da fusão das células alongadas, os mioblastos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1995).

A diferenciação da fibra muscular esquelética de vertebrados em uma célula multinucleada é formada a partir da fusão de muitas células mononucleadas determinadas (mioblastos). Células tronco apresentam número elevado de mitoses, concomitantemente se diferenciam em mioblastos. Mioblastos mononucleares o qual elabora os elementos contráteis da fibra muscular. Algumas células tronco alojadas entre a membrana plasmática muscular e a lâmina basal são constituídas de células satélites (Quadro 1) a qual poderá formar novas fibras musculares durante o crescimento e a regeneração da fibra (MORGAN; WATT, 1993)

Quadro 1 – Demonstração da diferenciação das células musculares de vertebrados (MORGAN; WATT, 1993)

A proliferação de mioblastos humanos em grandes quantidades, são bem acessíveis com forte aumento de número celular, passadas as primeiras 120 horas. Tipicamente, mioblastos iniciam sua formação 24 horas após o repique, os mioblastos fundem-se em grandes quantidades. As culturas musculares são testadas pela habilidade de formação de miotubos (RADOJEVIC; LINS; BURGUNDER, 2000).

Células satélites musculares esqueléticas foram primeiramente descritas em músculo de sapos por Mauro em 1961, baseado na morfologia e posição relativa a maturação dos mioblastos, a qual mais tarde foi identificada em aves adultas e músculos de mamíferos. As células satélites aparecem aderidas a superfície dos miotubos e formam a lâmina basal. Tem como função formar uma população de células tronco que são distintas das outras células precursoras miogênicas que tem sua definição por critérios biológicos e bioquímicos. Todavia o número e o potencial das células satélites são severamente reduzidos em doenças musculares como distrofia de Duchenne (SEALE; RUDNICKI, 2000)

Embora os núcleos da fibras musculares esqueléticas de vertebrados não se dividam, o músculo tem a capacidade de se reconstituir. Admite-se que as células satélites sejam responsáveis pela regeneração do músculo esquelético. Estas células são mononucleadas, fusiformes, dispostas paralelamente as fibras musculares. Após uma lesão ou outro estímulo as células satélites, que normalmente estão quiescentes, tornam-se ativas, proliferam por divisão mitótica e se fundem umas com as outras para formar novas fibras (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1995).

O mecanismo de reparação opere bem em animais pequenos, tais como camundongos, ele é menos eficiente em humanos. Na distrofia muscular, por exemplo, células musculares esqueléticas morrem por causa de um defeito genético na proteína distrofina de citoesqueleto. Como resultado, células –satélites proliferam para formar novas células musculares; mas esta resposta regenerativa é incapaz de acompanhar os passos do dano, e as células musculares são eventualmente substituídas por tecido conjuntivo, bloqueando qualquer possibilidade posterior de regeneração (ALBERTS; BRAY; LEWI; RAFF; ROBERTS; WATSON, 1997).

3.5.1 Co-Culturas de Células Musculares e Células Tronco Germinativas

Para o estudo da interação entre dois tipos celulares em cultura, utiliza-se a co-cultura. Trata-se de um recurso de investigação aplicado para o entendimento das relações célula-célula. Através deste método podemos avaliar os parâmetros funcionais restritos a uma célula sob a influência da interação com outro tipo celular presente, e as trocas de influência são bidirecionais e por isso, reproduzem melhor o que ocorre “in vivo”. A co-cultura pode ser feita com células obtidas diretamente de animais ou humanos, obtidos de mais de um órgão ou tecido (PERES, 2005).

Em condições normais de expansão, células tronco oriundas do cordão umbilical humano se fundem as células musculares esquelética humanas, independentemente do meio de cultura utilizado e da concentração dos mesmos. As células tronco se fundem rapidamente aos mioblastos, sendo que em 24 horas, é visível a mudança de morfologia das células presentes no cultivo, o contato dos mioblastos com as células tronco ativam a formação de sincícios multinucleados. (SILVA, 2005)

As células endoteliais de fetos de ratos, diferenciadas ou não, quando colocadas em co-cultura com cardiomiócitos de ratos recém nascidos, diferenciam-se em cardiomiócitos, sugerindo que o contato entre os tipos celulares pode induzir a diferenciação em certo tipo celular (CONDORELLI; BORELLO,; DE ANGELIS; et al., 2001)

3.6 Reação De Imonohistoquímica Para Detecção De Oct-4

Há 110 anos atrás, August Weismann apresentou a teoria do plasma germinativo, o qual classificou as linhagens celulares, identificando substâncias específicas, chamadas “determinantes”. De acordo com a teoria, os determinantes são transmitidos de uma geração para a próxima na forma propagada de linhagens celulares (WEISMANN, 1885).

O programa de desenvolvimento das linhagens celulares germinativas envolve diferenciação de dois tipos de células especializadas: espermatozóides e oócitos, a fusão destes dois é a subsequente regeneração das células germinativas (YEOM; FUHRMANN; OVITT; BREHM et al., 1996). Tais células são precursoras facilmente reorganizadas nos gametas de camundongos; durante a gastrulação as células progenitoras germinativa (PCGs) agrupam-se em 100 células, dentro da linha média do mesoderma extraembrionário. (GINSBURG; SNOW; MCLAREN, 1990)

Um gene extensamente caracterizado e associado à pluripotencialidade é o gene codificado OCT-4 (MITALPOV; KUO; HENNEBOLD; WOLF, 2003), sendo primeiro descritos em células tronco embrionárias de camundongos (OKAMOTO; OKAZAWA; OKUDA; SAKAI et al., 1990).

O OCT-4 de camundongos é a 352^a proteína aminoácida pertencente à classe V das proteínas POU (Pict-Oct-Unc), que expressam a totipotencialidade das células embrionárias (PESCE; SCHÖLER, 2001). Inicialmente expressas em blastômeros e no desenvolvimento de embriões, o gene de expressão OCT-4 oriundo da massa celular interna (MCI) é regulado no trofoectoderma e no endoderma primitivo. Após o desenvolvimento a expressão do OCT-4 é mantida no ectoderma embrionário até o estágio cilíndrico do embrião. Somente algumas células mantêm a expressão do OCT-4, até a inativação do gameta na diferenciação sexual (PESCE; SCHÖLER, 2000).

O molde único de expressão do OCT-4 em embriões de camundongo direciona para a hipótese do “ciclo totipotente”. (PESCE; GROSS; SCHÖLER, 1998). De acordo com a classificação, as células OCT-4 perdidas durante o desenvolvimento de diferenciação embrionário em linhagens somáticas a qual mantem expressão OCT-4 retem a totipotencialidade celular e apresentam competência no desenvolvimento de células germinativas (PESCE; SCHÖLER, 2001).

As células germinativa embrionárias (PGCs) são estimuladas a proliferação nos órgãos genitais e necessitam de fatores de crescimento. Quando aparecem os túbulos seminíferos as PGCs se diferenciam em gonócitos, subsequente, os gonócitos são estimulados a proliferação por alguns dias e estes permanecem inativos. Após o nascimento, ocorre o início da espermatogênese: diferenciação dos gonócitos em espermatogônias (ROOIJ; DISSEL-EMILIANI, 1997)

Quadro 2 – Demonstração da diferenciação das células germinativas embrionárias (Potten, 1997)

As células germinativas fetais humanas foram classificadas em diferentes subpopulações: os gonócitos e prospermatogônias (WATENBERG, 1981) foram identificadas 8 a 10 tipos e células germinativas em embriões humanos de 13 semanas, que apresentaram núcleos grandes e proeminentes nucléolos, estes foram chamados de “gonócitos” (HOLSTEIN; SCHUTTE; BECKER; HARTMANN, 1987). Em fetos mais maduros (13 a 22 semanas), ambos os autores notaram algumas células germinativas com aspecto distinto dos gonócitos e sugeriram classificá-las como “espermatogônias fetais” (GASKELL; ESNAL; ROBINSON; ANDERSON et al., 2004).

Fetos humanos examinados entre 9 e 30 semanas de gestação e reportaram três tipos de células germinativas morfológicamente distintas: gonócitos, células intermediárias e as espermatogônias fetais, as quais acredita-se apresentarem diferenças em relação a pluripotencialidade celular (FUKUDA; HEDINGER; GROSCURTH, 1975). Secções transversais dos testículos fetais humanos descritas no primeiro trimestre, foi fácil distinguir as células germinativas das células de Sertoli, devido ao grande e circular núcleo. Células germinativas apresentam-se com linha irregular, citoplasma claro e usualmente em grupos na periferia do órgão. Neste período o Oct-4 está imunolocalizado no núcleo da maioria

das células germinativas (GASKELL; ESNAL; ROBINSON; ANDERSON, et al., 2004).

Em embriões de camundongos, cerca de 50 células germinativas primordiais agrupam-se, podendo ser detectada na gastrulação em embriões 7-7,25 dias após o coito (dpc) no mesoderma extraembrionário na base do saco amniótico. (GINSBURG; SNOW; MCLAREN, 1990). Nesta região, há difusão dentro da faixa do mesoderma primitivo e no endoderma do saco vitelino. Até 10 dpc, elas começam a se mover por atividade migratória acima do mesentério dorsal e dentro da parte superior das gônadas, por volta do 12,5 dpc, elas diferenciam-se em oogônia/ oócito e prospermatogônias, nos ovários e testículos, respectivamente (DE FELICI, 2000).

Culturas de células germinativas primordiais (PGCs) foram isoadas com pouco sucesso. O fato observado foi que as células germinativas isoladas das gônadas de embriões de camundongos, de diferentes idades, apresentaram diferentes habilidades de sobrevivência *in vitro*. Em particular, PGCs com 11,5 – 12,5 dpc não sobrevivem satisfatoriamente a 37°C. Todavia nesta temperatura cerca de 50% das PGCs sobreviveram por 2-3 dias e sofreram proliferação mitótica, promovendo a diferenciação celular (DE FELICI, 2000).

As células germinativas primordiais continuam a expressar Oct-4, elas proliferam e migram formando os órgãos genitais. Em embriões machos a persistência na expressão de Oct-4 em células germinativas são bem demonstradas no desenvolvimento fetal (KEHLER; TOLKUNOVA; KOSCHORZ; PESCE et al., 2004).

Diferentes marcadores celulares para células tronco pluripotentes, foram comparados e destacou-se que as células tronco embrionárias (ES), células embrionárias de carcinoma (EC) e células germinativas embrionárias (EG) apresentaram-se positivas para Oct-4, enquanto que para humanos apenas as ES e EC mostraram imunopositividade ao Oct-4, e as EG humanas apresentaram resultados inconclusivos (KURSCHSTEIN; SKIRBOLI, 2001)

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Os animais utilizados compreendem em 16 fêmeas sem raça definida (SRD), com peso médio de 8,3 Kg e idade média de um ano e dois meses. As fêmeas foram acompanhadas por citologia vaginal desde a fase de proestro até a fase de estro (Figura 1A). As cadelas selecionadas a partir do exame citológico, nas quais identificamos a presença de células superficiais sem núcleo e deformação característica do citoplasma celular (Figura 1B), foram inseminadas artificialmente, e após 30 dias de gestação os animais foram castrados pela técnica de ovário-salpingohisterectomia.

