

RUBENS LENE CARVALHO TAVARES

**ESTUDO DA EXPRESSÃO GÊNICA DA
FAMÍLIA DAS INTERLEUCINAS-1 DURANTE O
ISOLAMENTO E DIFERENCIAÇÃO DE
CÉLULAS-TRONCO EMBRIONÁRIAS
DE CAMUNDONGOS**

Tese apresentada à Universidade Federal de
São Paulo - Escola Paulista de Medicina -
para a obtenção do título de Doutor em
Ciências.

São Paulo
2006

Tavares, Rubens Lene Carvalho

Estudo da expressão gênica da família das interleucinas-1 durante o isolamento e diferenciação células-tronco embrionárias de camundongos. /Rubens Lene Carvalho Tavares. – São Paulo, 2006.
xiii, 82f.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina. Programa de pós-graduação em Ginecologia.

Título em inglês: Gene expression study of the interleukin-1 family during isolation and differentiation of mouse embryonic stem cells.

1. Células-tronco embrionárias.
2. Interleucina-1.
3. Implantação embrionária.
4. Diferenciação celular.

RUBENS LENE CARVALHO TAVARES

**ESTUDO DA EXPRESSÃO GÊNICA DA
FAMÍLIA DAS INTERLEUCINAS-1 DURANTE O
ISOLAMENTO E DIFERENCIAÇÃO DE
CÉLULAS-TRONCO EMBRIONÁRIAS
DE CAMUNDONGOS**

Tese apresentada à Universidade Federal de
São Paulo - Escola Paulista de Medicina - para a
obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Ginecologia.

Orientador: Prof. Dr. Vilmon de Freitas.

Co-orientadores: Profa. Dra. Alice Teixeira Ferreira
Prof. Dr. Kangpu Xu

São Paulo
2006

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO
ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE GINECOLOGIA

Chefe do Departamento: Prof. Dr. Afonso Celso Pinto Nazário

Coordenador do Curso de Pós-graduação: Prof. Dr. Vilmon de Freitas

Projeto de pesquisa financiado pela **CAPES** através de bolsa de doutorado *sandwich* -
BEX 1475/03-7.

RUBENS LENE CARVALHO TAVARES

Banca examinadora:

Orientador:

Prof. Dr. Vilmon de Freitas.

Banca:

Prof. Dr. Vilmon de Freitas.

Profa. Dra. Lygia da Veiga Pereira.

Prof. Dr. Fernando Marcos dos Reis.

Prof. Dr. Eduardo Pandolfi Passos.

Prof. Dr. Ismael Dale Cotrim Guerreiro da Silva.

A Deus,
que me treinou insistentemente
para superar os obstáculos inerentes
àqueles que optaram por trabalhar com a ciência.

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. **Vilmon de Freitas** que, frente a todas as nossas dificuldades experimentadas durante a construção e realização deste projeto, esteve sempre confiante no sucesso.

Ao Prof. Dr. **Edmund Chada Baracat** e à Profa. Dra. **Alice Teixeira Ferreira**, pela importante contribuição neste projeto de pesquisa.

Ao Prof. Dr. **Aroldo Fernando Camargos**, estimulador incansável do conhecimento científico.

Ao Prof. Dr. **Kangpu Xu**, chefe do Laboratório de Genética Preimplantacional da Cornell University em Nova Iorque - USA, portador de profundo conhecimento técnico-científico, que me recebeu para a realização do doutorado *sandwich*, com apoio irrestrito à pesquisa.

Ao professor Dr. **Zev Rosenwaks**, diretor do Centro para Medicina Reprodutiva e Infertilidade da Universidade de Cornell, que me recebeu em sua equipe e financiou as pesquisas realizadas.

A toda a equipe da **CAPES**, que viabilizou a realização deste projeto através de bolsa de doutorado *sandwich* - BEX 1475/03-7.

À Sra. **Karin**, secretária do programa de pós-graduação em Ginecologia da UNIFESP da Escola Paulista de Medicina, cuja ajuda foi fundamental na criação deste projeto.

À minha esposa **Tatiana Crepalde Silva**, pela compreensão e eterno incentivo e pela convivência saudável e apaixonada que me impulsiona diariamente.

Aos meus pais, **Francisco de Assis Tavares e Maria de Freitas Carvalho Tavares**, e aos meus **irmãos e familiares**, que sempre me apoiaram na minha profissão médica.

A meu sogro, **José Silvério da Silva**, e à minha sogra, **Maria das Graças Crepalde Silva** (*in memriam*), pelo estímulo constante à luta e certeza contagiante no sucesso deste projeto.

Ao Dr. **Ming Chih Tsai**, *assistant professor* da New York University School of Medicine em Nova York – USA, pelo importante papel na viabilização do doutorado *sandwich* na Cornell University.

A toda a equipe do Laboratório de Reprodução Humana do Hospital das Clínicas da UFMG: Sra. **Maria das Graças R. S. Camargos**, Drs. **Cláudia Navarro, Fernando Reis, Márcia Miranda, Márcia Cristina, Reginaldo Martelo, Augusto Reis, Fábio Peixoto, Francisco Pereira, Inês Cavallo, Estefânia, Carolina, Ana**, Srs. **Marco Aurélio, Fernanda, Eliana** e as alunas de iniciação científica **Vivian e Roberta**.

Aos amigos **Paulo Maia, Carol Rabelo, Luciana de Oliveira, Drs. Adálton de Oliveira, Sama Godim, Lúcio Resende, Gracinda de Oliveira, Aroldo Gonçalves, Alexandre Barra, Juliana Barra**, pelo apoio e incentivo constantes durante o estudo.

À Prof^ª. **Magda Barbosa Roquette Taranto**, pelo excelente trabalho de editoração, correção lingüística e enquadramento nas normas da ABNT realizadas no mestrado e agora no doutorado.

“A história é contada pelos vencedores”

O Código da Vinci - Dan Brown

"Duas coisas são infinitas:

o Universo e a estupidez humana".

Albert Einstein

Sumário

Dedicatória.....	v
Agradecimentos.....	vi
Listas.....	xi
Resumo.....	xv
1 INTRODUÇÃO.....	16
1.1 As células-tronco embrionárias.....	17
1.2 Implantação embrionária e a família da interleucina-1.....	19
1.3 Estudo da expressão gênica das células-tronco embrionárias.....	20
2 OBJETIVOS.....	22
2.1 Objetivo geral.....	23
2.2 Objetivo específico.....	23
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	24
3.1 Modelo animal.....	25
3.2 Superovulação dos camundongos.....	26
3.3 Coleta embrionária.....	28
3.4 Meio de cultivo de células-tronco.....	31
3.5 Placas de cultivo de células-tronco.....	31
3.6 Cultivo dos embriões.....	35
3.7 Isolamento e cultivo de novas linhagens de células-tronco embrionárias.....	37
3.8 Congelamento de células-tronco.....	43
3.9 Análise molecular das células-tronco embrionárias.....	44
3.9.1 Análise da reação em cadeia da polimerase a partir da transcrição reversa...	45
3.9.2 Reação em cadeia da polimerase.....	47
3.10 Diferenciação de células-tronco em célula contrátil <i>in vitro</i>	50
3.11 Parecer ético.....	53
3.12 Análise estatística.....	53

4 RESULTADOS.....	54
5 DISCUSSÃO.....	60
6 CONCLUSÕES.....	66
7 REFERÊNCIAS.....	68

Abstract

Lista de figuras

Figura 1 - Camundongo 129S1/SvImj macho.....	25
Figura 2 - Fêmea com plug vaginal (A) e, em detalhe, o tampão vaginal removido (B), com cerca de 2 x 3 mm.....	27
Figura 3A - Dissecção cirúrgica dos cornos uterinos.....	29
Figura 3B - Captura dos blastocistos em capela de fluxo laminar com pipeta Pasteur.....	29
Figura 4A - Confluência do PMEF ideal.....	34
Figura 4B - Confluência do PMEF abaixo do ideal.....	34
Figura 4C - Confluência do PMEF acima do ideal.....	34
Figura 5A - Blastocistos expandidos no momento do <i>hatching</i>	36
Figura 5B - Blastocistos expandidos após o momento do <i>hatching</i>	36
Figura 6 - Fluxograma do isolamento de células-tronco embrionárias de camundongos com PMEF (grupo I) e sem PMEF (grupo II).....	38
Figura 7A - Isolamento de célula-tronco com PMEF, 1º dia de cultivo de blastocisto.....	39
Figura 7B - Isolamento de célula-tronco com PMEF, 3º dia de cultivo.....	39
Figura 7C - Isolamento de célula-tronco com PMEF, 5º dia de cultivo de blastocisto.....	40
Figura 7D - Isolamento de célula-tronco com PMEF, linhagem de CT na 3ª passagem.....	40
Figura 7E - Isolamento de célula-tronco sem PMEF.....	41
Figura 7F - Isolamento de célula-tronco sem PMEF.....	41
Figura 7G - 4º dia de cultivo de blastocisto.....	42
Figura 7H - Linhagem de célula-tronco na 3ª passagem.....	42
Figura 8 - Colônia de célula-tronco descongelada em cultivo na 30ª passagem.....	44
Figura 9 - Microscopia das colônias de células-tronco.....	45

Figura 10 - Superfície interna de placa de Petri de 100mm com cerca de 45 microgotas de 20µl.....	51
Figura 11 - Corpo embrionário após três, cinco e oito dias de cultivo sem LIF (A, B e C, respectivamente) e biópsia de células contráteis derivadas de célula-tronco no 16º dia de cultivo sem LIF (D).....	52
Figura 12 - Expressão da IL-1 em células-tronco indiferenciadas (CT 1 e 2) na 5a, 10a, 15a, 20a e 25a passagens.....	55
Figura 13 - Endoderma, ectoderma e mesoderma primitivos em colônias de células-tronco com aspecto morfológico indiferenciado.....	56
Figura 14 - Expressão gênica da IL-1 em corpos embrionários durante a diferenciação celular.....	57
Figura 15 - Expressão da IL-1 em células contráteis derivados de células-tronco embrionárias.....	58

Lista de quadros e tabelas

Quadro

Quadro 1 - <i>Primers</i> utilizados para RT-PCR e PCR.....	49
---	----

Tabela

Tabela 1 - Expressão da IL-1 em células-tronco indiferenciadas e após diferenciação sem LIF.....	59
--	----

Lista de abreviaturas e siglas

CT	Células-tronco
DMEM	Meio <i>eagle dulbecco</i> modificado
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DNAc	Ácido desoxirribonucléico complementar
DPBS	Solução salina Dulbecco tamponada com fosfato
EDTA	Etilenodiamino tetra-acético
FIV	Fertilização <i>in vitro</i>
hCG	<i>Human chorionic gonadotropin</i>
IL	Interleucina
IL-1F1	interleucina-1 α
IL-1F2	interleucina-1 β
IL-1F3	Antagonista do receptor de interleucina 1
IL-1RI	Receptor de interleucina tipo 1
IL-1RII	Receptor de interleucina tipo 2
LIF	Fator inibidor de leucemia
M16	Meio de cultivo M16
M2	Meio de cultivo M2
MCI	Massa celular interna
MEM	Meio essencial mínimo
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PMSG	<i>Pregnant mare serum gonadotropin</i>
RNA	Ácido ribonucléico
RNAm	Ácido ribonucléico mensageiro
rpm	Rotações por minuto
RT-PCR	Reação em cadeia da polimerase a partir de transcrição reversa
SSEA	Antígenos embrionários de estágio específico
TRA	Técnica de reprodução assistida

Resumo

Objetivos: este trabalho objetivou estudar a expressão gênica da família das interleucinas-1 em células células-tronco embrionárias indiferenciadas de camundongos e avaliar se ela se altera após a diferenciação celular. **Métodos:** Pesquisou-se a expressão gênica dessas substâncias em células-tronco (CT) indiferenciadas e durante a diferenciação celular em cardiomiócitos de camundongos. Colônias na 5^a, 10^a, 15^a, 20^a e 25^a passagens em meios de cultivo foram removidas para a pesquisa de RT-PCR utilizando-se o *kit SuperScript™ III CellsDirect cDNA Synthesis System*. A amplificação do DNAc através do PCR foi realizada com a enzima Platinum® Taq DNA Polymerase. Foram utilizados os *primers* da interleucina-1 β (IL-1F2), antagonista do receptor de IL-1 (IL-1F3) e receptor tipo 1 de IL-1 (IL-1RI). Para estudo da IL-1 em estado diferenciado, foram utilizados corpos embrionários de três e cinco dias de cultivo e cardiomiócitos derivados de CT. **Resultados:** todas as 45 colônias indiferenciadas de CT mostraram-se negativas para IL-1F2; uma entre 45 (2,2%) foi positiva para IL-1F3 e também para marcadores de ectoderma (FGF5) e endoderma (Gata6) primitivos; uma entre 45 (2,2%) foi positiva para IL-1RI e também para ectoderma e mesoderma. Nenhum dos quatro corpos embrionários estudados foram positivos para IL-1F2. Um deles foi positivo para IL-1F3 e dois positivos para IL-1RI. Todas as quatro biópsias de cardiomiócitos mostraram-se positivas para IL-1F2 e também para IL-1F3. Duas delas foram positivas para IL-1RI. Pelo que se pôde observar, este é o primeiro estudo que descreve a expressão genética da família da IL-1 em colônias individuais de células-tronco embrionárias de camundongos. **Conclusão:** as células-tronco indiferenciadas de camundongos estudadas não produziram genes da família da IL-1.

1 INTRODUÇÃO

1.1 As células-tronco embrionárias

Uma das importantes funções da ciência é desenvolver constantemente propostas de melhoria das condições humanas. Para tanto, anunciam-se alternativas que venham substituir de maneira favorável o pensamento hegemônico sobre um tema específico. É necessário alto investimento no desenvolvimento tecnológico, o que, por sua vez está diretamente relacionado aos interesses do País.

A pesquisa com células-tronco (CT) embrionárias trouxe grande empolgação à comunidade científica e ao público em geral, devido à possibilidade de melhor entendimento dos mecanismos fisiológicos que pudessem gerar novos tratamentos e, também, a cura de determinadas doenças, como, por exemplo, as neurológicas. Nesse contexto, aparecem de forma especial as pesquisas com embriões de mamíferos, que viabilizam o conhecimento em um momento crucial do desenvolvimento, uma vez que envolve células em estágio pluripotente.

Embasados nesses fatos, pesquisadores têm estudado substâncias produzidas pelas células indiferenciadas, no intuito de desvelarem-se aspectos importantes da fisiologia da reprodução. Assim, a família das interleucinas-1 tem despertado a atenção daqueles que investigam as fases iniciais da implantação embrionária. Atualmente, são descritas várias dessas citocinas envolvidas nesse período; entretanto, não há relatos sobre a expressão gênica dessas substâncias em colônias individuais de células tronco-embrionárias indiferenciadas de roedores.

As CTs embrionárias são isoladas da massa celular interna (MCI) de embriões, mais precisamente da região denominada epiblasto, por meio de metodologia específica. O epiblasto surge no início da embriogênese e é constituído de aproximadamente 20 a 25 células. Nesse local ocorre importante expressão de genes específicos, de maneira programada, o que é fundamental para o desenvolvimento embrionário nos estágios iniciais (Nagy *et al.*, 2003a).

Segundo Smith (2001), o termo totipotente é mais bem empregado para o oócito fertilizado ou o blastômero, pois têm a capacidade de gerar embriões completos. Já as CTs embrionárias não são capazes de produzir blastocistos e, desta

forma, são melhor definidas como células pluripotentes, já que são capazes de se transformar em diversos tipos de células e tecidos derivados dos três folhetos embrionários, ou seja, do ectoderma, do endoderma e do mesoderma.

Ainda não existe consenso absoluto sobre qual seria a melhor definição científica para se qualificar uma linhagem celular como CT, mas alguns autores investigam uma possível assinatura molecular, ou seja, a presença de uma expressão gênica específica no momento de pluripotência no qual as células se encontram. Ivanova *et al.* (2002) descreveram diferenças e similaridades moleculares entre cinco diferentes populações de CT e definiram a expressão *stemness* como o estado pluripotente durante o qual genes específicos se encontram expressos e outros tantos são mantidos inativos. Os genes Oct-4 e Nanog representam alguns deles expressos nessa fase e são utilizados por diversos cientistas na definição de CT.

O conhecimento atual sobre os mecanismos intrínsecos reguladores da pluripotencialidade celular e do potencial de diferenciação tecidual está limitado à descoberta de alguns fatores sinalizadores e reguladores, tendo a definição de CT caráter funcional (Wobus, Boheler, 2005).

Essas células, por apresentarem tendência a crescimento de forma agrupada quando cultivadas *in vitro*, evidenciam a existência de interação entre si, através da liberação de fatores que propiciam comunicação inter e intracelular, à semelhança do que ocorre durante a embriogênese no animal.

O fato de se poder estudar a colônia de CT isoladamente diminui o risco de se detectar RNA mensageiro (RNAm) que, na verdade, tenha sido produzido por células de colônias diferentes sobremaneira, quando se utiliza *pool* de colônias na reação em cadeia da polimerase a partir de transcrição reversa (RT-PCR). O isolamento e cultivo de CTs embrionárias de roedores e de humanos têm propiciado fonte ímpar de material para pesquisas. Elas visam a esclarecer mecanismos de diferenciação celular que, certamente, ajudarão a esclarecer a gênese de doenças em animais e seres humanos e fortalecem a promessa do desenvolvimento de terapias celulares e moleculares após o seqüenciamento do genoma humano.

1.2 Implantação embrionária e a família da interleucina-1

O endométrio encontra-se sob constante estímulo hormonal, de maneira sincronizada, para permitir a implantação do blastocisto. Existe, ainda, uma comunicação materno-embrionária que se dá por meio da produção e secreção de proteínas, tanto pelo embrião como pela mãe, no interior das tubas e na cavidade uterina (Hill, 2001). A presença desses fatores permite a implantação do embrião logo após a sua chegada no interior do útero. No tocante à comunicação materno-embrionária, são relatados mais de 500 genes diferentes expressos no blastocisto, alguns provavelmente responsáveis diretos pela nidação (Hoozemans *et al.*, 2004).

A família das interleucinas-1 (IL-1) participa desse processo desempenhando importante papel durante essa fase embrionária inicial. O termo IL-1 é geralmente usado para os membros IL-1 α e IL-1 β , e, na nova nomenclatura são chamados IL-1F1 e IL-1F2, respectivamente (SIMS *et al.*, 2002). Esta família tem, até agora, 10 membros (IL-1F1 a F10). Os receptores tipo um (IL-1RI) e tipo dois (IL-1RII) fazem parte da família de receptores da IL-1, sendo descrito 10 membros desta família de receptores no genoma humano (DUNN *et al.*, 2002). Apenas a ligação da IL-1F1 ou IL-1F2 ao IL-1RI gera uma resposta, ficando o IL-1RII como competidor do IL-1RI (Kruessel *et al.*, 1997). O IL-1RI foi localizado no endométrio de camundongo, onde se observou sua expressão no período da implantação, e a IL-1F2 foi localizada na placenta (Simon *et al.*, 1998).

No estudo realizado por Simon *et al.* (1998), percebeu-se que o uso intraperitoneal de IL-1F3 recombinante humano durante a implantação em camundongos dificultava a nidação do embrião, pois haveria modificações estruturais na membrana epitelial devido à diminuição do número de receptores das integrinas alfa 4 ($\alpha 4$), alfa v (αv) e beta 3 ($\beta 3$). Um fato interessante é que, apesar da importância das IL-1 nesse período, animais *knockout* para IL-1F2 (Zheng *et al.*, 1995) ou IL-1RI (Abbondanzo *et al.*, 1996) são viáveis e podem se reproduzir.

Componentes da família da IL-1 foram descritos também em embriões de camundongos por meio da RT-PCR, desde o estágio de quatro células até

a fase de blastocisto (Takacs, Kauma, 1996). A expressão gênica do IL-1F3 aumenta com o desenvolvimento embrionário, estando presente em 74% dos blastocistos durante o *hatching*, fase na qual o embrião se livra da zona pelúcida, exteriorizando-se através de uma abertura naquela camada. No entanto, a percentagem de blastocistos expressando IL-1F2 é menor, chegando a cerca de 19% (Kruessel *et al.*, 1997).

1.3 Estudo da expressão gênica das células-tronco embrionárias

Técnicas específicas para a pesquisa de determinados genes podem incluir a RT-PCR, a PCR quantitativo, a hibridização *in situ* e o *northern blotting*. A avaliação global envolve genes potencialmente desconhecidos ou previamente não identificados, num sistema onde se trabalha com grande número de seqüências previamente selecionadas, sem conhecimento anterior de seu envolvimento na pesquisa em questão. O estudo da expressão gênica pode ser realizado também com técnicas de macro ou micro arranjos (Strachan, Read, 2003).

O uso da tecnologia com microarranjos ou *microarrays* permitiu observar quais genes específicos são expressos em células pluripotentes, facultando-se inferir uma possível correlação entre tipos celulares de acordo com a sua origem. Cita-se, por exemplo, o fato de a expressão gênica encontrada no carcinoma embrionário humano ser muito semelhante à das CTs embrionárias humanas (Sperger *et al.*, 2003).

Outras evidências científicas demonstram que CTs embrionárias humanas e as de camundongos assemelham-se quanto às células da MCI dos blastocistos, pois apresentam expressão similar de antígenos embrionários de estágio específico (SSEA), provando seu parentesco (Henderson *et al.*, 2002).

Um método bastante difundido é a RT-PCR, durante a qual se realiza a síntese de um DNA complementar (DNAc) ao RNAm, cujos fragmentos homólogos à seqüência deste, que codifica proteína, podem ser amplificados diversas vezes e, assim, detectados em gel de eletroforese. A partir dessa mesma técnica pode-

se trabalhar com metodologia que utilize RNAm poli(A), que apresenta a vantagem de propiciar estudo de vários genes a partir de uma mesma amostra de células (Aubin, Liu, Candeliere, 2002).

Os protocolos tradicionais para pesquisa da expressão gênica de CTs embrionárias requerem a extração de RNAm por meio de vários passos que podem levar à perda de parte do material, além de demandar tempo considerável de trabalho.

Em camundongos, sabe-se que em um oócito existe cerca de 0,4ng de ácido ribonucléico (RNA) total e no blastocisto de 3,5 dias de vida, contendo cerca de 64 células, encontram-se aproximadamente 2ng (Nagy *et al.*, 2003b). Isso explica, em parte, a necessidade de mais quantidade de embriões para o estudo da expressão gênica, pois os protocolos tradicionais em geral requerem alguns microgramas de RNA total para a síntese do DNAc durante a transcrição reversa antes da amplificação pela PCR (Niwa, Miyazaki, Smith, 2000; Chambers *et al.*, 2003; Hart *et al.*, 2004; Hay *et al.*, 2004; Sato *et al.*, 2004).

Na maioria das pesquisas, a expressão gênica é analisada em *pool* de CT, não se podendo concluir, com certeza, que toda colônia dessas células estará produzindo os mesmos RNAm, o que justifica a necessidade da avaliação em colônias individuais.

Como relatado anteriormente, vários estudos sugerem que a família das interleucinas-1 participa ativamente dos processos relacionados à implantação; entretanto, não se sabe sobre sua expressão gênica em colônias individuais de CTs embrionárias, daí a importância de se realizar esta pesquisa, já que não há esclarecimentos a respeito desse fato.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Estudar a expressão gênica das IL-1F2, IL-1F3 e IL-1RI em células-tronco embrionárias de camundongos.

2.2 Objetivo específico

Avaliar se a expressão gênica das IL-1F2, IL-1F3 e IL-1RI altera-se após diferenciação celular.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Modelo animal

Utilizou-se a linhagem 129S1/SvImj adquirido do *Jackson Laboratory (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, EUA, www.jax.org)* - (figura 1). Antes do início da pesquisa, fêmeas e machos com três e oito semanas de vida, respectivamente, foram mantidos em observação durante uma semana no biotério da *Cornell University*.



Figura 1 - Camundongo 129S1/SvImj macho.

Os roedores foram avaliados diariamente por técnicos do biotério e, em dias alternados, por investigadores participantes do projeto para verificar-se a disponibilidade de alimentos, além das condições de saúde dos animais. A presença de alterações no comportamento e no estado físico dos roedores era prontamente analisada por veterinários do biotério.

Os machos foram mantidos em gaiolas individuais de 30,5 x 19,8 x 13,4cm para evitar-se possível supressão da testosterona do animal, o que pode acontecer na presença de outro macho dominante no grupo e, conseqüentemente,

alterar a espermatogênese. As fêmeas foram alojadas em número máximo de cinco por gaiola.

Todos foram mantidos em regime de 12 horas de luz intercalada com 12 horas de escuridão, temperatura ambiente entre 21°C e 23° C e alimento *ad libitum*.

3.2 Superovulação dos camundongos

Roedores entre três e quatro semanas de vida foram submetidos à superovulação pela injeção intraperitoneal de 5UI de *pregnant mare serum gonadotropin* (PMSG) *Sigma-Aldrich* (Saint Louis, MO, EUA, catálogo G-4527, www.sigma-aldrich.com). Após 48 horas, induziu-se a ovulação com 5UI de *human chorionic gonadotropin* (hCG) intraperitoneal, *Sigma-Aldrich* (Saint Louis, MO, EUA, catálogo C-8554, www.sigma-aldrich.com).

Logo após o hCG, foi realizado o acasalamento, mantendo-se uma fêmea e um macho por gaiola. As fêmeas com sinal de cópula definido pela presença de *plug* vaginal, detectado pela observação visual e tátil de tampão composto por sêmem coagulado e secreções vaginais no intróito vaginal (figura 2), foram separadas em gaiolas, na manhã seguinte, para sacrifício e coleta de embriões, descrito a seguir.

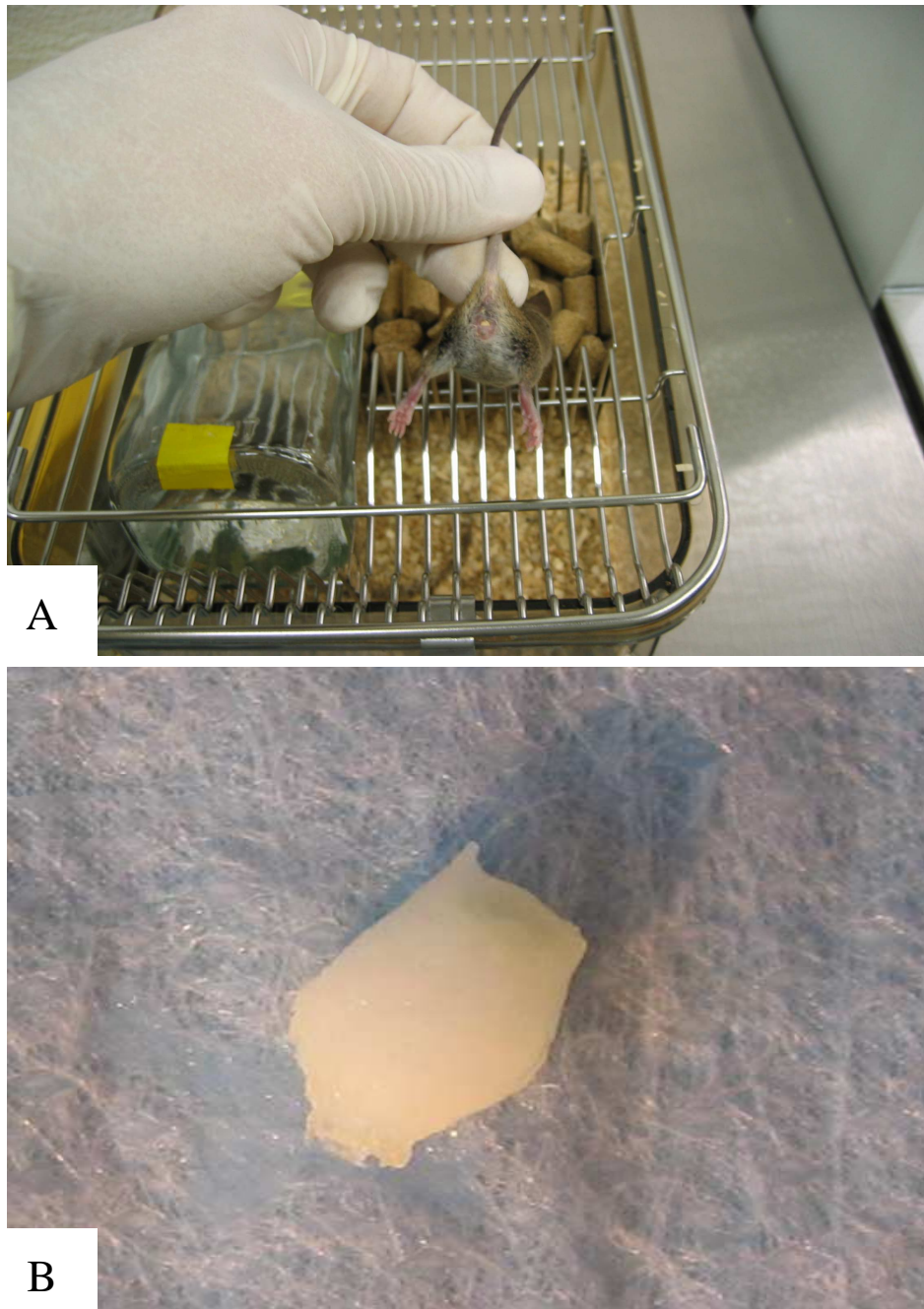


Figura 2 A - Fêmea com plug vaginal, **figura 2B** - tampão vaginal, com cerca de 2 x 3 mm.