O número total de embriões coletados foi de 41, sendo que três apresentaram mumificação e um apresentou-se contido em corno uterino infeccionado, tendo sido, portanto descartados. Assim utilizou-se 33 embriões. Do total de 16 fêmeas, quatro destas apresentaram idade gestacional inferior a 19 dias. Isto tornou a coleta inviável dos embriões, pois estes ainda não apresentavam somitos diferenciados (Tabela 1).

Tabela 1 – Dados relacionados a quantidades de embriões, número de embriões utilizados e idade gestacional das cadelas - São Paulo - 2006

Fêmeas	Número de embriões	Número de embriões utilizados	Idade gestacional Aproximada
1	06	05	25
2	05	05	24
3	03	03	22
4	*****	*****	18
5	03	03	24
6	*****	*****	18
7	*****	*****	18
8	02	02	18
9	04	03	35
10	*****	*****	24
11	05	03	24
12	03	03	22
13	*****	*****	Ovário polístico
14	03	*****	23
15	02	01	28
16	05	05	24
TOTAL	41	33	Média 21 dias

4.1 Obtenção de Células Tronco Germinativas Embrionárias

A obtenção das células germinativas embrionárias caninas procedeu-se obedecendo duas metodologias diferenciadas, devido à coleta de embriões em diferentes estágios gestacionais. Os embriões que apresentavam idade gestacional variando de 20 a 22 dias, procedemos a retirada do útero, no qual conseqüentemente administramos injeções de solução de PBS com Heparina (5un/ml) nos cornos uterinos (Figura 2A), possibilitando assim a limpeza e retirada dos embriões. O líquido coletado em Becker foi transferido para filtro coletor de embriões e seguidamente para placas de Petri (Figura 2B) para posterior análise e separação dos mesmos (Figuras 2C e 2D).

Nos embriões que apresentaram idade gestacional superior a 23 dias, o procedimento seguido foi da abertura dos sacos gestacionais para a retirada dos embriões; esses conseqüentemente foram transferidos para placas de Petri contendo solução de PBS-L¹, e levados para análise em lupa estereoscópica.

A extração de células embrionárias germinativas procedeu-se da mesma forma em ambos os casos, nos quais os embriões que apresentaram somitos evidentes e bem definidos (Figura 3A e B) foram selecionados. O processo iniciou-se com microdissecção do embrião, retirando os órgãos abdominais, torácicos, cabeça e pescoço, evitando assim a presença de tecido celular proveniente do sistema nervoso. A seguir os somitos foram separados da medula espinhal mediante micromanipulação, e transferidos para placas de cultivo modelo Corning de 35 mm de diâmetro. As massas celulares formadas pelos somitos foram trituradas manualmente com lâminas de bisturi número 24. Não se utilizou tripsina por interferência desta na mitose celular. Os fragmentos formados foram separados em diferentes placas de cultivo, com ou sem monocamadas de fibroblasto canino, e preenchidas com três diferentes meios: ES-cells², ES-cells³ e SSpam⁴.

¹ Anexo página 105

² Anexo página 103

² Anexo página 103

⁴ Anexo página 103

Figura 1 - Fotomicrografias de citologia vaginal de cadelas em diferentes estágios do ciclo estral. Em (A) demonstramos células epiteliais superficiais queratinizadas e acidófilas (setas) características de proestro e em (B) células superficiais queratinizadas (setas) características de estro (coloração May Grunwald Giemsa)

Figura 2 – Fotografias demonstrando passo a passo a coleta de embrião canino. Em **A** elucidamos a injeção na tuba uterina de PBS suplementado com Heparina para a lavagem uterina. A fotografia **B** demonstra a filtração do líquido coletado dos cornos uterinos e em **C** a colocação dos embriões coletados em placas de petri para análise em esteriomicroscópio (**D**)

Figura 3 – Fotomicrografia de embriões caninos. A evidencia um embrião canino de aproximadamente 22 dias de vida e B aproximadamente 24 dias de gestação. As setas indicam a localização dos somitos na região paramesoneférica

4.2 Obtenção de Fibroblastos Fetais Caninos

Os fibroblastos caninos foram obtidos das carcaças remanescentes (seis), para elaboração de monocamada de sustentação das células germinativas embrionárias. A produção de fibroblastos deu-se a partir da trituração mecânica do embrião com o auxílio de tripsina química 1:250, para melhor aproveitamento das carcaças. A massa formada foi separada em garrafas para cultivo, contendo meio DMEM⁵ suplementado com 10% de soro fetal bovino e levadas para estufa de CO₂ para crescimento celular. Após três dias de cultivo, os fibroblastos foram repicados e passados para garrafas maiores. O repique celular foi realizado através da tripsinização da garrafa. Após a inativação com DMEM SFB 10% foi feita a retirada dos fibroblastos. As células foram transferidas para tubos de centrifuga tipo Falcon, com capacidade de 15ml, e centrifugadas a 1100rpm por 8 minutos. O sobrenadante formado foi retirado e o pellet ressuscitado em 5ml de meio DMEM com SFB 10% e adicionado em garrafas de cultivo maiores. Após sete dias de cultivo os fibroblastos foram congelados.

O processo de congelamento iniciou-se pela aspiração do meio existente e lavagem da garrafa com 3ml de solução de PBS-L, após esse processo a garrafa foi tripsinizada (1 a 4ml) e inativada com meio DMEM SFB 10%; as células foram transferidas para tubos de centrifuga tipo Falcon com capacidade de 15ml e centrifugadas a 1.700rpm por 8 minutos. O sobrenadante formado foi retirado e o “pellet” ressuscitado em de meio para congelação⁶, previamente preparado e distribuídos em criotubos. Os criotubos permaneceram em geladeira a 4°C por 40 minutos e foram transferidos para freezer a -20°C por 40 minutos, transportados para freezer a -80°C “over night” e imersos em nitrogênio líquido, no qual permanecem armazenados por tempo indeterminado, até o uso.

⁵Anexo página 102

⁶ Anexo página 102

A preparação de fibroblasto canino iniciou-se com o descongelamento dos criotubos em agitação na água, com temperatura de 37°C, por 2 minutos. O conteúdo dos criotubos foram transferidos para tubo de centrifuga tipo Falcon, com capacidade de 15ml, adicionando-se 8ml de DMEM com SFB 10% e então centrifugados a 1.100rpm por 8 minutos. Os sobrenadantes foram descartados, sendo os “pellets” ressuspensos em 4ml de DMEM com SFB 10% e distribuídos em garrafas para multiplicação celular.

Após cinco dias de cultivo aspirou-se o sobrenadante das garrafas e aplicou-se solução de Mitomicina C⁷. As garrafas permaneceram por duas horas em estufa de CO₂ para ativação química do elemento usado e inativação mitótica dos fibroblastos. A etapa seguinte foi iniciada pela aspiração da garrafa e lavagem com DMEM SFB 10% e PBS-L por três vezes. A seguir tripsinizou-se e inativou-se as garrafas com DMEM SFB 10%. Os conteúdos foram transferidos para tubos de centrifuga tipo Falcon com capacidade de 15ml adicionando-se DMEM com SFB 10%. Os conteúdos foram centrifugados a 1.100rpm por 8 minutos; os sobrenadantes foram descartados e os “pellets” ressuspensos em 4ml de DMEM com SFB 10%, agitados e contados em câmara de newbauer e aplicados na seguinte formula:

$$\frac{\text{nº de células contadas} \times 2,5 \times \text{volume do pallet ressuspendido}}{300}$$

300

OBS: O número ideal de células por placa é de 300 unidades por 1ml de meio.

As placas que receberam a monocamada de fibroblastos fetais caninos foram previamente preparadas com gelatina de pele de suíno, levadas a geladeira por uma hora. Em seguida aspirou-se a quantidade sobressalente, as placas foram colocadas no fluxo laminar para secagem por uma hora. Finalizado este processo inseriu-se os fragmentos celulares, e colocou-se as placas processadas na estufa de CO₂ para o processamento da multiplicação celular.

⁷Anexo página 104

4.3 Citometria de Fluxo

Neste processo utilizamos duas cadelas prenhez com aproximadamente 24 dias de gestação, sendo que uma apresentou 2 embriões utilizáveis e a outra 4 embriões utilizáveis.

Dos embriões obtivemos as células embrionárias germinativas provenientes da região paramesonéfrica, as quais foram retiradas da maneira usual já descrita, e mantidas em cultivo por aproximadamente 21 dias, utilizando-se o meio ES-cells. As placas foram numeradas obedecendo a identificação dos embriões e suas correlações, sendo assim segue a identificação das placas:

A placa A1.1 e A1.2 foram descartadas por motivo de contaminação fúngica, sendo assim demos seqüência a esta fase utilizando somente as placas A2.1, A2.2, A2.3 e A2.4, por serem de mesma origem.

Inicialmente as colônias foram separadas mecanicamente com auxílio de pipetas, e lavadas com meio ES-cells por 5 vezes, em seguida estas foram colocadas separadamente em tubos para centrifuga tipo Falcon 15ml por 8 minutos a 1800 rpm à 4°C; logo após retirou-se o sobrenadante e fez-se a adição de tampão FACS, as amostras foram novamente centrifugadas a 1600 rpm por 5 minutos a 4°C.

A segunda etapa consistiu em ressuspender o pellet em 400ul de tampão FACS, distribuir as amostras em 2 poços da placa e levá-las novamente a centrifugação por 5 minutos, 1600 rpm à 4°C. Retirou-se o sobrenadante dos poços e houve a colocação do anticorpo primário sobre o pellet, o qual ficou em incubação por uma hora em gelo.

Após o tempo de espera os poços foram lavados com tampão FACS e colocou-se o anticorpo secundário, que teve o período de incubação compreendido em 30 minutos. Finalizado o período de incubação as células foram lavadas com tampão FACS e centrifugadas por 5 minutos a 1600 rpm à 4°C; os pellets foram assim retirados e colocados em tubos específicos para citometria de fluxo.

4.4 Obtenção e Cultivo de Células Musculares Caninas

Para esta fase do experimento foram utilizados 3 cães machos pertencentes ao canil GRMD/Brasil, sendo dois machos normais, utilizados para estabelecimento da cultura e um macho afetado pela distrofia muscular. Os cães foram submetidos à biopsia muscular (Figura 4). Na qual retiraram-se pequenos fragmentos de diferentes grupos musculares. Estes fragmentos foram lavados em PBS-L para a retirada de sangue ou possíveis agentes contaminantes da amostra.

Seqüencialmente os fragmentos foram transferidos para placas modelo Corning de 35mm contendo 1ml de meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino; estes fragmentos foram triturados manualmente com lâmina de bisturi nº 24 e implantados em garrafas de cultivo celular (as garrafas foram previamente lavadas com 1 ml de Soro fetal bovino, para melhorar a aderência dos fragmentos). Os fragmentos mantiveram-se em observação por aproximadamente 20 dias e após esse período executou-se o repicamento celular, no qual utilizamos a técnica de separação manual dos fragmentos. As frações celulares separadas foram transferidos da garrafa original para uma nova garrafa de cultivo e mantidas em estufa de CO₂ a 37°C sob observação a cada 2 dias.