3.3 Coleta embrionária

Define-se como dia 0,5 a manhã em que se observa o *plug* vaginal. A coleta dos embriões dos camundongos no estágio de blastocisto é realizada no dia 3,5 após a detecção do *plug*. Esse procedimento foi realizado em sala com bancada e iluminação apropriados, sobre material higiênico composto por proteção de plástico e tecido absorvente, semelhante a uma fralda descartável sem elásticos. Utilizaram-se luvas de látex, gorro e máscara não estéreis e tesoura e pinça esterilizadas. A seguir, alinham-se os tempos cirúrgicos desse processo.

Logo após o sacrifício do animal por meio de deslocamento cervical, procedeu-se à anti-sepsia no seu abdômen com álcool a 70% e realizou-se sua abertura com fórceps e tesoura cirúrgica (figura 3A). Os cornos uterinos foram isolados e, em seguida, retirados em bloco juntamente com a parte superior da vagina e das tubas. A seguir, foram imediatamente imersos em placa de Petri de 35mm contendo cerca de 5ml de meio M2 (um meio de cultivo modificado contendo tampão *Hepes* que permite a coleta e a manipulação de embriões por período prolongado fora da incubadora de CO₂, previamente aquecido a 37°C) e encaminhados para dissecação em capela de fluxo laminar (figura 3B).



A



B

Figura 3A - Dissecção cirúrgica dos cornos uterinos. **Figura 3B** - Captura dos blastocistos em capela de fluxo laminar com pipeta Pasteur.

A microdissecação das peças cirúrgicas foi realizada com microscópio estereoscópico (Nikon, New Jersey Scientific, NJ) em cima de placa aquecida a 37°C, com controle digital de temperatura, marca Tokai Hit, modelo MATSU4020WF (Tokai Hit, Tokio, Japão, www.tokaihit.com).

Cada corno uterino foi seccionado na sua parte proximal logo acima da cúpula vaginal e na sua parte distal logo abaixo do oviduto ipsilateral. Lavou-se o interior de cada corno na placa de Petri de 35mm com a ajuda de seringa de teste tuberculínico preenchida com 1ml de meio M2 previamente aquecido a 37° C.

Retornou-se o corno uterino para uma nova placa de Petri com meio M2 aquecido e iniciou-se a identificação dos blastocistos pelo microscópio estereoscópico. Depois de identificados, eles foram aspirados com pipeta Pasteur de vidro esterilizada afilada em chama e livre de toxicidade, com diâmetro de cerca de 100µm (figura 3b). Essa etapa deve ser rápida para evitar dano ao blastocisto, sendo necessários, em geral, entre 10 e 15 minutos desde a remoção dos cornos até a incubação dos blastocistos.

Na limpeza dos blastocistos, utilizou-se sistema de cultivo de microgotas preparado na noite anterior à coleta, sendo eles mantidos nesse sistema em estufa para equilíbrio de pH e temperatura. Cada sistema foi composto de cinco microgotas laterais e uma central em placa de Petri estéril de 35mm. Cada microgota continha cerca de 30µl de meio M16 e era imediatamente encoberta totalmente por camada de óleo mineral atóxico, filtrado e testado para cultivo embrionário (*Sigma-Aldrich*, Saint Louis, MO, EUA, www.sigma-aldrich.com).

Cada embrião foi lavado em cinco diferentes microgotas sob óleo mineral. Depois, livres de detritos, foram transferidos para nova placa de Petri contendo novo sistema de cultivo em microgotas com meio M16, um meio de cultivo embrionário *in vitro* contendo piruvato e lactato como fonte energética, pois os embriões não utilizam eficientemente a glicose. Foram colocados logo a seguir em incubadora Thermo Forma, modelo 3110 série II (*Thermo Electron Corporation*, Marietta, OH, EUA, www.thermo.com/forma).

Durante todo o período de cultivo embrionário ou celular, utilizaram-se na incubadora os seguintes parâmetros básicos: temperatura a 37°C, concentração de 5% CO₂ em mistura de ar ambiente e umidade mínima de 90%. Esses valores foram checados e anotados diariamente.

3.4 Meio de cultivo de células-tronco

Cada litro de meio de cultivo de célula-tronco era constituído por 750ml de meio de *Eagle* modificado por *Dulbecco* (DMEM) contendo baixa concentração de bicarbonato; soro fetal bovino numa concentração a 20%; L-glutamina (2mM); penicilina / estreptomicina (50µg/ml); aminoácidos não essenciais MEM (0,1 mM); 10 ml de nucleosídeos (100x); betamercaptoetanol (0,1mM) (*Specialty Media*, Phillipsburg, NJ, EUA, www.specialtymedia.com) e 2.000 U/ml de fator inibidor de leucemia (LIF) (Chemicon International; Temecula, CA, EUA, www.chemicon.com).

Após a adição de todos os componentes, o meio foi filtrado com filtro descartável com poro de 0,22µm e mantido em geladeira a 4°C para ser utilizado em até sete dias.

3.5 Placas de cultivo de células-tronco

Todo o trabalho de manipulação de placas de cultivo celular e de embriões foi realizado sob fluxo laminar (*He Baker*, Butler, NJ, EUA).

Durante a fase inicial de isolamento das células-tronco foram utilizadas placas de cultivo de 24 poços (*Corning incorporated*, Corning, NY, EUA,

www.corning.com) previamente preparadas com solução de gelatina a 0,1% em água ultrapura (*Specialty Media*, Phillipsburg, NJ, EUA, www.specialtymedia.com). Cerca de 0,5ml de gelatina a 0,1% foi adicionado em cada poço e deixado por pelo menos 30 minutos para a formação de uma película aderente na porção inferior de cada um deles.

Após esse período, a solução de gelatina de cada poço foi substituída por 1ml do meio de cultivo para fibroblastos contendo uma concentração de $1,0 \times 10^5$ fibroblastos primários de embriões de camundongos (PMEF-H, *Specialty Media*, Phillipsburg, NJ, EUA, www.specialtymedia.com) no grupo cujo isolamento utilizou PMEF.

Esses fibroblastos não possuem atividade mitótica devido à exposição prévia à *mitomicina* pelo fabricante, e são adquiridos prontos para uso, em forma de crioviais, estando eles no estágio de terceira passagem. Cada frasco de PMEF contém 1ml de meio crioprotetor dimetil sulfóxido (DMSO, *Sigma-Aldrich*, Saint Louis, MO, EUA, www.sigma-aldrich.com) e $5,0$ a $6,0 \times 10^6$ fibroblastos e foi mantido em freezer de -80°C . O frasco, posteriormente, foi descongelado de forma rápida em banho-maria a 37°C antes de ser ressuspensionado em meio de cultivo.

O meio de cultivo utilizado para a semeadura dos fibroblastos tinha em sua composição final de um litro os seguintes componentes: 870ml de DMEM, 100ml de soro fetal bovino, 10ml de solução de glutamina, 10ml de solução de penicilina/estreptomicina e 10ml de betamercaptoetanol.

Após o degelo do PMEF, o conteúdo do criovial foi transferido com o auxílio de pipeta estéril de 2ml para tubo de Falcon de 15ml contendo 10ml do meio descrito, aquecido. Realizou-se inversão lenta do tubo que se encontrava com a tampa em rosca fechada e a mistura resultante foi então centrifugada por cinco minutos a 4°C , 1.000 rotações por minuto (rpm).

O sobrenadante contendo a maior parte do DMSO foi removido e as células do *pellet* ressuspensionadas em um novo meio de cultivo aquecido, sendo semeadas nas placas de cultivo imediatamente após a remoção da solução de gelatina a 0,1%. O volume do novo meio de cultivo a ser utilizado foi calculado antes do início

do experimento para que a densidade final da camada de fibroblastos alcançasse confluência de 95%.

Essa confluência era conseguida seguindo-se as recomendações do fabricante, que orienta o preparo da solução celular de fibroblastos numa concentração de $1,0 \times 10^5$ fibroblastos para cada mililitro de meio de cultivo. Como cada criovial contém cerca de $5,0$ a $6,0 \times 10^6$ fibroblastos, pode-se preparar até 50 poços em placas de 24 poços (figura 4).

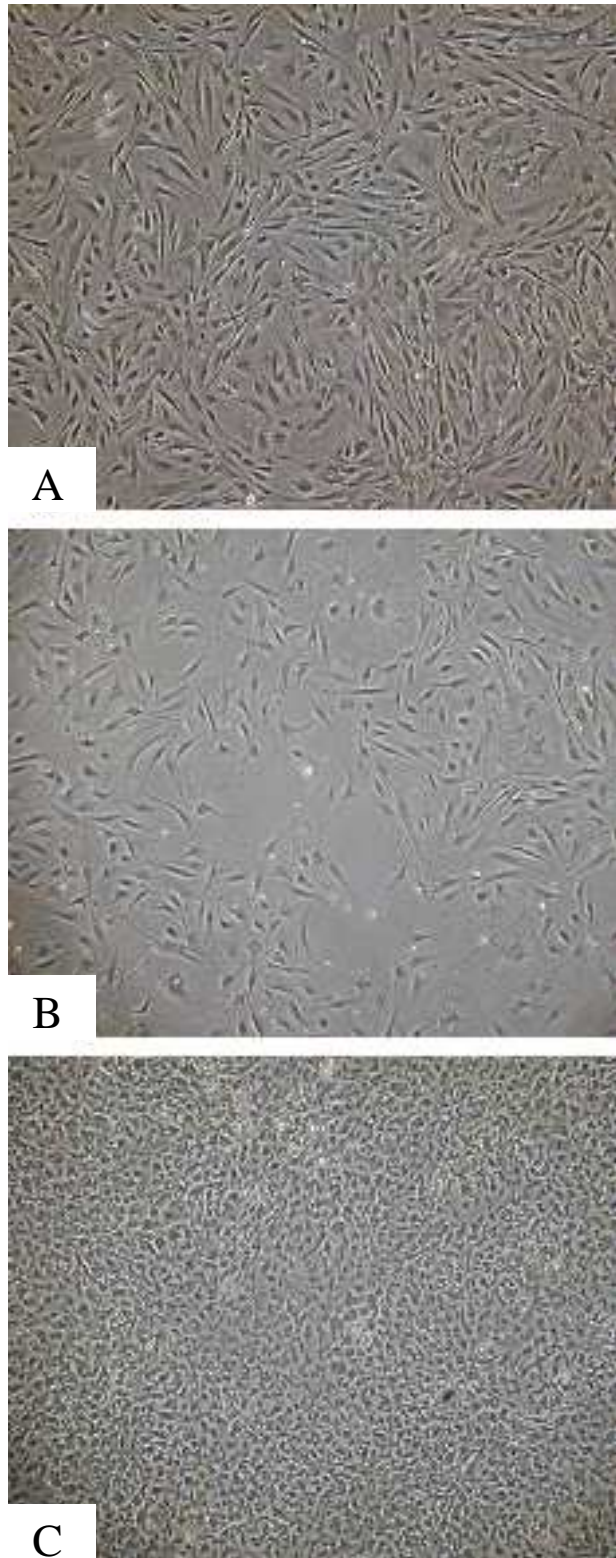


Figura 4A - Confluência do PMEF ideal. **Figura 4B** - Confluência do PMEF abaixo do ideal. **Figura 4C** - Confluência do PMEF acima do ideal. Fonte: site da empresa *Specialty Media*.

Para avaliar a densidade ideal, utilizou-se o aumento de 20X do microscópio invertido, como exemplificado na figura 4. Utilizando-se 1ml dessa solução na superfície de 2cm² de cada poço da placa de cultivo de 24 poços, proporcionou-se confluência de cerca de 95%. O preparo das placas de cultivo com gelatina e PMEF é realizado na noite anterior ao seu uso e pode ser utilizado por 12 a 14 dias.

3.6 Cultivo dos embriões

Antes de receber os blastocistos, cada poço foi preenchido com um 1ml de meio de cultivo de células-tronco embrionárias contendo fator inibidor de leucemia (LIF) previamente aquecido, sendo seu pH equilibrado em incubadora por pelo menos quatro horas antes de seu uso a 37°C e 5% CO₂.

Os embriões em estágio de mórula ou blastocisto inicial foram cultivados por um ou dois dias em meio M16 sob óleo mineral, sendo avaliados diariamente em microscópio invertido (*Olympus IX71, Scientific Inc., NJ, EUA, www.olympus.com*). Os blastocistos com blastocelos amplas foram aspirados com pipeta Pasteur afilada e semeados, isoladamente, na proporção de um por poço, em placas de cultivo de 24 poços, previamente embebidas com gelatina 0,1% e camada celular de fibroblastos sem atividade mitótica ou apenas gelatina 0,1% (figura 5).