Figura 4 - Fotografia elucidativa, mostrando a biopsia muscular de um cão normal.

4.4.1 Co-Cultivo de Células Musculares Caninas e Células Germinativas Embrionárias

O material utilizado nesta fase provem das culturas isoladas de células tronco germinativas embrionárias e células musculares caninas de cães adultos.

Para o estabelecimento da co-cultura, inicialmente foram preparadas placas de cultura, modelo Corning 35mm, contendo células germinativas embrionárias apresentando 5 dias de cultivo. As células foram seguidamente marcadas com DAPI¹⁴ (4',6-diamidino-2'-fenylindole dihydrochloride) na concentração de 5ug/ml e permaneceram em estufa de CO₂ a 37°C por 90 minutos sem contato luminoso; posteriormente retirou-se o meio com DAPI das placas e adicionou-se 2ml do meio de cultivo Es-cells.

Durante o período de incubação das células embrionárias germinativas com DAPI as células musculares presentes nas garrafas de cultivo foram lavadas 3 vezes

¹⁴ Bisbenzimidazole H 33342, Sigma cat. 2261

com PBS-L e seguidamente tripsinizadas, para o desprendimento celular. Logo após, a tripsina⁸ foi inativada com 4ml de DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino e as células foram centrifugadas (1.700rpm/7 minutos); seguidamente o pellet foi ressuspenso em 2ml de meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino e procedeu-se a contagem celular.

A concentração de células musculares para cada placa de cultivo de células germinativas embrionárias foi de 10⁶ células/ml, assim iniciou-se o processo de co-cultura através da colocação das células musculares sobre as células germinativas embrionárias. As placas foram acondicionadas a 37°C em estufa de CO₂ em placas de Petri de vidro, para evitar contato com qualquer luminosidade. O co-cultivo foi submetido à troca de meio a cada 2 dias, retirava-se 1ml de meio da superfície de cada placa e substituíam-se por 1ml de meio ES-Cells novo.

A co-cultura das células germinativas embrionárias, cujos núcleos haviam sido corados com DAPI, foram acompanhadas em dias alternados em microscópio de fluorescência e com isso verificamos a fusão entre as células, por um período compreendido de 24 a 144 horas.

4.5 Protocolo Imunohistoquímico para Detecção de Oct-4

Para a realização do protocolo imunohistoquímico utilizou-se 5 embriões (fixados em paraformaldeído a 4%) variando de 23 a 25 dias de idade gestacional, os embriões inicialmente passaram pelo processo de parafinização e em seguida os blocos foram cortados (5µm) e colocados em lâminas silanizadas, com dois cortes por lâmina sendo um, para controle negativo.

Os embriões foram inicialmente desidratados em sequência de álcoois 70%, 96% e 99%, em seguida permaneceram 20 minutos em Xilol I, 20 minutos em Xilol II e 60 minutos em Xilol III, para posterior parafinização, permanecendo 60 minutos em

⁸ Tryple Express – Gibco/cat. nº 12064-021

parafina I, II e III a temperatura de 60°C em estufa.

Após o corte, as lâminas seguiram o protocolo fornecido por Morten Vejlsted, doutorando do Departamento de Ciências Básicas Animal e Veterinária da Royal Veterinary and Agricultural University, Denmark, que se segue abaixo:

1. Xilol-----2 x 5 minutos
2. Álcool 99%-----2 x 5 minutos
3. 3% H₂O₂ em álcool 99%-----1 x 5 minutos
4. Álcool 99%-----1 x 5 minutos
5. Álcool 96%-----1 x 5 minutos
6. Álcool 70%-----1 x 5 minutos
7. Água destilada ----- 5 minutos
8. Tampão citrato de sódio 0,01M (ph6,0) --3 x 5 minutos, em microondas, 720W
9. Tempo descanso-----20 minutos
- 10.Água destilada ----- 5 minutos
- 11.PBS-----2 x 5 minutos
- 12.Proteína DAKO⁹ -----10 minutos
- 13.Anticorpo primário policlonal Oct-4¹⁰ (1:500, em BSA/PBS) -----2 horas
 - a. Para o controle negativo (PBS)-----2 horas
- 14.Pepítido de pré- absorção com Oct-4¹¹-----over night
- 15.PBS-----2 x 3 minutos
- 16.Anticorpo secundário¹²
 - a. Anticorpo (frasco amarelo) -----15 minutos
 - b. PBS-----2 X 3 minutos
 - c. Estreptovidina (frasco vermelho)-----15 minutos
 - d. PBS-----2 X 3 minutos
- 17.Revelador¹³

1 gota de **A** em 1ml de água destilada, mistura e 1 gota de **B** e **C** e mistura
- 18.Descanso por 30 minutos
- 19.Água destilada ----- 5 minutos

20. Hematoxilina-----30 segundos
21. Água corrente -----5 minutos
22. Água destilada-----1 minuto
23. Montagem

⁹ DAKO protein block – x0909

¹⁰ Policlonal cabra anti-human Oct-4 – Santa Cruz

¹¹ Peptídeo de pré- absorção com Oct-4 – Santa Cruz

¹² DAKO LSAB + Kit Peroxidase – K0690

¹³ Kit AEC Zymed – 00-2007

5 RESULTADOS PARCIAIS:

Os resultados a seguir referem-se as obtenções dos fibroblastos caninos, obtenção, isolamento e caracterização das células germinativas embrionárias, bem como a marcação celular e o co-cultivo de células musculares oriundas de cães afetados pela distrofia muscular juntamente com as células tronco germinativas caninas.

5.1 Obtenção de Fibroblastos Fetais Caninos

A produção de fibroblastos fetais caninos deu-se de forma eficiente. As células obtidas apresentaram como principais características prolongamentos citoplasmáticos irregulares, com núcleos claros, grandes e com formato ovóide (Figura 5A). A produção mostrou-se altamente viável, apresentando grande capacidade de multiplicação, em curto período (168 horas) de cultivo foi necessário a replicação (Figura 5B - E).

Figura 5 – Fotomicrografia demonstrando as características do fibroblasto fetal canino. Em (A) a seta branca destaca os prolongamentos celulares irregulares e a seta vermelha indica a presença de núcleo claro, grande e com formato ovóide. Barra = 50 µm

5.2 Obtenção de Células Tronco Germinativas Embrionárias

Os resultados parciais possibilitaram a avaliação de diferentes meios para expansão e manutenção das células germinativas embrionárias, bem como a avaliação da necessidade de monocamada para adesão celular. Inicialmente foram implantadas massas celulares oriundas de três animais em placas de cultivo contendo, meio SSpam com monocamada de fibroblasto e outras três massas celulares originárias de embriões com meio SSpam sem a presença de monocamada de fibroblasto.

Os resultados obtidos demonstram que este meio não possibilitou o crescimento ideal para as células embrionárias germinativas, pois a liberação das células mononucleares apresentou-se de forma unilateral não homogênea (Figura 6A). Entretanto, ressaltamos que em ambos os casos foram encontradas várias colônias de células mononucleares indiferenciadas (Figuras 6C e 6D). O teste não foi significativo para a avaliação da eficiência da monocamada fibroblástica, uma vez que descartamos esse meio como preferencial para a proliferação da linhagem celular selecionada.

Os resultados demonstrados pelo uso do meio ES-cells foram analisados pela implantação de massas celulares de três animais em placas de cultivo contendo meio ES-cells, com monocamada de fibroblastos, e massas celulares oriundas de três animais em placas de cultivo contendo meio ES-cells sem monocamada de fibroblastos. Os resultados elucidam maior eficiência na liberação, proliferação e manutenção da indiferenciação das células germinativas embrionárias caninas. O fragmento demonstrou liberação das células mononucleares de forma satisfatória, ou seja, ao redor de toda a massa celular apresentando-se de forma homogênea (Figuras 6D e 6E). Assim, notamos a presença de colônias de células mononucleares indiferenciadas ao redor de todo o fragmento (Figura 6E e 6F).

Figura 6 – Fotomicrografia demonstrando a liberação celular nos diferentes meios avaliados. Em A, B e C avaliamos a eficiência do meio SSpm (A) aproximadamente 3 dias de cultivo celular; B e C elucidamos a presença do fragmento (Fr), e as células mononucleares indiferenciadas (setas), bem como o momento de expulsão das colônias celulares. As fotomicrografias D, E e F avaliamos a eficiência do meio ES-Cells. D apresenta-se com aproximadamente 3 dias de cultivo, E apresenta-se com 10 dias de cultivo e evidencia a expansão de células mononucleares indiferenciadas em torno do fragmento (Fr). Em F elucidamos a presença de colônias de células mononucleares indiferenciadas (setas), presentes em 10 dias de cultivo. Barra = A e D 50µm e B, C, E e F 25 µm

O cultivo de células nos permitiu verificar as diversas formas de manutenção *in vitro*, pois após a implantação verificamos a grande proliferação celular ao redor do fragmento (Figura 7A, 7B e 8A), o qual é demonstrado pelo acúmulo de células, que se desprendem e movimentam-se livremente pela placa de cultivo (Figura 8D). Com o decorrer dos dias (160 horas), devido a grande proliferação as colônias, as células tornam-se mais próximas e inicia-se um novo processo de desprendimento celular (Figura 7C, 8B e 8C), conseqüentemente novas colônias foram formadas (Figura 8E).

Algumas colônias de células germinativas embrionárias, após intensa proliferação (240 horas), desencadearam um processo de diferenciação celular, devido ao retardo no repique, no qual destacamos a evolução de dois tipos celulares distintos.

Devido ao fato da extração celular ocorrer na área paramesonéfrica, ocasionalmente obtivemos a diferenciação em gonócitos; células precursoras de espermatócitos e oócitos, as quais destacam-se pela presença de um grande núcleo e citoplasma bem evidente e translúcido (Figuras 7F e 8F). O segundo tipo celular encontrado apresenta um formato fusiforme, prolongamentos citoplasmáticos irregulares e grande atividade mitótica, estas células são caracterizadas como mioblastos fetais (Figuras 7E e 7F).