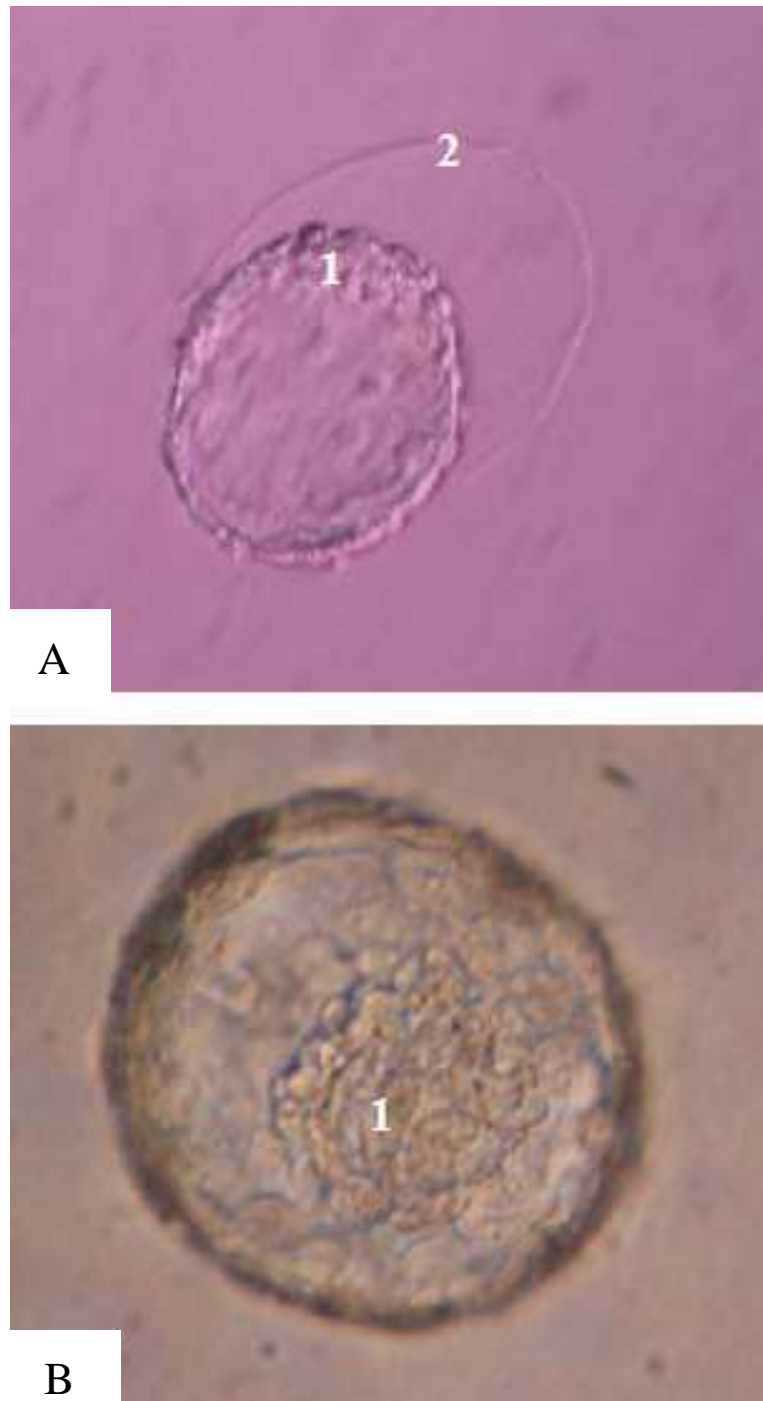


Figura 5A - Blastocistos expandidos no momento do *hatching*; 1 - Massa celular interna; 2 - zona pelúcida. **Figura 5B** - Blastocistos expandidos após o momento do *hatching*.

3.7 Isolamento de novas linhagens de células-tronco embrionárias

As células-tronco embrionárias foram isoladas após cultivo *in vitro* dos blastocistos expandidos em meio específico para elas, trocado diariamente. Depois de cinco ou seis dias, realizou-se a remoção da MCI segundo metodologia descrita por Nagy *et al.* (2003c), exceto pelo uso de pipeta P-20.

Antes da remoção da MCI, cada poço foi lavado com cerca de 1ml de solução salina *Dulbecco* tamponada com fosfato (DPBS) sem cálcio ou magnésio (*Specialty Media*, Phillipsburg, NJ, EUA, www.specialtymedia.com) para remoção do soro fetal bovino, que dificulta a ação da tripsina. Utilizando-se ponteiras não tóxicas e estéreis (Gilson, Middleton, WI, EUA, www.gilson.com), através de movimento de sucção rápida próximo à posição da MCI, a mesma se deslocava para dentro da ponteira junto com pequeno volume de DPBS modificado sem cálcio ou magnésio.

Ainda previamente à remoção da MCI preparou-se uma placa de cultivo de 96 poços utilizando-se pequena quantidade de solução de tripsina 0.25% / 1mM etilenodiamino tetra-acético (EDTA) aquecida a 37°C por poço. Cada MCI removida foi mergulhada na solução de tripsina e mantida em incubadora por quatro minutos.

Após esse período, a tripsina foi neutralizada com igual volume do mesmo meio utilizado para cultivo de células-tronco embrionárias, sendo cada MCI pipetada várias vezes dentro de seu próprio poço, retornando-se esse material à sua placa de cultivo original.

A cada dois ou três dias, novo tratamento com tripsina foi realizado diretamente no seu poço, sendo esse procedimento conhecido como passagem, com o objetivo de manter o diâmetro médio das colônias entre 200 a 400µm. Durante a realização das passagens foram anotados o dia e o número do procedimento.

Utilizou-se um total de 55 MCIs durante o isolamento das CTs embrionárias em dois sistemas diferentes de placas de cultivo, em momentos distintos da pesquisa (figura 6).

Num primeiro momento da pesquisa, foram utilizados 37 MCIs cultivadas previamente em poços gelatinizados e preparados com $1,0 \times 10^5$ fibroblastos primários de embriões de camundongos por poço (figuras 7a, 7b, 7c e 7d).

Depois, foram utilizados 18 MCIs previamente cultivadas em poços contendo apenas gelatina a 0,1%, sem camada de fibroblastos (figuras 7e, 7f, 7g e 7h).

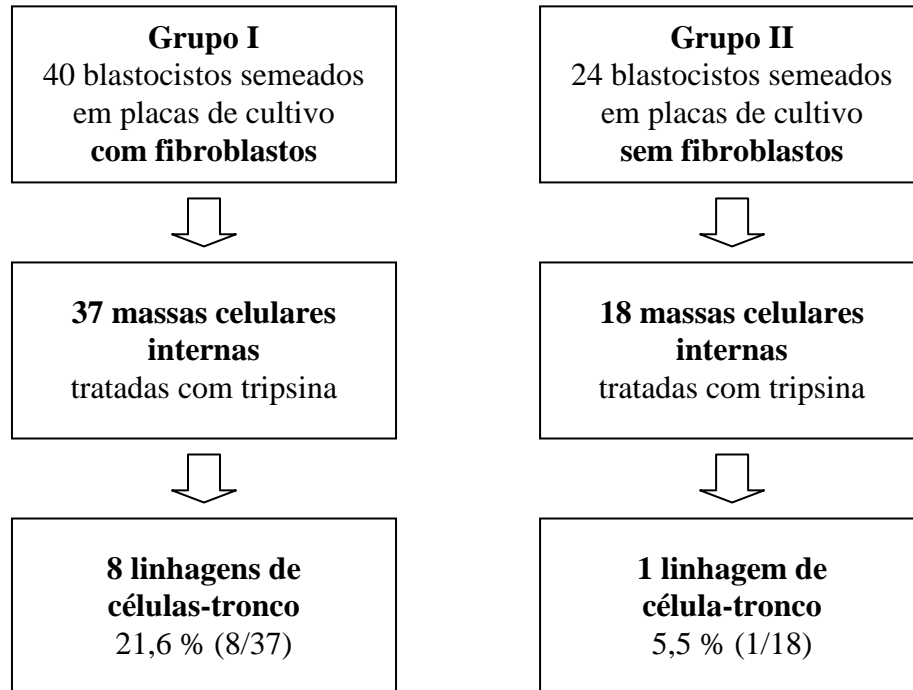


Figura 6 - Fluxograma do isolamento de células-tronco embrionárias de camundongos com PMEF (grupo I) e sem PMEF (grupo II). (Valor $p = 0,12$, OR = 4,69). Valor p calculado pelo Fisher.

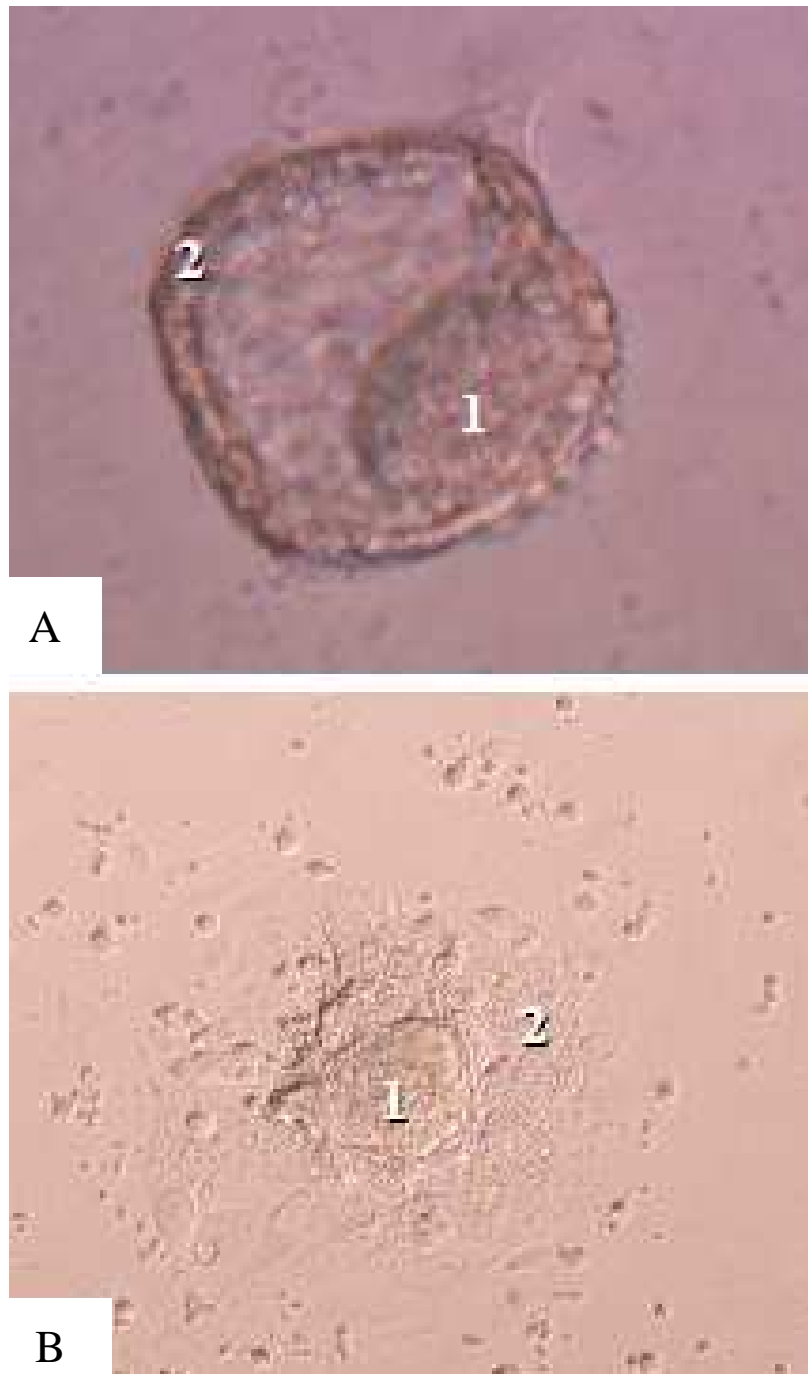


Figura 7A - Isolamento de célula-tronco com PMEF, 1º dia de cultivo de blastocisto. **Figura 7B** - Isolamento de célula-tronco com PMEF, 3º dia de cultivo. 1 - Massa celular interna; 2 - trofoblasto.