Figura 7 - Fotomicrografias demonstrando a proliferação diferenciação das células germinativas embrionárias caninas. Em (A) e (B) observar nuvem celular oriunda dos fragmentos – setas vermelhas. As figuras (C) e (D) elucidam a presença das células livres – setas pretas, em (E) demonstramos uma célula germinativa envolta por mioblastos fetais e na figura (F) revelamos um gonócito (*). Barra = A 200 μ m, B, E e F 50 μ m e C e D 25 μ m

Figura 8 - Fotomicrografias demonstrando a proliferação das células germinativas embrionárias caninas. Em (A) observar nuvem celular oriunda dos fragmentos – setas brancas, nas figuras (B) e (C) demonstramos o desprendimento celular (setas brancas) que elucidam a presença das células livres e conseqüente formação de novas colônias (círculos) em (E). Na figura (F) demonstramos uma célula precursora germinativa (seta preta). Barra = A, B, D e F 25 μ m e em C e E 50 μ m

5.3 Citometria de Fluxo

As células embrionárias germinativas da região paramesonéfrica utilizadas para marcação celular, totalizaram 504 horas de cultivo. Após o processamento do material, foi possível analisar que as células tronco germinativas embrionárias caninas apresentaram resultado sugestivo positivo à marcação celular do CD34⁺, no qual a placa A2.1 apresentou 1.81% de células marcadas (Figura 9B), a placa A2.2 demonstrou 4.55% (Figura 10B) e a placa A2.3 elucidou 2.32% de marcação celular (Figura 11B). Entretanto a placa identificada A2.4 obteve valores numéricos abaixo de 1%, sendo assim houve inespecificidade deste marcador as células presentes (Figura 12B).

Estes valores demonstram que este tipo de marcador de superfície não é sugerido à linhagem de células tronco germinativas embrionárias caninas, pois embora tenha ocorrido à marcação celular esta não foi significativa; porém é necessário ressaltar que isso ocorreu devido a este marcador ter especificidade por células hematopoiéticas e não pelo fato destas células terem sido mantidas por longo período de cultura 'in vitro'.

File: A-1 so cels ajust.015
 Sample ID: A-1 so cels ajust
 Gate: No Gate
 Total Events: 10000

Log Data Units: Linear Values
 Acquisition Date: 24-May-05
 Gated Events: 10000
 X Parameter: FL1-H (Log)

Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean
All	1, 9910	10000	100.00	100.00	1.47
M1	62, 9910	2	0.02	0.02	70.64

File: A-1 cd34 1;100 ajust.017
 Sample ID: A-1 cd34 1;100 ajust
 Gate: No Gate
 Total Events: 10000

Log Data Units: Linear Values
 Acquisition Date: 24-May-05
 Gated Events: 10000
 X Parameter: FL1-H (Log)

Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean
All	1, 9910	10000	100.00	100.00	23.13
M1	103, 9306	181	1.81	1.81	995.56

Figura 9 - Gráficos ilustrativos demonstrando a marcação celular por CD34, no embrião classificado A1.1

File: A-2 so cells ajust.007 Log Data Units: Linear Value
 Sample ID: A-2 so cells ajust. Acquisition Date: 24-May-05
 Gate: No Gate Gated Events: 10000
 Total Events: 10000 X Parameter: FL1-H (Log)

Marker	Left	Right	Events	% Gated	% Total	Mean
All	1.9910		10000	100.00	100.00	5.49
M1	95.9731		40	0.40	0.40	119.00

File: A-2 cd34 1;100 ajust.009 Log Data Units: Linear Value
 Sample ID: A-2 cd34 1;100 ajust. Acquisition Date: 24-May-05
 Gate: No Gate Gated Events: 10000
 Total Events: 10000 X Parameter: FL1-H (Log)

Marker	Left	Right	Events	% Gated	% Total	Mean
All	1.9910		10000	100.00	100.00	67.68
M1	96.9910		455	4.55	4.55	1267.59

Figura 10 - Gráficos ilustrativos demonstrando a marcação celular por CD34, no embrião classificado A2.2

File: A-3 so cels ajust.011
 Sample ID: A-3 so cels ajust
 Gate: No Gate
 Total Events: 10000

Log Data Units: Linear Values
 Acquisition Date: 24-May-05
 Gated Events: 10000
 X Parameter: FL1-H (Log)

Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean
All	1, 9910	10000	100.00	100.00	1.42
M1	80, 9910	1	0.01	0.01	80.58

File: A-3 cd34 1;100 ajust.014
 Sample ID: A-3 cd34 1;100 ajust
 Gate: No Gate
 Total Events: 10000

Log Data Units: Linear Values
 Acquisition Date: 24-May-05
 Gated Events: 10000
 X Parameter: FL1-H (Log)

Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean
All	1, 9910	10000	100.00	100.00	27.71
M1	96, 9910	232	2.32	2.32	889.70

Figura 11 - Gráficos ilustrativos demonstrando a marcação celular por CD34, no embrião classificado A2.3

File: A-4 so cels.001 Log Data Units: Linear Values
 Sample ID: A-4 so cels Acquisition Date: 24-May-05
 Gate: No Gate Gated Events: 10000
 Total Events: 10000 X Parameter: FL1-H (Log)

Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean
All	1, 9910	10000	100.00	100.00	3.25
M1	91, 9910	11	0.11	0.11	174.05

File: A-4 cd34 1;100 ajust.006 Log Data Units: Linear Values
 Sample ID: A-4 cd34 1;100 ajust Acquisition Date: 24-May-05
 Gate: No Gate Gated Events: 10000
 Total Events: 10000 X Parameter: FL1-H (Log)

Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean
All	1, 9910	10000	100.00	100.00	38.66
M1	85, 9910	71	0.71	0.71	4829.50

Figura 12 - Gráficos ilustrativos demonstrando a marcação celular por CD34, no embrião classificado A2.4

5.4 Obtenção e Cultivo de Células Musculares Caninas

Os fragmentos musculares de cães adultos colocados em cultivo proliferaram de forma eficiente, sendo que após 48 horas notamos que células hematopoiéticas oriundas dos fragmentos musculares começaram a ser expelidas, e originaram um tipo celular, caracterizado por hemácias (Figura 13). Tais células preencheram cerca de 80% de toda a área a ser cultivada, sendo que conforme era efetuado a troca do meio de cultivo estas foram descartadas.

Após 144 horas de cultivo, as garrafas apresentaram dois diferentes tipos celulares, próximo aos fragmentos musculares encontramos hemácias persistentes as trocas do meio (Figura 14A e B) e mais afastados dos fragmentos visualizamos células fusiformes mononucleadas, denominadas mioblastos (Figura 14C). Este tipo celular mostrou-se nesta fase em fusão celular intensa (Figura 14D), caracterizando elevada atividade mitótica (Figura 19).

O cultivo muscular se manteve por mais 152 horas, totalizando 176 horas de manutenção “in vitro”, no qual encontramos os fragmentos apresentando-se totalmente na forma de células arredondadas (Figura 15A e 15B). O recrutamento celular tornou-se mais evidente (Figura 15C), no qual visualizamos uma maior quantidade de células satélites obedecendo ao fator quimiotático exercido pelos mioblastos. Nesta fase os mioblastos iniciaram um processo de paralelismo celular, o que esboça a disposição de uma célula muscular esquelética (Figura 15D).

Com 16 dias de cultivo, ou seja, 480 horas; começaram, a apresentar falência mitótica (Figura 16A). As células que antes começaram o processo de paralelismo, agora se apresentaram na forma de miotubos (Figura 16C). Os mioblastos, ou seja, as células mononucleares fundiram-se formando células multinucleadas, denominadas células musculares, as quais apresentaram-se grandes e com a presença de elevada quantidade de filamentos citoplasmáticos em uma única célula muscular (Figura 16B e 16D).

Para que não houvesse o comprometimento das células musculares perante a morte dos fragmentos, optamos por transferir alguns fragmentos ainda vivos a outra

garrafa de cultivo, o que nos levou a encontramos, após 240 horas do repique, grande quantidade de células satélites espalhadas pelas garrafas (Figura 18A e 18B). Esta disposição não foi muito alterada durante as 240 horas seguintes, quando as células ainda se mantiveram sem diferenciação (Figura 17).

Figura 13 - Fotomicrografias de músculo com 2 dias de cultivo celular, no qual evidenciamos a presença de hemácias (setas em figura **C** e **D**) e a presença de possíveis células satélites liberadas pelos fragmentos musculares (setas em figura **A** e **B**). Barra = **A** e **B** 50 μm e **C** e **D** 25 μm

Figura 14 - Fotomicrografias de músculo com 6 dias de cultivo celular. Elucidamos em A a presença de hemácias, em B a presença de células em diferenciação, em C e D mioblastos em fusão. Barra = A, C e D 25 μ m e em B 50 μ m

Figura 15 - Fotomicrografias de músculo com 9 dias de cultivo celular. As fotomicrografias A e B diferem apenas pelo aumento da objetiva, sendo em A demonstrado a dissociação do fragmento e em B o elevado número de hemácias. Em C demonstramos o quimiotaxicismo que o mioblasto exerce sobre células indiferenciadas e em D visualizamos os mioblastos iniciando um processo de paralelismo, para formação de um miotubos. Barra = A 50 μ m e em B, C e D 25 μ m.

Figura 16 - Fotomicrografias de músculo com 20 dias de cultivo celular. Em A demonstramos a morte do fragmento muscular, as fotomicrografias B e D diferem apenas pelo aumento da objetiva, nestas elucidamos a presença de células musculares com seus prolongamentos, e em C elucidamos a presença de um miotubo. Barra = A 50µm e em B, C e D 25 µm

Figura 17 - Fotomicrografias de músculo 20 dias após o primeiro repique manual. As fotomicrografias em diferentes aumentos mostram que houve o desprendimento de células satélites após o primeiro repique. Barra = A 50 μ m e em B, C e D 25 μ m

Figura 19 - Fotomicrografia de músculo com 6 dias de cultivo celular evidenciando uma célula miogênica em divisão nuclear, célula em mitose. Barra = 25 μ m

Figura 18 - Fotomicrografias de cultivo muscular 10 dias após o primeiro repique manual. As fotomicrografias em diferentes aumentos mostram que não ocorreu morte de fragmentos musculares e houve o desprendimento de células após o primeiro repique. Barra = A e B 25 μ m

5.4.1 Co-Culturas de Células Musculares Distróficas e Células Tronco Embrionárias Germinativas

A elaboração do co-cultivo ou co-cultura deu-se de forma satisfatória; pois com essa técnica verificamos o comportamento de dois tipos celulares em diferentes períodos de tempo.

As células tronco embrionárias germinativas (PGCs) apresentaram os núcleos corados com DAPI¹⁴ em azul (Figuras 20B, 21B e 22B), elucidando que em condições normais de expansão celular “*in vitro*”, tanto os mioblastos quanto as células tronco embrionária germinativas desenvolveram-se, independente do meio utilizado, uma vez que as culturas foram mantidas em meio DEMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino, o que não é indicado para manutenção de PGCs.

Os mioblastos em co-cultura apresentaram com 48 horas, lenta proliferação (Figura 20A), porém em contrapartida, o processo de quimiotaxia exercido pelas células precursoras de músculos nas células tronco germinativas embrionárias iniciou-se de forma intensa (Figura 20C). A partir das 96 horas, a quimiotaxia tornou-se mais evidente, devido à formação de nichos de células compostos por mioblastos e células tronco embrionárias germinativas (Figura 21C).

A intensa proliferação celular fez os nichos atraírem cada vez mais células tronco germinativas (Figura 22A e 22B) e os mioblastos, os quais se encontravam em alta proliferação, deu origem ao início da fusão celular, retratado pela ativação de sincícios multicelulares (Figura 22C). Todavia a partir do 7º dia de co-cultivo, as células tronco embrionárias germinativas e os mioblastos apresentaram involução no processo, caracterizando morte celular.

¹⁴ Bisbenzimidide H333342, Sigma cat. 2261

Figura 20 - Fotomicrografias de co-cultura com 48 horas. Em (A) identificamos no campo de luz halogenica, os prolongamentos dos mioblastos (setas vermelhas), em (B) no campo de luz fluorescente, os núcleos das células tronco embrionárias germinativas coradas em azul (setas brancas) e na figura (C) a sobreposição das fotomicrografias A e B, demonstrando o não fusão celular (setas brancas)

Figura 21 - Fotomicrografias de co-cultura com 96 horas. Em (A) identificamos no campo de luz halogenica, os prolongamentos dos mioblastos (setas vermelhas), em (B) no campo de luz fluorescente, os núcleos das células tronco embrionárias germinativas coradas em azul (setas brancas) e na figura (C) a sobreposição das fotomicrografias A e B, demonstram as células tronco embrionárias germinativas dentro dos nichos celulares (setas brancas)

Figura 22 - Fotomicrografias de co-cultura com 144 horas. Em (A) identificamos no campo de luz halogenica, os prolongamentos dos mioblastos (setas vermelhas), em (B) no campo de luz fluorescente, os núcleos das células tronco embrionárias germinativas coradas em azul (círculos e seta branca) e na figura (C) a sobreposição das fotomicrografias A e B, demonstrando a fusão das células através da ativação do sincício multicelular (seta branca no detalhe) e do acumulo de células com núcleo azul no nicho dos mioblastos (circulo)

5.5 Reação de Imunohistoquímica para Detecção de Oct-4

Os componentes somáticos das gônadas foram identificados através de anticorpo específico para linhagens primitivas celulares (células germinativas) e da organização estrutural do órgão. Através das análises morfológicas das células identificamos nas diferentes idades gestacionais, 2 populações de células germinativas. A população Tipo 1, apresentou núcleos grandes com proeminentes nucléolos e citoplasma translúcido, identificando esse tipo celular como gonócito. Entretanto a população Tipo 2, foi identificada pela presença de núcleos grandes, irregulares sem visualização dos nucléolos e presença de citoplasma claro, elucidando uma típica célula tronco embrionárias germinativas.

O animal identificado A1 apresentou-se com aproximadamente 21/22 dias de gestação, demonstrado através da indiferenciação da região paramesonéfrica, na qual destacamos a imunopositividade para Oct-4 desta região (Figura 23A e B). O animal A2, com aproximadamente 23 dias de gestação com formação do rim primitivo e, gônadas (Figura 24A e 25A), e o esboço da formação dos cordões testiculares, além da presença das células de sustentação (Figura 25B e 25C). Nesta fase encontramos predominantemente células imunopositivas para Oct-4, bem como a presença de células do Tipo 1 afastadas da periferia do órgão e a identificação de células do tipo 2 encontradas próximas a membrana basal do esboço do cordão testicular (Figura 25D e 25E)).

No embrião A3 (25 dias de idade gestacional) evidenciamos a formação do rim primitivo e o desenvolvimento das gônadas (Figura 24B) demonstrado pela aproximação dos cordões testiculares (Figura 26B). Neste estágio, o embrião apresentou predominância de células do Tipo 1 imunonegativas para Oct-4 encontradas na periferia do cordão testicular e as células do Tipo 2 apresentaram-se em menor quantidade, porém mantiveram-se imunopositivas para Oct-4 (Figura 26A, 26C e 26D).

Figura 23 -: Fotomicrografia do embrião canino A1 de aproximadamente 21/22 dias de idade gestacional. Em A elucidamos a região paramesonéfrica e em B demonstramos a imunopositividade deste órgão para Oct-4 nesta fase gestacional. Barra = 1000 μ m

Figura 24 -: Fotomicrografias de embriões caninos, elucidando a formação das gônadas e rim primitivo em diferentes idades (círculos), em (A) embrião A2 com 23 dias de idade e em (B) embrião A3 com 25 dias de idades. Barra = 1000 μ m

Figura 25 - Fotomicrografias identificando as células Oct-4 positivas em embriões caninos com 23 dias. Na figura (A) visualizamos o rim primitivo (Rp) e a gônada com os cordões testiculares (círculos), em (B controle) e (C) identificamos as células basais (setas) margeando os cordões testiculares, notar a predominância de células imunopositivas. Na figura (D controle) e (E) visualizamos os gonócitos (1) com nucléolos proeminentes, e as células tronco germinativas embrionárias (2) na periferia dos cordões testiculares. Barra = A 200 µm; B, C e D 40 µm e E 100 µm

Figura 26: Fotomicrografias identificando as células Oct-4 positivas em embriões caninos com 25 dias. Na figura (A) visualizamos a pequena quantidade de células imunopositivas para Oct-4 presentes na periferia do cordão testicular, em (B) identificamos os cordões testiculares, (C) demonstra, diminuição relativa a quantidade células basais entre os cordões (seta), bem como a mudança no posicionamento dos gonocitos (1), agora presentes na periferia dos cordões testiculares e diminuição relativa nas células tronco embrionárias germinativas (2), na figura (D) fica explicita a maior quantidade de células tipo 1 imunopositivas presentes nos cordões testiculares. Barra = A 100 μ m; B 50 μ m e C e D 40 μ m

6 DISCUSSÃO

A obtenção de embriões caninos foi elaborada à partir do acompanhamento e análise do ciclo estral e prenhez das cadelas; as quais foram inseminadas artificialmente. A coleta de material fez-se 30 dias após a segunda inseminação artificial, para que o conceito obtivesse 23 dias de vida, indo ao encontro de Concannon, Tsutsui e Shille (2001) que relatam o tamanho do embrião maior que 2 milímetros, como visto em nossas amostras; porém contrapomos o descrito por Evans e Sack (1973) em relação as estruturas formadas nesta idade gestacional, pois os embriões caninos coletados não apresentaram os membros torácicos e pélvicos formados, apenas o esboço de suas cartilagens estavam evidenciadas.

De outra parte, ao analisarmos a forma do embrião, verificamos que estes apresentaram forma da letra “C”, como encontrado por Evans e Sack (1973). Tais dados são contraditórios, pois usamos o dia 0 após a inseminação artificial e consideramos o período de 7 dias para ocorrência da ovulação e fertilização na cadela, dado este específico da espécie em questão. Mediante análise histológica dos embriões acima de 23 dias de idade foi possível verificar a presença das gônadas e do rim primitivo, de forma compacta, como descrito por Gaskell et al. (2004) para humanos e camundongos.

A escolha de substâncias e suplementos utilizados no cultivo celular, consiste em um fator determinante de sucesso na caracterização, manutenção e armazenamento das células tronco. Portanto a escolha do meio de cultivo deve corresponder o propósito determinado, sendo assim nosso método afirma o relatado por Laslett, Filipczyk e Pera (2003) e Amit et al. (2000) para células tronco humanas, os quais descrevem a utilização de DMEM, aminoácidos não essenciais, L-glutamina, β -mercaptoetanol; porém em nossos experimentos não utilizamos Soro fetal bovino e nem KnockOut; por outro lado suplementamos o meio para cultivo celular com nucleosídeos e antibióticos, o que não foi descrito na literatura citada.

As células foram cultivadas em diferentes meios contendo diferentes suplementos, assim como o descrito por Robertis e Robertis Jr (1993) os quais descrevem as diferentes possibilidades de meios para cultivo celular.

Em relação à cultura de fibroblastos caninos, constatamos que estes possuem citoplasma irregular, núcleo claro, grande e ovóide, aspecto este igualmente enfatizado por Junqueira e Carneiro (1990) sobre fibroblastos de mamíferos em geral quando este os menciona como sendo a célula mais comum no tecido conjuntivo.

Com relação à obtenção de colônias multicelulares de células germinativas embrionárias caninas, podemos descrever a semelhança existente no período de obtenção destas células em camundongos, como relatado por Durcova-Hills, Ainscough e McLaren (2001), os quais descreveram a coleta das células germinativas embrionárias no 8 a 8.5 dias pós coito. Correlacionando os períodos gestacionais encontraremos que: camundongos possuem 21 dias de gestação enquanto que cadelas possuem 61 dias de gestação; sendo assim as células germinativas embrionárias caninas estão presentes no 23º e 24º dias de vida do embrião respectivamente.

Como sugerido por Ginsburg, Snow e McLaren (1990) a distribuição das células germinativas primordiais de camundongos está relacionada com o movimento feito pelas células que migram do saco amniótico para a região do mesoderma extraembrionário, sendo assim optamos pela retirada das células germinativas embrionárias caninas da região paramesonéfrica uma vez que esta região apresenta sua formação com células oriundas do mesoderma extraembrionário.

As células germinativas embrionárias foram detectadas em cães com aproximadamente 23 dias de idade, na região compreendida do rim primitivo e distribuídas aleatoriamente nas gônadas, como descrito por Lawson e Hage (1994) para ratos, Rooij e Dissel-Emiliani (1997) e De Felici (2000) em camundongos, demonstrando que a migração celular ocorre em um período similar tanto em cães como em humanos, descritos por Sadler (2004).

De acordo com Trounson (2001) as células tronco germinativas embrionárias humanas são bem produzidas através das gônadas fetais, assim confirmando os nossos relatos, pois a obtenção destas células deu-se principalmente nos somitos

localizados próximos a região de formação das gônadas fetais caninas, ou seja, na região paramesonéfrica.

A análise morfológica das células tronco germinativas embrionárias caninas são caracterizadas como colônias compactas e com células mononucleares indiferenciadas arredondadas, como referido por Thonson e Odorico (2000) para humanos, Chiquoine (1954), Durcova-Hills, Ainscough e McLaren (2001) e Saitou, Barton e Surani (2002) para camundongos. A inabilidade de manutenção das células germinativas embrionárias caninas por longos períodos foi também encontrada por Saitou, Barton e Surani (2002) em análise de células germinativas em camundongos.

A proliferação de células satélites a partir da implantação dos fragmentos foi demonstrada pela ativação das células quiescentes presentes na lâmina basal do músculo, assim como demonstrado para vertebrados por Junqueira e Carneiro (1995), Morgan (1993) e Albert et al. (1997).

As células satélites apresentam-se como células arredondadas assim como esquema utilizado por Morgan e Watt (1993) que foi descrito em vertebrados. Estas células mantiveram-se indiferenciadas por um pequeno período de cultivo, no qual iniciou-se a diferenciação em mioblastos assim como em humanos, descrito por Radojevic, Lins e Burgunder (2000) quando descreve o tempo aproximado de cultivo para início da diferenciação celular e Alberts, Bray, Lewis, Raff, Roberts e Watson (1997) quando menciona a diferenciação em vertebrados.