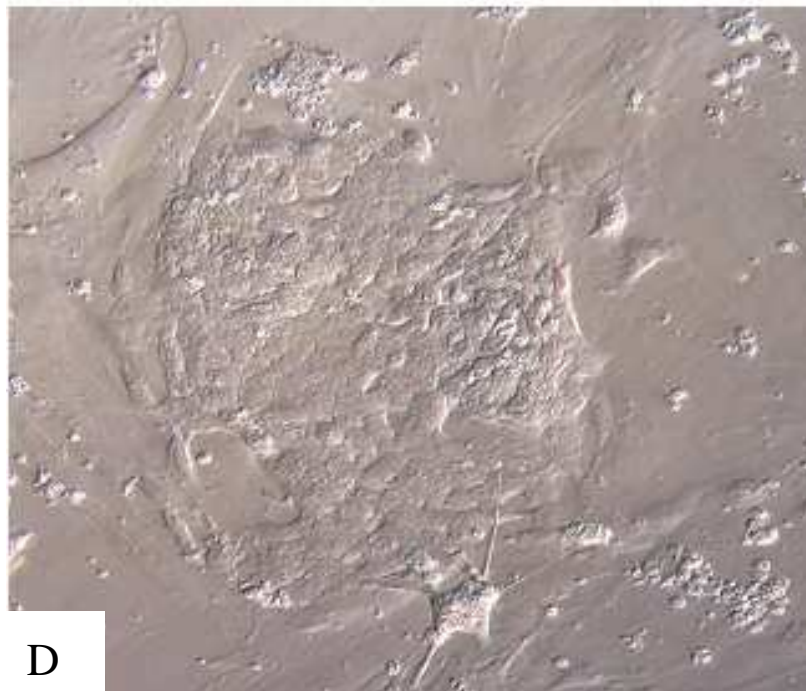
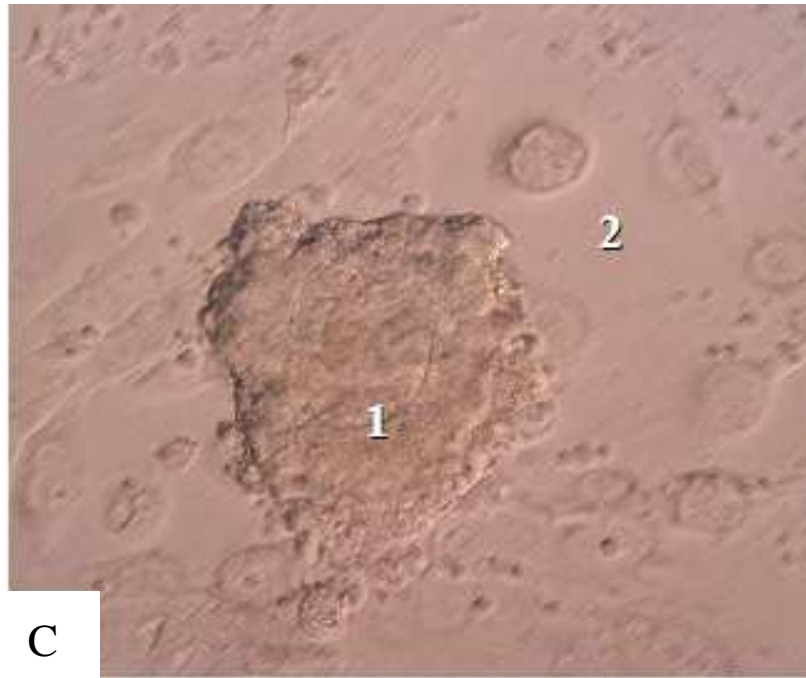


Figura 7C - Isolamento de célula-tronco com PMEF, 5^o dia de cultivo de blastocisto. **Figura 7D** - Isolamento de célula-tronco com PMEF, linhagem de CT na 3^a passagem. 1 - Massa celular interna; 2 - trofoblasto.

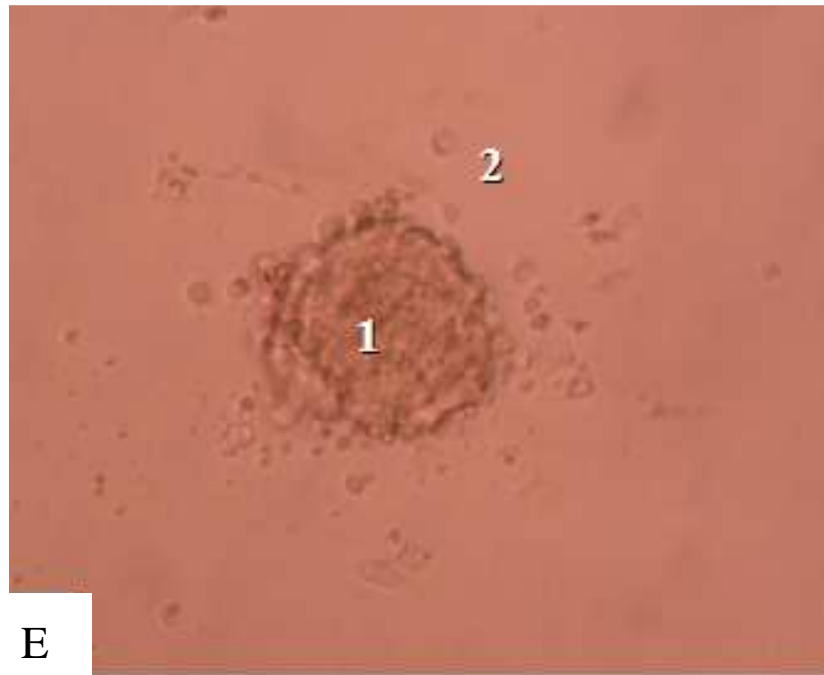


Figura 7E - Isolamento de célula-tronco sem PMEF, 1^o dia de cultivo de blastocisto. **Figura 7F** - Isolamento de célula-tronco sem PMEF, 3^o dia de cultivo. 1 - Massa celular interna; 2 - trofoblasto.

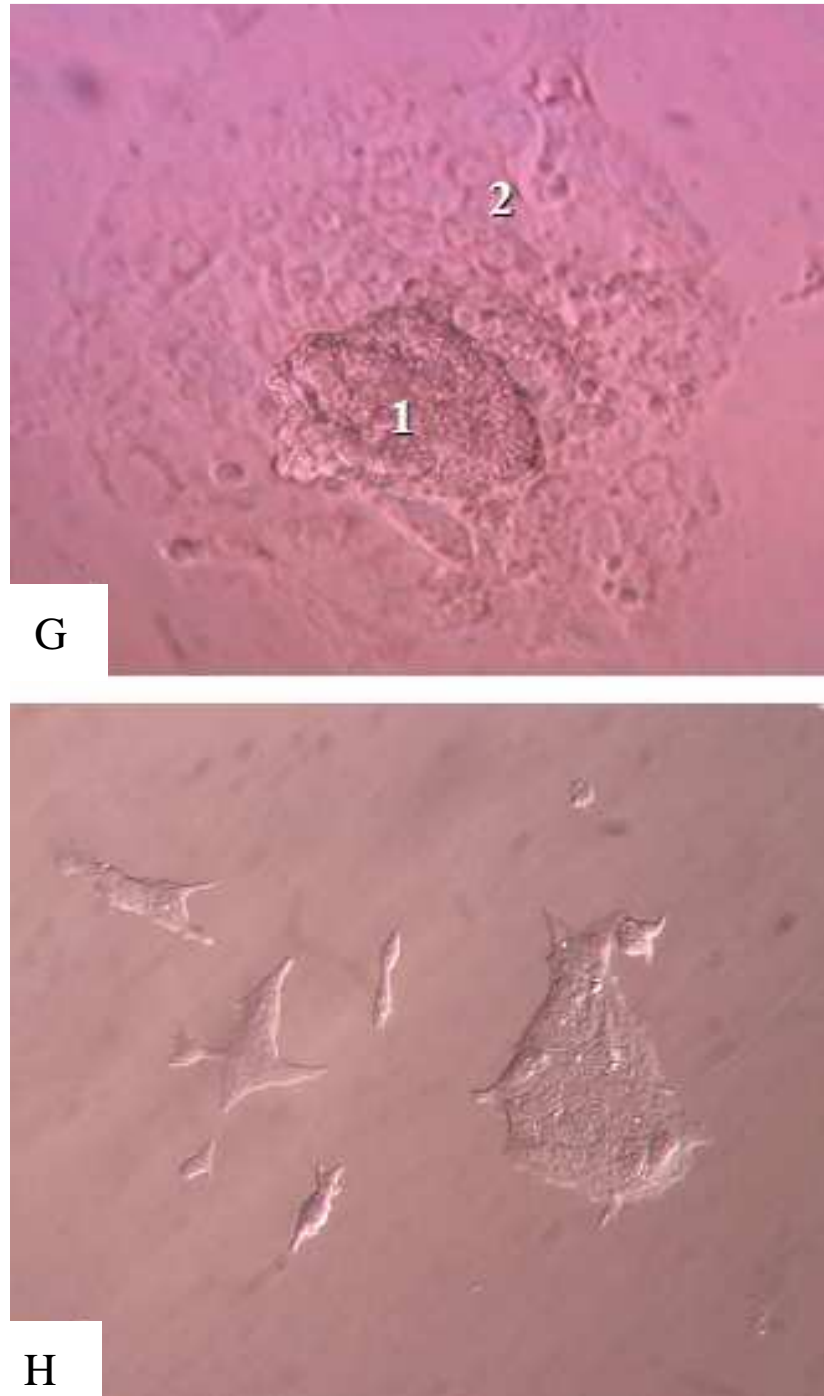


Figura 7G - Isolamento de célula-tronco sem PMEF, 4^o dia de cultivo de blastocisto. **Figura 7H** - Linhagem de célula-tronco na 3^a passagem. 1 - Massa celular interna; 2 - trofoblasto.

3.8 Congelamento de células-tronco embrionárias

Antes do congelamento, as linhagens celulares isoladas foram expandidas seqüencialmente até a placa de Petri de 100mm tratada com gelatina a 0,1%, quando apresentavam confluência mínima de cerca de 70%. Parte de cada colônia isolada foi mantida em cultivo até a 25^a passagem. Durante cada nova passagem, cerca de um terço a um sétimo de cada poço de cultivo foi ressemeado em nova placa de cultivo.

Ao redor da passagem cinco ou seis, dependendo do crescimento celular, cada nova linhagem de célula-tronco foi congelada em meio de congelamento celular contendo crioprotetor DMSO. A queda da temperatura foi gradual em *freezer* até -80°C e aí foram mantidas até sua utilização na pesquisa.

A solução crioprotetora contém meio essencial mínimo (MEM) e já vem suplementado com mistura de soro fetal bovino e 10% de DMSO. Para realização do procedimento, o meio de congelamento celular foi descongelado rapidamente em banho-maria e mantido em recipiente contendo gelo em escamas.

A placa de cultivo contendo as células a serem congeladas foi previamente lavada com solução DPBS sem $\text{Ca}^{++}/\text{Mg}^{++}$ e tratada com tripsina em procedimento semelhante ao descrito em cada passagem. Retirou-se pequena quantidade da solução celular resultante para estimativa da contagem do número de células através de hematocitômetro e centrifugou-se todo o restante em tubo de falcon graduado de 15ml (10 minutos a $250 \times g$, a 4°C).

Removeu-se o máximo possível de meio de cultivo e ressuspendeu-se o *pellet* agora com o uso do meio de congelamento celular calculando-se a concentração final de 10^6 a 10^7 células/ml. Essa nova solução celular foi mantida em recipiente com gelo em escamas até o início do congelamento, que deve ser iniciado dentro de cinco minutos. Dividiu-se a solução crioprotetora contendo as células em pequenos frascos de 1ml previamente identificados e especiais para congelamento.

Descongelaram-se amostras de cada linhagem para confirmação da sobrevivência (figura 8).

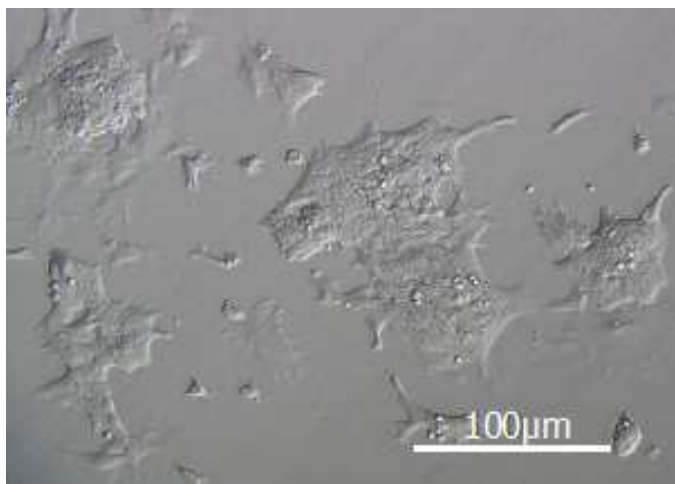


Figura 8 - Colônia de célula-tronco descongelada em cultivo na 30^a passagem.

3.9 Análise molecular de células-tronco embrionárias

Foram analisadas amostras das nove linhagens celulares removidas dois ou três dias após entrada na 5^a, 10^a, 15^a, 20^a e 25^a passagens de cada colônia, imediatamente antes da próxima passagem. Cada amostra continha uma colônia, sendo ela removida da placa de cultivo e adicionada nos tubos para a RT-PCR (figura 9).

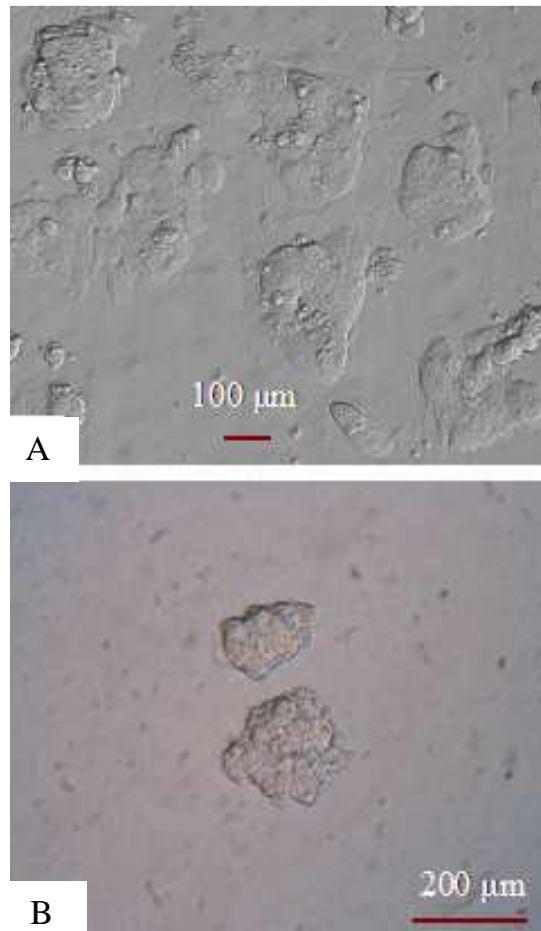


Figura 9A - Microscopia das colônias de células-tronco no segundo dia após tratamento com tripsina, **Figura 9B** - após remoção para estudo molecular.

3.9.1 Análise da reação em cadeia da polimerase a partir da transcrição reversa

A RT-PCR foi utilizado para a síntese do DNAc. Foi realizada a extração do RNAm de colônias de células-tronco a partir do qual foi sintetizado o DNAc, homólogo à sequência do RNAm que codifica cada proteína em estudo.

Utilizou-se o *kit* SuperScript™ III *CellsDirect DNAc Synthesis System* (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA, www.invitrogen.com) para a realização da

RT-PCR, conforme protocolo do fabricante. Esse método permite a realização da lise celular e transcrição reversa no mesmo tubo e também o tratamento das amostras com DNase I para eliminação de ácido desoxirribonucléico (DNA) genômico. Os tubos foram mantidos em recipiente com gelo em escamas durante todo o procedimento. A cada passo a reação foi misturada e essa mistura foi pipetada gentilmente e submetida a breve centrifugação.

Inicialmente, foi transferida uma colônia de CT para cada tubo de PCR contendo 10 μ l de meio de ressuspensão, utilizando-se pipeta Pasteur afilada em chama e com a ajuda de microscópio estereoscópico. Esse procedimento acarretou a adição de cerca de 1 μ l de meio de cultivo de CT para o interior do tubo RT-PCR. Logo após, adicionou-se 1 μ l de inibidor de ribonuclease recombinante (40 unidades/ μ l - RNaseOUT™), sendo o tubo colocado em freezer de -20°C até o início da RT-PCR. Realizaram-se biópsias seriadas de cada colônia imediatamente antes de cada passagem, desde a 4^a até a 25^a.

Os tubos de PCR contendo as CTs e guardados a -20°C foram descongelados para continuação do procedimento de RT-PCR, recebendo 1 μ l de meio acentuador de lise celular e sendo, então, transferidos para o termociclador (Biometra, Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) a 75°C por 10 minutos. Em seguida, cada amostra foi submetida a tratamento com 5 μ l de DNase I, *Amplification Grade* (1U/ μ l) e 1,6 μ l de *buffer* de DNase I (10X) e incubada por cinco minutos em temperatura ambiente. Após esse período, adicionou-se 1,2 μ l de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) a 25mM, a cada tubo mantido no gelo em escamas, sendo então submetidos a novo período de incubação a 70°C por cinco minutos.

Após o tratamento com DNase I adicionaram-se 2 μ l de Oligo (dT) 20 (50mM) e 1 μ l de mistura de dNTP (10mM), sendo então incubados a 70°C por cinco minutos. Em seguida, os tubos foram mantidos em gelo em escamas por dois minutos e receberam 6 μ l de *buffer* de RT (5X), 1 μ l de RNaseOUT™, 1 μ l de SuperScript™ III RT (200 U/ μ l) e 1 μ l de DTT (0,1 mM).

Os tubos foram incubados por 50 minutos a 50°C e a reação foi inativada com sua exposição a 85°C por cinco minutos. Adicionou-se 1 μ l de RNase H

(2 U/ μ l) a cada tubo que novamente foram incubados agora a 37°C por 20 minutos. Após essa etapa, a reação foi esfriada no gelo em escamas e mantida a -20°C até sua amplificação pela técnica de PCR.

3.9.2 Reação em cadeia da polimerase

Para a técnica de PCR preparou-se a mistura principal para a reação final de 50 μ l com os seguintes componentes: 5 μ l de buffer de PCR (10X), 1 μ l de mistura de dNTP (10mM), 1,5 μ l de MgCl₂ (50mM), 1 μ l de cada *primer* (10 mM), 2 μ l do DNAc, 0,4 μ l da enzima Platinum® *Taq* DNA Polymerase (2,0 unidades) e 38,1 μ l de água especial para PCR (*sigma*).

O conteúdo no interior dos tubos foi misturado com o uso de máquina de vortex e então centrifugado (centrífuga Eppendorf modelo 5415) por curto período de tempo para coletar o material no fundo do tubo antes de serem transportados para o termociclador. Inicialmente, foram submetidos a 94°C por um minuto para desnaturar a amostra e ativar a enzima. Realizaram-se então 40 ciclos de amplificação pelo método de PCR seguindo-se os parâmetros: desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 55°C por 39 segundos e síntese a 72°C por 53 segundos. Para a realização da PCR foram utilizados *primers* já descritos na literatura e neste trabalho (quadro 1).

Para mais segurança, confirmou-se a presença dos nucleotídeos no interior de cada RNAm no *site Gene* do *pubmed* e também a possibilidade dos *primers* estudados amplificarem outros genes além daqueles em estudo. Essa segunda análise foi realizada através da ferramenta de pesquisa *Blast* no *site* do *National Center for Biotechnology Information*.

Durante a RT-PCR utilizou-se reação sem transcriptase reversa para o controle negativo da RT-PCR e, para controle positivo, foi utilizado 1µl de RNA total HeLa presente no *kit*.

Utilizaram-se blastocistos sem zonas pelúcidas como controle positivo da PCR para estudo da expressão gênica do OCT-4 e Nanog; a β -actina foi utilizada para controle da presença de amostra. Para controle negativo utilizaram-se 2µl de água destilada. Realizou-se a análise de 10µl do produto da reação de PCR através de eletroforese com uso de gel de agarose a 2%.

Quadro 1 - *Primers* utilizados para PCR

<i>Primers</i> ¹	Seqüência sintetizada (5'→3')	TA (°C)	Tamanho (bp)	Posição no DN _{Ac}	T _m (°C) (50mM NaCl)	Seqüências	Referencias
β - Actina	For-CAA GGT GTG ATG GTG GGA ATG G Rev-CAG GAT GGC GTG AGG GAG AGC A	55	408	43-64 450-429	59.5 64.5	<u>M12481</u>	Kruessel <i>et al.</i> , 1997
IL-1F2	For- AGC CCA TCC TCT GTG ACT CAT G Rev-GCT GAT GTA CCA GTT GGG GAA C	55	422	376-397 797-776	58.7 58.0	<u>M15131</u>	Kruessel <i>et al.</i> , 1997
IL-1F3	For- GCA AGC CTT CAG AAT CTG GGA TAC Rev-CTC AGA GCG GAT GAA GGT AAA GCG	55	283	175-198 457-434	59.2 61.0	<u>NM_031167</u>	Kruessel <i>et al.</i> , 1997
IL-1RI	For-TAT CAT CCT CAC GGC TAC AAT Rev-TTC TCT TCC CAA TCC AGC TCC	55	844	1246-1266 2089-2069	53.2 56.7	<u>AK048550</u>	Kruessel <i>et al.</i> , 1997
OCT-4	For-GGC GTT CTC TTT GGA AAG GTG TTC Rev-CTC GAA CCA CAT CCT TCT CT	55	313	537-560 849-830	60.0 54.8	<u>BC068268</u>	Hay <i>et al.</i> , 2004
Nanog	For-AGG GTC TGC TAC TGA GAT GCT CTG Rev-CAA CCA CTG GTT TTT CTG CCA CCG	55	364	184-207 547-524	59.9 61.0	<u>AY278951</u>	Chambers <i>et al.</i> , 2003
Gata6	For-GCA ATG CAT GCG GTC TCT AC Rev-CTC TTG GTA GCA CCA GCT CA	55	574	1487-1506 2060-2041	56.6 56.8	<u>NM_010258</u>	Hay <i>et al.</i> , 2004
FGF5	For-AAA GTC AAT GGC TCC CAC GAA Rev-CTT CAG TCT GTA CTT CAC TGG	58	464	546-566 990-1010	57.0 52.5	<u>NM_010203</u>	Hay <i>et al.</i> , 2004
<i>Brachyury</i> (T)	For-ATG CCA AAG AAA GAA ACG AC Rev-AGA GGC TGT AGA ACA TGA TT	55	835	764-783 1598-1579	51.4 50.8	<u>NM_007673</u>	Hay <i>et al.</i> , 2004

¹ β -Actina – marcador da presença de células na amostra. IL-1F2 - interleucina-1 beta; IL-1F3 – antagonista do receptor da interleucina-1; IL-1RI – receptor tipo 1 da interleucina-1; OCT-4 e Nanog – marcadores do estado pluripotente. Gata6, FGF5 e *Brachyury* – marcadores de endoderma, ectoderma e mesoderma primitivos, respectivamente.

3.10 Diferenciação de células-tronco em célula contrátil *in vitro*

Utilizou-se metodologia similar à descrita por Wobus *et al.* (2002) para a aquisição de células contráteis semelhantes a cardiomiócitos derivados de células-tronco embrionárias. Duas colônias de CTs foram descongeladas para a realização desse procedimento, de forma rápida em banho-maria a 37°C. O conteúdo de 1ml da suspensão celular descongelada foi diluído em 10ml de meio de cultivo misturado gentilmente e, então, centrifugado. O *pellet* foi ressuspensionado em novo meio de cultivo com LIF em placa de cultivo preparada com gelatina a 0,1%. As colônias foram tratadas com tripsina a cada dois ou três dias até a sua utilização nesse procedimento de diferenciação celular.

Para diferenciação celular realizou-se o tratamento das células com tripsina e neutralização da tripsina com meio de cultivo sem LIF e mediu-se, por meio do hematocítômetro, a concentração das células presentes. A solução celular foi aspirada para dentro do tubo de falcon de 15ml e submetida à centrifugação por quatro minutos a 1000rpm, sendo desprezado o sobrenadante e ressuspensionado o *pellet* em meio de cultivo de fibroblastos, sem a adição de LIF. Utilizou-se novo meio de cultivo, cuja quantidade necessária foi calculada de forma que a nova concentração da suspensão celular proporcionasse a presença de cerca de 500 células para cada microgota de 20µl.

Utilizando-se a superfície interna da cobertura das placas de Petri de 100mm, realizou-se o cultivo de microgotas penduradas. Cada superfície foi preenchida com cerca de 45 microgotas de 20µl. A manutenção das microgotas penduradas facilita a queda gravitacional das cerca de 500 células-tronco contidas em cada microgota e sua agregação na forma de corpos celulares em formato 3D (figura 10).

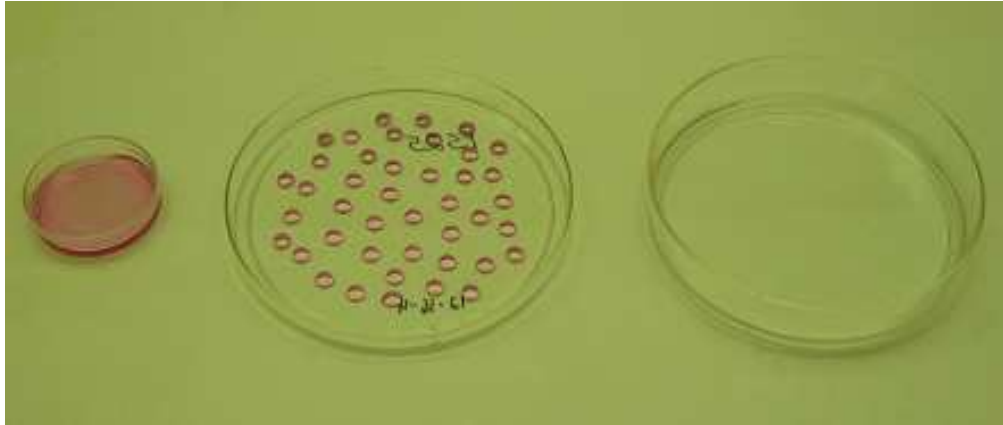


Figura 10 - Superfície interna de placa de Petri de 100mm com cerca de 45 microgotas de 20 μ l.

Os corpos celulares foram cultivados nesse sistema de gotas penduradas por dois dias em incubadora a 37°C e 5% de CO₂. Após esse período, foram cultivados em suspensão por mais cinco dias em placas de Petri de 35mm bacteriológicas sem superfície aderente e transferidos para placas de cultivo de 12 poços preparadas com gelatina a 0,1%.

Após cerca de 10 dias de cultivo sem LIF, começaram a aparecer células com batimento rítmico e constante. Entre o 12^o e 14^o dia de cultivo, foram realizadas biópsias através de microdissecção dessas células sob visão direta em microscópio estereoscópico. Cada biópsia foi avaliada em microscópio invertido para verificar batimentos regulares, antes da análise molecular, cada uma com cerca de 200 a 500 células (figura 11).

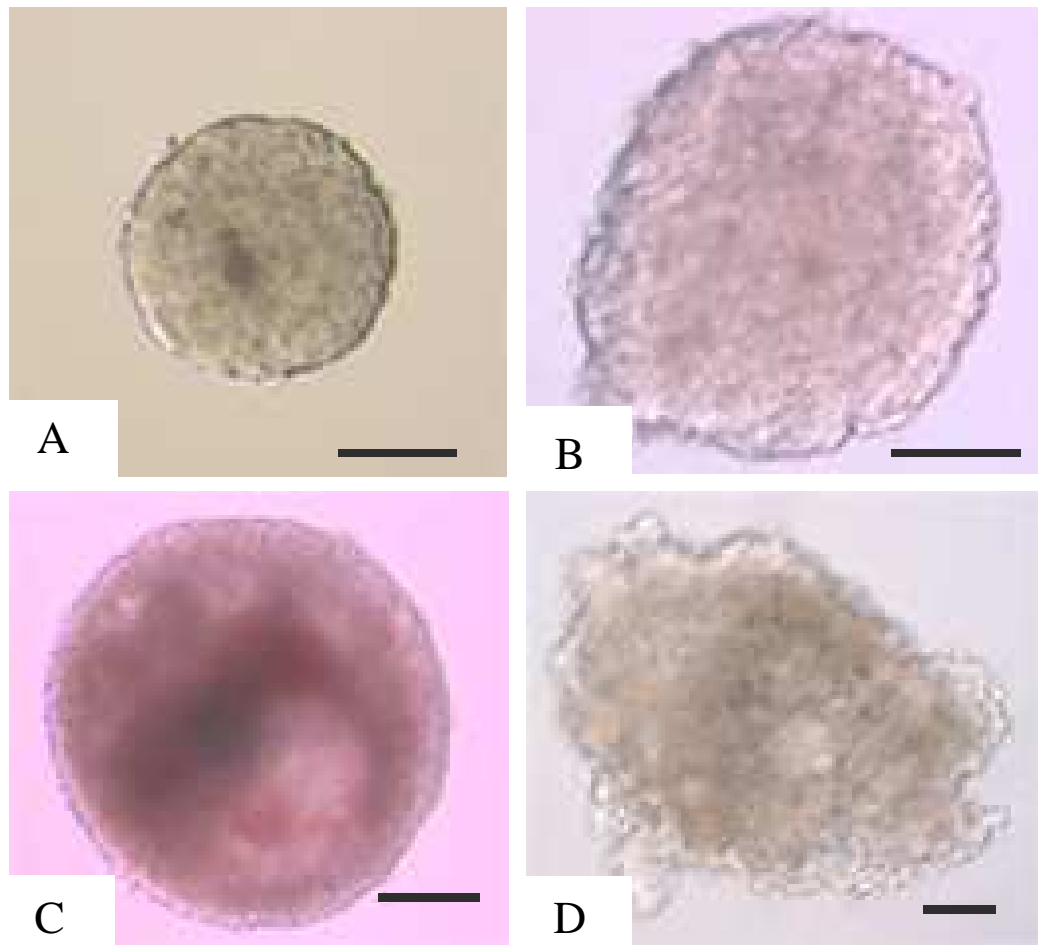


Figura 11 A, B e C - Corpos embrionários após três, cinco e oito dias de cultivo sem LIF, respectivamente. **Figura 11 D** - Biópsia de células contráteis derivadas de célula-tronco no 16^o dia de cultivo sem LIF. Escala: barra = 100 μm .