Assim como descrito por Junqueira e Carneiro (1995) para vertebrados as células mioblásticas caracterizam-se como sendo células mononucleadas e fusiformes. Estas células apresentam elevada atividade mitótica e com isso alta fusão celular, formando células multinucleadas como observado em vertebrados por Morgan e Watt (1993), Junqueira e Carneiro (1995), Alberts, Bray, Lewis, Raff, Roberts e Watson (1997) e em humanos por Radojevic, Lins e Burgunder (2000) e Guyton (2001).

Os mioblastos dispõem-se paralelamente para formar as fibras musculares, como relatado por Junqueira e Carneiro (1995) em vertebrados, as fibras musculares formadas apresentam-se grandes, multinucleadas e com grande quantidade de filamentos citoplasmáticos, assim como demonstrado em vertebrados por Junqueira e Carneiro (1995) e Alberts, Bray, Lewis, Raff, Roberts e Watson (1997), em humanos por

Radojevic, Lins e Burgunder (2000) e em camundongos por Collins (2006), sendo que o diâmetro das fibras musculares esqueléticas caracteriza-se por ser de tamanho variável como considerado em vertebrados por Brooke (1969a,d) e Junqueira e Carneiro (1995).

As células presentes em nossa co-culturas originaram-se de tecido animal como o referido por Peres (2005) e demonstramos que o contato entre tipos celulares diferentes pode induzir a diferenciação de certos tipos celulares como relatado por Condorelli, Borello, De Angelis et al. (2001) em ratos e Silva (2005) em humanos.

As células germinativas embrionária caninas e as células musculares esqueléticas caninas quando colocadas em co-cultivo fundiram-se rapidamente, como o descrito por Silva (2005) que relata a visível mudança de morfologia celular de células de cordão umbilical humana colocadas em cultivo com células musculares esqueléticas humanas, porém nossos achados não correlacionam com o descrito por Condorelli, Borello, De Angelis et al. (2001), devido a estes autores descreverem a diferenciação das células endoteliais humanas em cardiomiocitos, isto deve-se ao tempo de co-cultivo referido por tais autores, que são superiores ao nosso tempo de observação.

Concordamos com o relatado por Jaroszeski e Radcliff (1999) apud VIEIRA et al (2003), os quais descrevem a citometria como essencial para uma análise física das células, através de marcação com anticorpos monoclonais fluorescentes.

Assim como descrito por Surani (2001), afirmamos que as células tronco germinativas embrionárias possuem pluripotencialidade, porém vamos ao encontro do descrito em humanos pelos autores Guo, Lubbert e Engelhardt (2003) e Gordon et al (2006), os quais afirmam que o marcador de superfície $CD34^{+}$ apresenta alta especificidade para células oriundas de linhagens hematopoieticas, porém nossos dados demonstram a inespecificidade destas células com o marcador $CD34^{-}$, como descrito por Guo, Lubbert e Engelhardt (2003) descrito em humanos.

O Oct-4 uma proteína aminoácida descrita inicialmente em camundongos por Okamoto et al. (1990) e também descrita em cães em nosso experimento. Após a análise morfológica das células presentes nas gônadas caninas foi possível identificar dois diferentes tipos celulares concordando com o descrito por Watenberg (1981) e Gaskell et al (2004) para humanos, que relatam a existência de duas subpopulações;

todavia caminhamos de encontro com o descrito por Fukuda, Heinger e Groscurth (1975), o qual relata a existência de três subpopulações em fetos humanos.

A primeira subpopulação encontrada apresentou-se similar ao descrito por Holstein et al (1987) que descreve em humanos células com grandes núcleos e proeminetes nucléolos chamadas gonocitos, bem como o descrito por Fukuda, Heinger e Groscurth (1975) que descrevem um tipo celular denominado gonocito em fetos humanos. A segunda subpopulação descrita relaciona-se com o relatado por Gaskell et al (2004) que apresentam células germinativas embrionárias humanas propriamente ditas na periferia do órgão.

Nossas observações mostraram que as diferentes subpopulações de células germinativas embrionárias caninas apresentam imunopositividade ao Oct-4, como discutido por Kurschstein e Skriboll (2001) em camundongos, Gaskell et al (2004), em humanos, Kehler et al (2004) em camundongos. Entretanto essa imunopositividade apresenta mudanças de acordo com a idade do embrião, assim como o descrito por Fukuda, Heinger e Groscurth (1975) que relata as diferenças da pluripotencialidade celular em humanos; apenas algumas células apresentam como o descrito por Pesce e Schöler (2000) a manutenção da expressão de Oct-4 com o amadurecimento das gonadas. Sendo assim observamos que com o avanço do desenvolvimento embrionário canino as subpopulações apresentaram uma diminuição na imunopositividade ao Oct-4.

7. CONCLUSÕES

- A extração, preparação e manutenção de fibroblastos embrionários caninos é totalmente viável e aceitável;
- o meio SSpam não apresentou boa proliferação celular, tornando-se não indicado para cultivo de células germinativas embrionárias;
- o meio ES-cells apresentou ótima proliferação celular;
- as células tronco germinativas embrionárias não necessitam de monocamada para adesão celular;
- as células tronco germinativas embrionárias apresentaram como principal problema a manutenção das culturas por períodos significativos;
- as células tronco germinativas embrionárias apresentaram colônias compactas e com alta proliferação de células mononucleares indiferenciadas;
- o meio DMEM, suplementado com 10% de soro fetal bovino, mostrou-se ideal para o cultivo de células musculares sangüíneas;
- as células musculares caninas, desenvolvem-se à partir de células satélites, oriundas dos fragmentos musculares;
- as células tronco germinativas embrionárias apresentaram marcação inexpressiva ao marcador de superfície CD34

- a co-cultura entre células musculares caninas e células germinativas embrionárias ocorre de forma clara, porém por um curto período de tempo;
- aos 22 dias de idade gestacional a região paramesonéfrica apresenta-se indiferenciada, diferentemente do que encontramos com 24 dias de idade, no qual o rim primitivo apresenta-se visível diferenciado;
- o anticorpo Oct-4 é expressivo em cães
- de acordo com a idade gestacional, os fetos caninos apresentam diferenças significativas quanto à localização de células Oct-4 imunopositivas;
- células tronco germinativas embrionárias devem ser repicadas em cultivo a cada 48 horas, para evitar a diferenciação;
- fetos caninos apresentam duas subpopulações de células germinativas: gonócitos e células germinativas embrionárias propriamente ditas.

REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. **Celular and molecular imunology**. 5.ed. Philadelphia: Sauderns, cap. 2,p. 19-39;1991. cap. 2, p.19-39.

ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M. **Biologia molecular da célula**. 3 ed. Porto Alegre: Artes Medicas. p. 444-445 e1176-1177, 1997.

AMIT, M.; CARPENTER, M.K.; INOKUMA, M.S.; CHIU, C.P.; HARRIS, C. P.; WAKNITZ, M.A.;ITZKOVITZ-ELDOR, J.; THOMSON, J. A. Clonally derived human embryonic stem cell lines maintain pluripotency and proliferative potencial for prolonged periods of culture. **Developmental Biology**, v. 227, p. 271-278, 2000.

BERGMAN, R. L.; INZANA, K. D.; MONROE, W. E.; SHELL, L. G.; LIU, L. A ; ENGVALL, E.; SHELTON, G. D. Dystrophin deficient muscular dystrophy in a Labrador retriever. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 38, p. 255-261, 2002.

BOGDANOVICH, S.; PERKINS, K. J.; KRAG, T. O.; KHURANA, T. S. Therapeutics for Duchenne muscular dystrophy: current approaches and future directions. **Journal of Molecular Medicine**, v. 82, n. 2, p.102-115, 2004.

BROOKE , M. H.; ENGEL, W. K. The Histogramic analysis of human muscle biopsies with regard to fiber types 1. Adult male e female. **Neurology**, Haderstown, v. 19, p. 221-223, 1969a.

BROOKE , M. H.; ENGEL, W. K. The Histogramic analysis of human muscle biopsies with regard to fiber types 1. Children's biopsies. **Neurology**, Haderstown, v. 19, p. 591-605, 1969d.

BULFIELD, G.; SILLER, W. G.; WIGHT, P. A. L.; MOORE, K. S. X-cromossome-linked muscular dystrophy (MDX) in the mouse. **Proccedings of the national academy of sciences of the United Stetes of America**, v. 81, p. 1189-1192, 1984.

CAMIRAND, G.; CARON, N.S.; ASSELIN, I.; TREMBLAY, J. P. Combined immunossupression of mycophanolate mofetil and FK 506 for myoblast transplantation in mdx mice. **Transplantation**, v. 72, p. 38-44, 2001.

CARPTER, J. L.; HOFFMAN, E. P.; ROMANUL, F. C. feline muscular dystrophy with dystrophin deficiency. **American Journal of Pathology**, v. 135, p. 909-919, 1989.

CHILDERS, M. K.; OKAMURA, C. S.; BOGAN, D. J.; BOGAN, J. R.; PETROSKI, G. F.; MCDONALD, K.; KORNEGAY, J. N. Eccentric contraction injury in dystrophic canine muscle. **Archives of Physical Medicine and Rehabilitation**, v. 83, p. 1572-1578, 2002.

CHIQUELINE, A. D. The identification, origin, and migration of the primordial germ cells in the mouse embryo. **The Anatomical Record**, v. 118, n° 2, Feb., p. 135-145, 1954.

COLLINS, C. A. Satellite cell self-renewal. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 6, p. 1-6, 2006.

CONCANNON, P.; TSUTSUI, T.; SHILLE, V. Embryo development, hormonal requirements and maternal responses during canine pregnancy. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 57, p. 169-179, 2001.

CONDORELLI, G.; BORELLO, U.; DE ANGELIS, L. G.; LATRONICO, M.; SIRABELLA, D.; COLETTA, M.; GALLI, R.; BALCONI, G.; FOLLENZI, A.; FRATI, G.; CUSELLA DE ANGELIS, M. G.; GIOGLIO, L.; AMUCHASTEGUI, S.; ADORINI, L.; NALDINI, L.; VESCOVI, A.; DEJANA, E.; COSSU, G. Cardiomyocytes induce endothelial cells to trans-differentiate into cardiac muscle: Implications for myocardium regeneration. **Proceedings of the national Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 19, p. 10738-10738, 2001.

DE FELICI, M. Regulation of primordial germ cell development in the mouse. **International Journal of Development Biology**, v. 44, p. 575-580, 2000.

DUBOWITZ, V. Normal Muscle. In: DUBOWITZ, V. **Muscle biopsy – a practical approach**, 2. ed. London: Bailliere Tindall, 1985, cap. 3, p. 41-81.

DURCOVA-HILLS, G.; AINSCOUGH, J. F. X.; MCLAREN, A. Pluripotent stem cells derived from migrating primordial germ cells. **Differentiation**, v. 68, p. 220-226, 2001.

EMERY, A. E. H. **Duchenne muscular dystrophy**, 2. ed. Oxford: Oxford University Press, 1991.

EVANS, H. E.; SACH, W. O. Prenatal development of domestic and laboratory mammals: growth curves, external features and selected references. **Anatomy, Histology and Embryology**, v. 2, p. 11-45, 1973.