3.11 Parecer ético

A pesquisa foi realizada no Laboratório de Genética Preimplantacional do Centro de Medicina Reprodutiva e Infertilidade da Faculdade de Medicina da Universidade de Cornell, em Nova York, Estados Unidos, e foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina (COEP - EPM/UNIFESP) e pelo *Institutional Animal Care and Use Committee* (IACUC) da *Cornell University*. Trata-se de estudo longitudinal, prospectivo, descritivo.

3.12 Análise estatística

Foi realizada análise estatística dos resultados da expressão gênica da IL-1 em células-tronco indiferenciadas e células diferenciadas. Utilizou-se programa *Epiinfo* versão 6.04d e admitiu-se como diferença estatisticamente significativa o valor $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

Analisou-se a expressão gênica da família das IL-1 em 45 colônias individuais de células-tronco durante a fase de isolamento e cultivo *in vitro* e durante a diferenciação para células contráteis. Cada uma das nove linhagens isoladas foi analisada através do estudo de colônias removidas na 5^a, 10^a, 15^a, 20^a e 25^a passagens no estado indiferenciado, gerando um total de 45 tubos de PCR. Todas as 45 colônias mostraram-se positivas para a expressão do gene Oct-4; entretanto, três delas não se mostraram positivas para o gene Nanog.

Todas também se mostraram negativas para IL-1F2. Somente uma entre as 45 analisadas (2,2%) foi positiva para IL-1F3 e uma outra (2,2%) foi positiva para IL-1RI (figura 12).

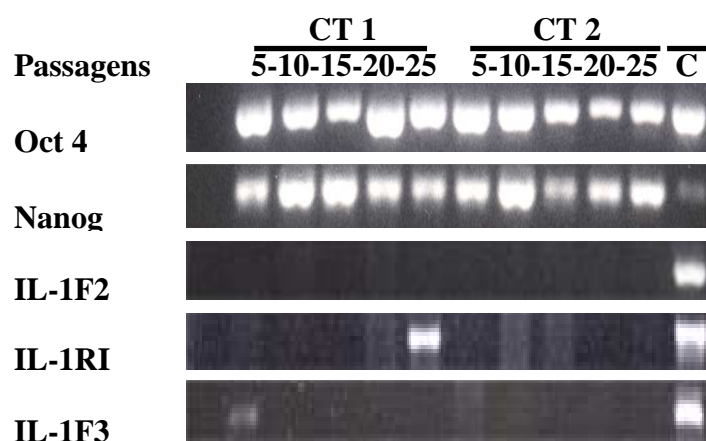


Figura 12 - Expressão da IL-1, Oct4 e Nanog em células-tronco indiferenciadas (CT 1 e 2) na 5a, 10a, 15a, 20a e 25a passagens. Controles (C): blastocisto para Oct 4 e Nanog; RNA hepático de camundongo (50 ng/μl) para IL-1F2, IL-1RI e IL-1F3.

Pesquisou-se, então, a expressão gênica através de marcadores primitivos da diferenciação celular nas três colônias negativas para o Nanog, marcador de estado indiferenciado, e também nas outras que se apresentaram positivas para IL-1F3 e IL-1RI.

Constatou-se que a mesma colônia que se mostrou positiva para IL-1F3 também apresentou RNAm de ectoderma primitivo (FGF5) e endoderma primitivo (Gata6). A única colônia positiva para IL-1RI (figura 12 - 25^a passagem da

colônia de célula-tronco 1) também se revelou positiva para marcador de ectoderma primitivo (FGF5) e mesoderma primitivo (*Brachyury*).

Entretanto, apesar de três das 45 colônias de células-tronco (5^a e 10^a passagens da linhagem de célula-tronco 3^a e 25^a passagem da linhagem de célula-tronco 4) não se mostrarem positivas para o marcador de pluripotencialidade Nanog, também não mostraram expressão gênica positiva para os marcadores de diferenciação celular primitiva Gata6, FGF5 ou *Brachyury* (figura 13).

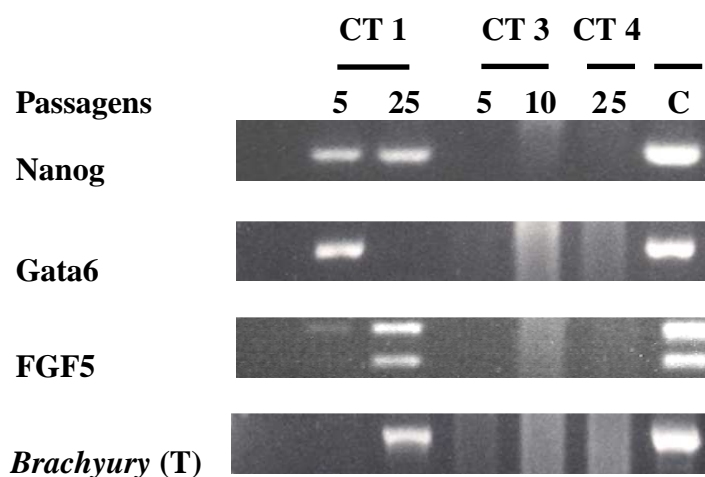


Figura 13 - Endoderma, ectoderma e mesoderma primitivos em colônias de células-tronco com aspecto morfológico indiferenciado. Linhagem de célula-tronco 1 na 5^a e 25^a passagens (CT 1); linhagem de célula-tronco 3 na 5^a e 10^a passagens (CT 3); linhagem de célula-tronco 4 na 25^a passagem (CT 4). Controles (C): blastocisto para Nanog; RNA total de corpo embrionário de 8^o dia de cultivo – 50 ng/μl para Gata6, FGF5 e T.

Para estudo da expressão gênica da IL-1 em um estado de maior diferenciação celular, utilizaram-se oito amostras - quatro de corpos embrionários no 3^o e 5^o dia de cultivo sem LIF e quatro biópsias de células contráteis derivadas de células-tronco embrionárias.

Nenhum dos quatro corpos embrionários estudados mostrou-se positivo para IL- β ; um deles mostrou-se positivo para IL-1F3 e dois positivos para IL-1RI (figura 14). Todas as quatro biópsias de células contráteis foram positivas para IL-1F2 e IL-1F3. Duas delas foram positivas para IL-1RI (figura 15).

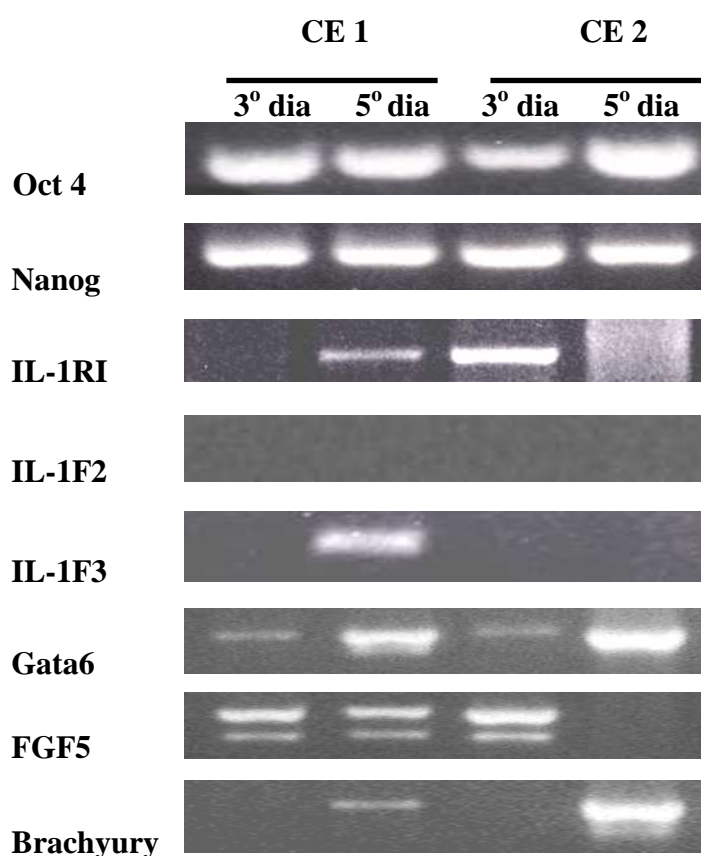


Figura 14 - Expressão gênica da IL-1 em corpos embrionários durante a diferenciação celular. Corpos embrionários gerados das linhagens de células-tronco 1 e 2 estudados no 3^o e 5^o dia de cultivo sem LIF (CE 1 e CE 2). Controles: blastocisto para Oct 4 e Nanog; RNA total hepático de camundongo – 50 ng/ μ l para IL-1F2, IL-1RI e IL-1F3; RNA total de corpo embrionário de 8^o dia de cultivo sem LIF para Gata6, FGF5 e T.

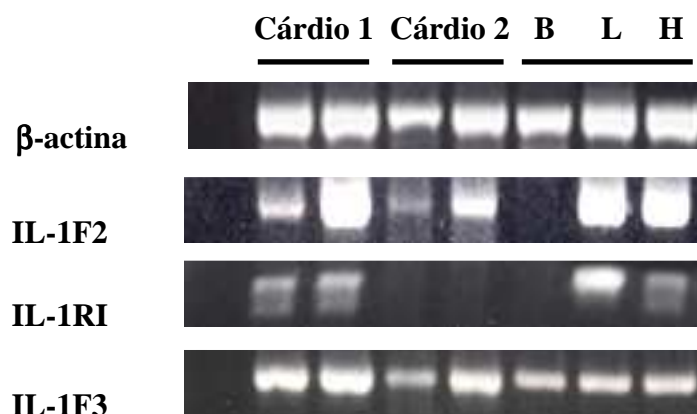


Figura 15 - Expressão da IL-1 em células contráteis derivados de células-tronco embrionárias. Células contráteis gerados da linhagem de célula-tronco 1 e 2 (Córdio 1 e 2). Controles: blastocisto (B); RNA total hepático (L); RNA total cardíaco (H).

Dividindo-se as amostras estudadas de acordo com o estado de diferenciação celular em grupo A - correspondendo às 45 colônias indiferenciadas - e grupo B - correspondendo às oito amostras de células cultivadas sem LIF - para promover a diferenciação celular, percebeu-se diferença estatisticamente significativa entre eles quando se pesquisou a presença de componentes da família da IL-1 (tabela 1).

Tabela 1 - Expressão da IL-1 em células-tronco indiferenciadas e após diferenciação sem LIF

<i>Primers</i> ¹	Grupo A	Grupo B	Valor p
IL-1F2	0/45	4/8	< 0,001
IL-1F3	1/45	5/8	< 0,001
IL-1RI	1/45	4/8	< 0,001

¹ IL-1F2 - interleucina-1 beta; IL-1F3 – antagonista do receptor de interleucina-1; IL-1RI – receptor tipo 1 de interleucina-1. Grupo A - Células-tronco indiferenciadas; grupo B - Células diferenciadas. Valor p calculado pelo Fisher.

5 DISCUSSÃO

Estudos iniciais com RT-PCR para avaliar a expressão gênica da família da IL-1 descreviam a necessidade do uso de *pool* de embriões de camundongos para obtenção de quantidade mínima de material para análise (Huang *et al.*, 1997). Posteriormente, foram relatados métodos que utilizavam um único embrião (Kruessel *et al.*, 1997); entretanto, mesmo neste último caso, o resultado encontrado não pode ser atribuído a tipo celular específico, pois a presença de RNAm poderia estar sendo provocada pela massa celular interna ou pelo trofoblasto ou mesmo por ambos.

Da mesma forma, a maioria das pesquisas que descreveram métodos de análise de expressão gênica de CTs embrionárias utilizaram *pool* de colônias em seus protocolos de RT-PCR (Niwa *et al.*, 2000; Chambers *et al.*, 2003; Hay *et al.*, 2004). Um resultado de PCR positivo em protocolos habituais que demandam amostras com alguns microgramas para extração de RNA total após lise celular não permite concluir que cada uma das milhares de colônias presentes no poço de cultivo secrete esse produto específico. Percebeu-se, dessa forma, que a maioria dos resultados publicados na literatura não pode ser extrapolada para todas as colônias.

Não se sabe ao certo a explicação científica para o fato das CTs embrionárias crescerem de forma agrupada, formando unidades funcionais típicas que são as colônias. O estudo molecular individualizado dessas colônias proporcionará mais informação sobre o porquê dessa característica.

As CTs embrionárias não são idênticas às células da MCI. Entretanto, apresentam expressão gênica similar, confirmada pela presença de antígenos de superfície de estágio específico (Henderson *et al.*, 2002). O estudo *in vitro* de CTs embrionárias mantidas em estágio indiferenciado pode refletir informações consistentes sobre a MCI no blastocisto, assim como o estudo da diferenciação celular *in vitro* nesse grupo especial de células pode ajudar a elucidar mudanças na expressão gênica durante a embriogênese.

Apesar da possibilidade do uso de linhagens celulares de CTs adquiridas de diferentes grupos científicos (Nagy *et al.*, 2003c), optou-se por isolá-las em laboratório para controle de variáveis que poderiam vir a alterar os resultados da pesquisa, como, por exemplo, mudanças de pH, crescimento celular descontrolado e mudanças de temperatura (Roach, Mcneish, 2002). As CTs são sensíveis e adquirem

mutações genéticas progressivas se cultivadas de forma inapropriada (Nagy *et al.*, 2003c). Outra justificativa para a escolha de estudar-se a expressão gênica durante as fases iniciais de isolamento é que os resultados provavelmente seriam diferentes se se utilizassem CTs cultivadas por longos períodos de tempo e submetidas a diversas passagens.