FLETCHER, S.; WILTON, S. D.; HOWELL, J. M. Gene therapy and molecular approaches to the treatment of hereditary muscular disorders. **Current option in Neurology**, v. 13, p. 553-560, 2003.

FUCHS, E.; SEGRE, J. Stem cell: a new lease on life. **Cell**, v. 100, p. 143-155, 2000.

FUKUDA, T.; HEDINGER, C.; GROSCURTH, P. Ultrastructure of developing germ cells in fetal human testis. **Cell Tissue Research**, v. 161, p. 55-70, 1975.

GASKELL, T. L.; GESNAL, A.; ROBINSON, L. L. L.; ANDERSON, R. A.; SAUNDERS, P. T. Immunohistochemical profiling of germ cells within the human

fetal testis: Identification of three subpopulation. **Biology of Reproduction**, v. 71, p. 2012-2021, 2004.

GINSBURG, M.; SONW, M. H. L.; McLAREN, A. primordial germ cell in the mouse embryo during gastrulation. **Development**, v. 110, p. 521-528, 1990.

GORDON, M. Y.; LEVICAR, N.; PAI, M.; BACHELLIER, P.; DIMARAKIS, I.; AL-ALLAF, F.; M'HAMDI, H.; THALJI, T.; WELSH, J. P.; MARLEY, S. B.; DAVIES, J.; DAZZI, F.; MARELLI-BERG, F.; TAIT, P.; PLAYFORD, R.; JIAO, L.; JENSEN, S.; NICHOLLS, J. P.; AYAV, A.; NOHANDANI, M.; FARZANEH, F.; GAKEN, J.; DODGE, R.; ALISON, M.; APPERLEY, J. F.; LECHLER, R.; HABIB, N. A. Characterisation and clinical application of human CD34⁺ stem/progenitor cell populations mobilised into the blood by G-CSF. **Stem cells**, v. 24, n. 7, p. 1822-1830, 2006.

GOU, Y.; LUBBERT, M.; ENGELHARDT, M. CD34⁺ hematopoietic stem cells: Current concepts and controversis. **Stem Cells**, v. 21, p. 15-20, 2003.

GRINDEM, C. B. Blood cell markers. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 26, n. 5, p.1043-1065, 1996.

GUYTON, A. C. **Tratado de fisiologia médica**. 10. ed. Rio de Janeiro: Interamericana, 2001.

HADJANTONAKIS, A. K.; PAPAIOANNOU, V. E. The stem cells of early embryos. **Differentiation**, v. 68, p. 156-166, 2001.

HOFFMAN, E.; BROWN, R. J.; KUNKEL, L. Diystrophin: The protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. **Cells**, v. 51, p. 919-928, 1987.

HOFFMAN, E. P.; GOROSPC, J. R. M. The animal models of Duchenne muscular dystrophy ? Windows on the pathophysiological consequences of dystrofin deficiency. **Current topics in membranes**, v. 38, p. 113-154, 1991.

HOLSTEIN, A.; SCHUTTE, B.; BECKER, H.; HARTMANN, M. morphology of normal and malignat germ cells. **International Journal of Andrology**, v. 10, p. 1-18, 1978.

HORWITZ, E. M.; PROCKOP, D. J.; FITZPATRICK, L. A.; KOO, W. W.; GORDON, P. L.; NELL, M.; SUSSMAN, M.; ORCHARD, P.; MARX, J. P.; PYERITZ, R. E.; BRENNER, M. K. Transplantability and therapeutic effects of bone narrow derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta. **Nature Medicine**, v. 5, p. 309-315, 1999.

HOWELL, J. MCC.; FLETCHER, S.; KAKULAS, B. A.; O'HARA, M.; LOCHMULLER, H.; KARPATI, G. Use of the dog model for Duchenne muscular dystrophy in gene therapy trials. **Neuromuscular Disorders**, v. 7, p. 325-328, 1997.

IWANNCZAK, F.; STAWARSKI, A.; POTYRALA, M.; SIEDLECKA-DAWIDKO, J.; AGRAWAL, G. S. Early symptoms of Duchenne muscular dystrophy – description of cases of an 18-month-old and an 8-year-old patient. **Medical Science Monitoring**, v. 6, n. 3, p. 592-593, 2000.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica** 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara p. 65-71, 1990.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**, 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1995, cap. 10, p. 159-177.

KEHLER, J.; TOLKUNOVA, E.; KOSCHORZ, B.; PESCE, M.; GENTILE, L.; BOIANI, M.; LOMELÍ, H.; NAGY, A.; MCLAUGHLIN, K. J.; SCHÖLER, H. R.; TOMILIN, A. Oct4 is required for primordial germ cell survival. **EMBO reports**, v. 5, p. 1078-1083, 2004.

KOBAYASHI, N.; NIYAZAKI, M.; FUKAYA, K.; INOVE, Y.; SAKAGUCHI, M.; UEMURA, T.; NOGUCHI, H.; KONDO, A.; TANAKA, N.; NAMBA, N. Transplantation of highly differentiated immortalized human hepatocytes to treat acute liver failure. **Transplantation**, v. 69, p. 202-207, 2000.

KORNEGAY, J. N.; BOGAN, D. J.; BOGAN, J. R.; CHILDERS, M. K.; CUNDIFF, D. D.; PETROSKI, G. F.; SCHUELER, R. O. Contraction force generated by tarsal joint flexion and extension in dogs with Golden Retriever muscular dystrophy. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 166, p. 155-121, 1999.

KURSCHESTEIN, R.; SKIRBOLL, L. R. Stem Cells: Scientific progress and future research directions. Maryland: National Institute of health, Departament of health and human services, 2001, Apendice B1-B11.

LASLETT, A. L.; FILIPCZYK, A. A.; PERA, M. F. Characterization and culture of human embryonic stem cells. **TCM**, v. 13, n. 7, p. 295-301, 2003.

LAWSON, K. A.; HAGE, W. J. Clonal analysis of the oigin of primordial germ cells in the mouse. **Ciba found symp**, v. 182, p. 68-64, 1994.

LEAVITT, B. Repairing the genomic defect in muscular dystrophy. **Clinical Genetics**, v. 58, p. 265-269, 2000.

LIU, J. M. K.; OKAMURA, C. S.; BOGAN, D. J.; BOGAN, J. R.; CHILDERS, M. K.; KORNEGAY, J. N. Effects of prednisone in canine muscular dystrophy. **Muscle & Nerve**, v. 30, p. 767-773, 2004.

MITALIPOV, S. M.; KUO, H. C.; HENNEBOLD, J. D.; WOLF, D. P. OCT-4 Expression in pluripotent cells of the Rhesus monkey. **Biology of Reproduction**, v. 69, p. 1785-1792, 2003.

MOREL, F.; GALY, A. CHEN, B.; SZILVASSY, S. J. Equal distribution of competitive long-term repopulation stem cells in the CD34⁺ and CD34⁻ fractions of

Thy-1^{low}Lin-/lowSca-1⁺ bone marrow cells. **Experimental Hematology**, v. 26, n. 5, p. 440-448, 1998.

MORGAN, J. E.; WATT, D. J. **In molecular cell biology of muscular dystrophy**, Chapman e Hall, London: 1993, p. 303-331.

NGUYEN, F.; CHEREL, Y.; GUIGAND, L.; GOUBAULT-LEROUX, I.; WYERS, M. Muscle lesions associated with dystrophin deficiency in neonatal Golden Retriever puppies. **Journal Compendium of Pathology**, v. 126, n. 2-3, p.100-8, 2002.

NODEN, D. M.; LAHUNTA, A. **Embriología de los animales domésticos: Mecanismos de desarrollo y malformaciones**. Zaragoza: Acribia, 1990, cap. 1, p. 11-25.

ODORICO, J. S.; KAUFMAN, D. S.; THOMSON, J. A. Multilineage differentiation from human embryonic stem cell lines. **Stem Cells**, v. 19, p. 193-204, 2001.

OKAMOTO, K.; OKAZAWA, H.; OKUDA, A.; SAKAI, M.; MURAMATSU, M.; HAMADA, H. A novel octamer binding transcription factor is differentially expressed in mouse embryonic cells. **Cell**. V. 60, p. 461-472, 1990.

PASSOS-BUENO, M. R.; VAINZOF, M.; MARIE, S. K.; ZATZ, M. half the dystrophin gene apparently enough for a mild clinical course: Confirmation of its potential for gene therapy. **Human Molecular Genetics**, v. 3, n. 6, p. 919-922, 1994.

PERES, C. M.; CURI, R. Como cultivar células. In: PERES, C. M. **Co-cultura celulares**. 1. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005, p. 122-125.

PESCE, M.; GROSS, M. K.; SCHÖLER, H. R. In line with our ancestors: OCT-4 and the mammalian germ. **Bioessays**, v. 20, p. 722-732, 1998.

PESCE, M.; SCHÖLER, H. R. OCT-4: Control of totipotency and germ line determination. **Molecular Reproduction and Development**. v. 55, p. 452-457, 2000.

PESCE, M.; SCHÖLER, H. R. OCT-4: Gatekeeper in the beginning of mammalian development. **Stem Cells**. v.19, p. 271-278, 2001.

POTTEN, C. S. Stem Cells. In: ROOJI, D. G.; VAN DISSEL-EMILIANI, F. M. F. **Regulation of proliferation and differentiation of stem cells in the male germ line**. 1997. cap. 9, p.283-314.

POTTEN, C. S. Stem Cells. In: WATT, D. J.; JONES, G. E. **Skeletal muscle stem cells: function and potential role in therapy**, 1997, cap. 14, p. 76-98.

RADOJEVIC, V.; LINS, S.; BURGUNDER, J. M. Differential expression of dystrophin, ultraphin, and dystrophin associated proteins in human muscle culture. **Cell Tissue Research**, v. 300, p. 447-457, 2000.

RESNICK, J. L., BIXLER, L. S., CHENG, L., DONAVAN, P. J. Long-term proliferation of mouse primordial germ cells in culture. **Nature**, v. 359, p. 550-551, 1992.

ROBERTIS, E. D. P., ROBERTIS, JR., E. M. F. **Bases da biologia celular e molecular** 2. ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1993, p.168.

ROITT, I.; BROSTOFF, J.; MALE, D. **Imunologia**. 5. ed. São Paulo: Manole, 1999.

ROSSANT, J. Stem cells from the mammalian blastocyst. **Stem Cells**, v. 19, p. 477-482, 2001.

SADLER, T.W. **Embriologia médica**. 9. ed. Rio de Janeiro: Kanabara Koogan, 2004, p. 3-20; 213-240.

SEALE, P.; ASAKURA, A.; RUDNICKI, M. A. The potential of muscle stem cells. **Developmental Cell**, v. 1, p. 333-334, 2000.

SEALE, P.; RUDNICKI, M.A. A new look at the origen, function, and "Stem Cell" status of muscular satellite cells. **Developmental Biology**, v. 218, n. 2, p. 115-124, 2000.

SHELTON, G.D., LIU, L. A.; GUO, L. T.; SMITH, G. K.; CHRISTIANSEN, J. S.; THOMAS, W. B.; SMITH, M. O.; KLINE, K. L.; MARCH, P. A.; FLEGEL, T.; ENGVALL, E. Muscular dystrophy in female dogs. **Journal Veterinary Internal Medicine**, v.15 (3), p.240-244, may-jun, 2001.

SILVA, T.J. C. **Avaliação *in vitro* do uso potencial de células-tronco no tratamento da distrofia muscular**. 2005. 110p.Tese (Doutorado) – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

SORIA, B.; ROCHE, E.; BERNA, G.; LEON-QUINTO, T.; REIG, J. A; MARTIN, F. Insulin-secreting cells derived from embryonic stem cell mammalize glycemia in streptozotocin-induced diabetic mice. **Diabetes**, v. 49, p. 1410-1412, 1999.

SURANI, M. A. Reprogramning of gemonia function through epigenetic inheritance. **Nature**, v. 414, p. 122-129, 2001.

THOMSON, J. A.; ITSKOWITZ-ELDOR, J.; SHAPIRO, S. S.; WAKNITZ, M. A. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. **Science**, v. 282, p. 1145-1147, 1998.

THOMSON, J. A.; ODORICO, J. S. Human embryonic stem cell and embryonic germ cell lines. **Focus**, v. 18, p. 53-57, 2000.

TROUNSON, A. O. The derivation and potential use of human embryonic stem cells. **Reproduction, Fertility and Development**. v.13 n.7 - 8, p. 523-532, 2001.

TURNPENNY, L.; BRICKWOOD, S.; SPALLUTO, C. M.; PIPER, K. IAIN T. CAMERON, I.T.; WILSON, D.I., HANLEY; N.A. Derivation of human embryonic germ cells: An alternative source of pluripotent stem cells. **Stem Cells**. v. 21, p. 598-609, 2003.

VAINZOF, M.; PASSOS-BUENO, M. R.; CANOVAS, M.; MOREIRA, E. S. PAVANELLO, R. C. M. The sarcoglycan complex in the six autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophies. **Human molecular genetics** v. 5(12), p. 1963-1969, 1996.

VALENTINE, B. A.; COOPER, B. J.; DeLAHUNTA, A.; O'QUINN, R.; BLUE, J.T. et al. Canine x-linked muscular dystrophy. An animal model of Duchenne muscular dystrophy: Clinical studies. **Journal of the neurological Science** v. 88, p. 69-81, 1988.

VIEIRA, M. L.; LAURO, M.; DUSSE, L.M.; MARTINS FILHO, O.H.; CARVALHO, M.G. Otimização da técnica de citometria de fluxo para análise do fator tissular em monócitos de sangue periférico. **Revista brasileira de hematologia e hemoterapia**, São Paulo, v. 25, n. 3, p. 141-147, 2003.

WATENBERG, H. Differentiation and development of testis. **The testis**. 2.ed. Nova York: Raven, 1981, 39-81

WEIMANN, A. **Die Continuität des Keimplasmas als Grundlage einer Theorie der Vererbung**, Jena: Fischer-Verlag, 1885.

YEOM, Y.; FUHRMANN, G.; OVITT, C.E.; BREHM, A.; et al. Germline regulatory element of OCT-4 specific for the totipotent cycle of embryonal cells. **Development** v.122, p. 881-894, 1996.

ZATZ, M.; VAINZOF, M.; PASSOS-BUENO, M. R. limb-girdle muscular dystrophy: One gene with different phenotypes, one phenotype with different genes. **Current Opinion in Neurology**, v. 13, p. 511-517, 2000.

ANEXOS

1 Soluções Estoque

1.1 Meio DMEM-s:

Adicionar um envelope de meio DMEM¹ liofilizado em 1L de água Milli Q, acrescentando-se 3,7g de bicarbonato de sódio, permanecendo em agitação por quinze minutos. Segue-se filtração desta solução em película de 0,22µm de diâmetro, podendo ficar armazenada em geladeira (4°C) por até dois meses.

No momento do uso, adicionar 10% de SFB (v/v), filtrar em película de 0,22µm e guardar em geladeira por até uma semana, sofrendo prévio aquecimento e estabilização em estufa (37°C e 5% de CO₂) antes da utilização para cultivo celular.

¹ GIBCO BRL – cat. nº 12.100-046

1.2 Solução de PUCK'S

Componentes	Quantidade
NaCl	8,00g
KCl	0,40g
NaHCO ₃	0,35g
Glucose	1,00g
Vermelho fenol ¹⁷	0,005g
EDTA	0,2g
Água qsq	1,000ml

Adicionar os componentes sob agitação por quinze minutos, ajustar o pH para 7,2, filtrar em membrana de 0,22µm e estocar a 4°C.

1.3 Solução de L-glutamina (100x concentrada)

Diluir 292mg de L-glutamina² para cada 10ml de água destilada, filtrar em película de 0,22µm e armazenar em freezer (-20°C).

² SIGMA – cat. n°G-3126

1.4 Nucleosídeos

Componentes	Quantidade	
Adenosina ³	80mg	40,0mg
Guanosina ⁴	85mg	42,5mg
Citidina ⁵	73mg	36,5mg
Uridina ⁶	73mg	36,5mg
Timidina ⁷	24mg	12,0mg
Água qsp	100ml	50,0ml

Adicionar os componentes sob agitação por quinze minutos, aquecidos a 37°C para se dissolverem, filtrar em membrana 22µm e estocar a 4°C

³ SIGMA – cat. nº A-4036

⁴ SIGMA – cat. nº G-6264

⁵ SIGMA – cat. nº C-4654

⁶ SIGMA – cat. nº U-3003

⁷ SIGMA – cat. nº T-1895

1.5 Aminoácidos não-essenciais (100x concentrado)

Componentes	10ml	100ml
L-alanina ⁸	8,9mg	89,0mg
L-aspargina ⁹	13,2mg	132,0mg
L-ácido aspártico ¹⁰	13,3mg	133,0mg
L-prolina ¹¹	11,5mg	115,0mg
L-serina ¹²	10,5mg	105,0mg
L-ácido glutâmico ¹³	14,7mg	147,0mg
Glicina ¹⁴	7,5mg	75,0mg

Dissolver os aminoácidos, na ordem em que aparecem, numa solução ácida de HCl 0,2N (p. ex. 5,0ml = 00,36ml de HCl + 4,964ml de água destilada); os dois últimos aminoácidos marcados devem ser dissolvidos separadamente em água destilada, no volume para perfazer o total indicado. As duas soluções devem ser misturadas e filtradas em membrana de 0,22µm e armazenadas em geladeira (4°C).

1.6 Gelatina de pele de suíno (Solução 0,1% em PBS-L)

Diluir 0,1g de gelatina de pele de suíno¹⁵ em 100ml de PBS_L, autoclavar e armazenar em frasco de vidro bem fechado á temperatura ambiente.

⁸SIGMA – cat. nº A-3534

⁹SIGMA – cat. nº A-4284

¹⁰RIEDEL-DE HÁËL – cat nº 27608

¹¹ SIGMA – cat. nº P-4655

¹² SIGMA – cat. nº S-5511

¹³ SIGMA – cat. nº G-5889

¹⁴ SIGMA – cat. nº G-6388

¹⁵ SIGMA – cat. nº G-1890

1.7 Tripsina 2,5% /EDTA 0,4% (10x concentrada)

Componentes	Quantidade
Tripsina ¹⁶ (liofilizada)	2,50g
EDTA	0,40g
NaCl	7,00g
NaHPO ₄ 12H ₂ O	0,30g
KH ₂ PO ₄	0,24g
KCl	0,37g
D-Glicose	1,00g
TRIS	3,00g
Vermelho fenol ¹⁷	0,005ml
Água destilada	100,0ml

Adicionar os componentes sob agitação por quinze minutos, ajustar o pH para 7,6, filtrar em membrana de 0,22µm e estocar a -20°C

Quando do uso, faz-se as diluições necessárias para as concentrações finais de 0,25, 0,125 e 0,0625%, utilizando-se a solução de Puck's (apêndice 1.3)

¹⁶ GIBCO BRL – cat. nº 27250-042

¹⁷ SIGMA – cat. nº P-5530

Soluções para Uso

2 Soluções para uso

2.1 Meio DMEM com SFB a 10%

90% de DMEM sem soro e sem piruvato

10% de soro fetal bovino

antibiótico (50µl para cada 10ml)

Filtrar em membrana 0,22µm e manter em geladeira a 4°C por até uma semana.

2.2 Meio de congelação

45% de DMEM sem soro e sem piruvato

45% de soro fetal bovino

10% de dimetilsulfóxido

antibiótico (50µl para cada 10ml)

Filtrar em membrana 0,22µm e manter em geladeira a 4°C por até uma semana.

2.3 Meio ES-cells¹

	10ml	20ml
DMEM ¹	8,5ml	17ml
Aminoácidos não essenciais (10mM)	100µl	200µl
L-glutamina (200mM)	100µl	200µl
2-mercaptoetanol (0,01mM)	100µl	200µl
Núcleosídeos	100µl	200µl
Antibiótico	100µl	200µl

Misturar os elementos, na ordem que aparecem e filtrar em película de 0,22µm, acondicionar em geladeira (4°C) por uma semana.

2.3 Meio ES-cells²

	10ml	20ml
α-MEM	8,5ml	17ml
Aminoácidos não essenciais (10mM)	100µl	200µl
L-glutamina (200mM)	100µl	200µl
2-mercaptoetanol (0,01mM)	100µl	200µl
Núcleosídeos	100µl	200µl
Antibiótico	100µl	200µl

Misturar os elementos, na ordem que aparecem e filtrar em película de 0,22µm, acondicionar em geladeira (4°C) por uma semana.

2.4 2-Mercaptoetanol

Componentes	Quantidade
2-mercaptoetanol ¹⁸ para uso(0,1mM)	7,2µl
PBS-L	10ml

Filtrar em membrana 0,22µm e manter em geladeira a 4°C por até uma semana.

2.5 Mitomicina C

Para concentração final de 10µg/ml deve-se dissolver 2mg de mitomicina C¹⁹ em 5ml de PBS e acrescentar 195ml de meio DMEM com 5% de SFB. Fazer alíquotas de 4,8 e 10ml embalar em papel alumínio e estocar a -20°C.

2.6 PBS livre de Ca^{+2} e Mg^{+2} (PBS-L)

Componentes	Quantidade
NaCl	10g
KCl	0,25g
$\text{Na}_2\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	1,44g
KH_2PO_4	0,25g

Adicionar os elementos, na ordem em que aparecem, em 1L de água Milli Q, sob agitação por quinze minutos, ajustar o pH para 7,2 e filtrar em membrana de $0,22\mu\text{m}$ e acondicionamento a 4°C .

¹ GIBCO BRL – cat. nº 12.100-046

¹⁸ SIGMA – cat. nº M-7522

¹⁹ SIGMA – cat. nº M-4287