Nesta pesquisa, utilizaram-se camadas alimentadoras de fibroblastos apenas durante a primeira parte, quando da semeadura de blastocistos, para evitar a possível detecção de genes expressos nesses fibroblastos. Essa é a metodologia mais utilizada, sendo os fibroblastos tratados com mitomicina, a qual acarreta dano ao DNA, impedindo a replicação celular do fibroblasto e permitindo, assim, a replicação apenas da CT. O uso de novas camadas alimentadoras de fibroblastos é comum em muitos protocolos de isolamento de CT.

Esse método foi possível porque as CTs embrionárias de camundongos podem ser mantidas em estado pluripotente em placas de cultivo tratadas com gelatina, sem a necessidade do uso de camada alimentadora de fibroblastos, desde que tenha sido adicionado LIF no meio de cultivo (Nagy *et al.*, 2003c). Utilizando-se de concentração de 2.000UI /ml de LIF no meio de cultivo, foi possível manter a cultura celular por mais de 25 passagens num estágio indiferenciado, conforme demonstrado pela presença dos marcadores Oct-4 e Nanog até a 25^a passagem avaliada.

Apesar de não haver consenso sobre qual a melhor definição de CT embrionária, alguns marcadores moleculares têm sido utilizados para confirmação do estado pluripotente em que se encontram. Para tanto, emprega-se a técnica de RT-PCR no estudo dos genes Oct-4 e Nanog. Este último codifica uma proteína envolvida no controle da expressão gênica durante a morfogênese e desenvolvimento, mantendo a propagação de CT em estado indiferenciado. Em embriões, a expressão dessa proteína está restrita às células da MCI, das quais as CTs embrionárias podem ser isoladas (Chambers *et al.*, 2003). Já a expressão gênica do Oct4 se sobrepõe à do Nanog. No entanto, ela ocorre antes e após a janela de tempo durante a qual podem se isolar as CT (Smith, 2001).

Um dado interessante da presente pesquisa foi a ausência de expressão do Nanog na linhagem 3 (5^a e 10^a passagens, figura 13) e também na linhagem 4 (25^a passagem), embora nenhuma dessas três colônias tenha revelado sinais de diferenciação celular. Esse achado foi repetido e confirmado e exemplifica a importância do uso de metodologias que estudam em separado as colônias, pois muito provavelmente não teria sido revelado caso se houvesse utilizado o protocolo habitual de extração de RNA através de *pool* de colônias. Uma colônia com resultado negativo seria mascarada por outras com resultado positivo presentes no mesmo poço de cultivo.

Como o IL-1RI é encontrado em quase todas as células (Dinarello, 1994), foi surpresa o achado de apenas uma colônia expressando esse gene entre 45 colônias estudadas (25^a passagem da linhagem 1). Isso pode ser explicado pelo possível controle epigenético impedindo a expressão desse gene em CTs indiferenciadas de camundongos e liberando sua expressão durante o processo de diferenciação celular. A mesma explicação pode ser usada para a existência de apenas uma colônia positiva para o gene IL-1F3 (5^a passagem da linhagem 1) entre as mesmas 45 colônias e nenhuma delas expressando o gene IL-1F2 (figura 11).

Outro ponto favorável a essa teoria é que a única colônia positiva para IL-1RI também se revelou positiva para o gene FGF5, um dos marcadores de ectoderma primitivo, e para o gene *Brachyury*, um dos marcadores de mesoderma primitivo (25^a passagem da linhagem 1), e também pelo resultado, que revelou que a mesma colônia positiva para o gene IL-1F3 também foi positiva para o gene Gata 6, um dos marcadores de endoderma primitivo, e para o gene FGF5 (figura 13).

O início da expressão gênica da IL-1 em CTs embrionárias pode estar condicionado a mudança nos fatores epigenéticos que mantêm a célula em estado pluripotente. A diferenciação celular, que sinaliza mudança nesses fatores, permite a expressão gênica dessa família.

A metodologia preconizada atualmente para cultivo de CT *in vitro* em estado indiferenciado (Nagy *et al.*, 2003b), como, por exemplo, o uso de 2.000UI/ml de LIF, soro fetal bovino a 20% e tratamento com tripsina a cada dois ou três dias para manter o tamanho médio de cada colônia menor que 400µm, não foi

suficiente para impedir o aparecimento de células com características moleculares de diferenciação. Esse modelo não impede que algumas células se diferenciem dentro de algumas colônias, explicando a presença de marcadores de diferenciação nas colônias com expressão de IL-1.

Células-tronco embrionárias de camundongos podem permanecer em estado indiferenciado na presença de LIF, o qual age através de seu complexo receptor composto de um receptor de baixa afinidade para LIF (LIFR β) e o gp130, uma subunidade de receptor comum à família das citocinas IL-6. O LIF se liga ao LIFR β formando um complexo heterodímero de alta afinidade com o gp130. Este ativa a via STAT3, que mantém o estado indiferenciado (Matsuda *et al.*, 1999).

Como haviam sido encontradas amostras positivas para a IL-1 em colônias que já demonstravam sinais de diferenciação celular, completou-se o estudo das IL-1 em células cultivadas sem o LIF, em processo de diferenciação celular.

Estudando corpos embrionários, novamente não se detectou a presença da IL-1F2 no 3^o ou 5^o dia de cultivo em gotas suspensas. Encontrou-se um corpo embrionário positivo para IL-1RI no 3^o dia de cultivo sem LIF (figura 14), cuja linhagem de origem, linhagem CT 2, não havia demonstrado colônia positiva para esse gene nas passagens analisadas (5^a, 10^a, 15^a, 20^a e 25^a - figura 12).

Na figura 14, percebe-se que além dos genes da IL-1 também se expressaram os marcadores de estado pluripotente analisados, Nanog e Oct4. Sabe-se que esses marcadores deixam, em geral, de se expressar numa célula diferenciada num processo conhecido como *down regulation*, enquanto outros iniciam sua expressão. Aparentemente, os genes da IL-1 iniciam sua expressão independentemente do *down regulation* desses marcadores de pluripotência.

Para o estudo de fase avançada de diferenciação celular, optou-se por diferenciar CTs embrionárias em células contráteis de aspecto similar a cardiomiócitos, pois elas têm a peculiaridade de manter movimento rítmico contínuo, que é um marcador visual específico de tecido semelhante a tecido cardíaco, justificando a não inclusão de marcadores moleculares desse tecido. Essa propriedade contrátil facilitou a identificação e biópsia por microdissecção dirigida.

As quatro biópsias analisadas revelaram-se positivas para IL-1F3 e IL-1F2. Aqui se observou o aparecimento da expressão gênica da IL-1F2 pela primeira vez, sendo expressa apenas após longo período de cultivo sem LIF. Duas das quatro biópsias mostraram-se positivas para o gene IL-1RI.

Ao se compararem os resultados da avaliação das IL-1 nas 45 colônias mantidas em estado indiferenciado com outro grupo composto de oito amostras de células em processo de diferenciação, percebeu-se diferença estatística significativa para os três genes estudados: IL-1F2, IL-1F3 e IL-1RI (tabela 1). Verificou-se maior proporção de componentes da família das IL-1 em células em processo de diferenciação celular quando comparadas às colônias de CTs embrionárias.

Espera-se que um estudo intensivo nessa área venha a responder muitas questões em reprodução humana, como, por exemplo, o fato da taxa de implantação estar situada em cerca de 15% para cada embrião transferido durante os tratamentos pelas Técnicas de Reprodução Assistida (TRA).

Segundo se sabe, este é o primeiro trabalho científico que utilizou tal metodologia para o estudo da família das IL-1 em colônias individuais de CTs embrionárias. O protocolo utilizado permite trabalhar com material contendo quantidades tão pequenas quanto 10pg de RNA total, o que foi útil para o estudo da expressão gênica em uma única colônia.

6 CONCLUSÕES

Esta pesquisa permitiu concluir que :

1 – Células-tronco embrionárias indiferenciadas de camundongo não apresentam expressão gênica das IL-1F2, IL-1F3 e IL-1RI.

2 – A expressão gênica das IL-1F2, IL-1F3 e IL-1RI evidencia-se após a diferenciação celular, apresentando mais frequência em relação às células-tronco embrionárias.

7 REFERÊNCIAS

- Abbondanzo S, Cullinan E, McIntyre K, Labow M, Stewart C. Reproduction in mice lacking a functional type 1 IL-1 receptor. *Endocrinology*. August 1, 1996;137(8):3598-3601.
- Aubin JE, Liu F, Candelieri GA. Single-cell PCR methods for studying stem cells and progenitors. *Methods Mol Biol*. 2002;185:403-415.
- Chambers I, Colby D, Robertson M, et al. Functional Expression Cloning of Nanog, a Pluripotency Sustaining Factor in Embryonic Stem Cells. *Cell*. 2003/5/30 2003;113(5):643-655.
- Dinarello CA. The interleukin-1 family: 10 years of discovery. *The FASEB Journal*. 1994;8:1314-1325.
- Dunn E, Sims JE, Nicklin MJH, O'Neill LAJ. Annotating genes with potential roles in the immune system: six new members of the IL-1 family. *Trends in Immunology*. 2001;22(10):533-536.
- Hay DC, Sutherland L, Clark J, Burdon T. Oct-4 Knockdown Induces Similar Patterns of Endoderm and Trophoblast Differentiation Markers in Human and Mouse Embryonic Stem Cells. *Stem Cells*. March 1, 2004;22(2):225-235.
- Hart A, Hartley L, Ibrahim M, Robb L. Identification, cloning and expression analysis of the pluripotency promoting Nanog genes in mouse and human. *Developmental Dynamics*. 2004;230:187-198.
- Henderson JK, Draper JS, Baillie HS, et al. Preimplantation Human Embryos and Embryonic Stem Cells Show Comparable Expression of Stage-Specific Embryonic Antigens. *Stem Cells*. July 1, 2002;20(4):329-337.
- Hill JA. Maternal-Embryonic Cross-Talk. *Ann NY Acad Sci*. September 1, 2001;943(1):17-25.
- Hoozemans DA, Schats R, Lambalk CB, Homburg R, Hompes PGA. Human embryo implantation: current knowledge and clinical implications in assisted reproductive technology. *Reproductive Biomedicine Online*. December 2004;9(6):692-715.
- Huang H, Krussel J, Wen Y, Polan M. Use of reverse transcription-polymerase chain reaction to detect embryonic interleukin-1 system messenger RNA in individual preimplantation mouse embryos co-cultured with Vero cells. *Hum. Reprod*. July 1, 1997;12(7):1537-1544.
- Ivanova NB, Dimos JT, Schaniel C, Hackney JA, Moore KA, Lemischka IR. A Stem Cell Molecular Signature. *Science*. October 18, 2002;298(5593):601-604.

Kruessel JS, Huang H-Y, Wen Y, Kloodt AR, Bielfeld P, Polan ML. Different pattern of interleukin-1[beta]-(IL-1[beta]), interleukin-1 receptor antagonist- (IL-1ra) and interleukin-1 receptor type I- (IL-1R tI) mRNA-expression in single preimplantation mouse embryos at various developmental stages. *Journal of Reproductive Immunology*. 1997;34(2):103-120.

Matsuda T, Nakamura T, Nakao K, et al. STAT3 activation is sufficient to maintain an undifferentiated state of mouse embryonic stem cells. *EMBO J*. August 2, 1999;18(15):4261-4269.

Nagy A, Gertsenstein M, Vintersten K, Behinger R. *Developmental genetics and embryology of the mouse: past, present, and future. Manipulating the mouse embryo: a laboratory manual. third edition ed.* Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2003a:31-140.

Nagy A, Gertsenstein M, Vintersten K, Behinger R. *Techniques for visualizing gene products, cells, tissues, and organ systems. Manipulating the mouse embryo: a laboratory manual. third edition ed.* Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2003b:629-706.

Nagy A, Gertsenstein M, Vintersten K, Behinger R. *Isolation and culture of blastocyst-derived stem cell lines. Manipulating the mouse embryo: a laboratory manual. third edition ed.* Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2003c:359-397.

Niwa H, Miyazaki J, Smith AG. Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat. Genet.* // 2000;24:372-376.

Roach ML, McNeish JD. *Embryonic stem cells: methods and protocols.* In: Turksen K, ed. *Methods in Molecular Biology.* Totowa: Humana Press; 2002:1-16.

Sato N, Meijer L, Skaltsounis L, Greengard P, Brivanlou AH. Maintenance of pluripotency in human and mouse embryonic stem cells through activation of Wnt signaling by a pharmacological GSK-3-specific inhibitor. *Nat Med.* 01//print 2004;10(1):55-63.

Simon C, Valbuena D, Krussel J, et al. Interleukin-1 receptor antagonist prevents embryonic implantation by a direct effect on the endometrial epithelium. *Fertility and Sterility.* 11 1998;70(5):896-906.

Sims JE, Pan Y, Smith DE, et al. A new nomenclature for IL-1-family genes. *Trends in Immunology.* 2001;22(10):536-537.

Smith AG. *Embryo-derived Stem Cells: of Mice and Men.* *Annual Review of Cell and Developmental Biology.* 2001;17(1):435-462.

Sperger JM, Chen X, Draper JS, et al. Gene expression patterns in human embryonic stem cells and human pluripotent germ cell tumors. PNAS. November 11, 2003 2003;100(23):13350-13355.

Strachan T, Read AP. Human Molecular Genetics. 3rd ed. New York: Garland Science; 2003.

Takacs P, Kauma S. The expression of Interleukin-1[alpha], Interleukin-1[beta], and Interleukin-1 receptor type I mRNA during preimplantation mouse development. Journal of Reproductive Immunology. 11 1996;32(1):27-35.

Wobus AM, Boheler KR. Embryonic Stem Cells: Prospects for Developmental Biology and Cell Therapy. Physiol. Rev. April 1, 2005;85(2):635-678.

Wobus AM, Guan K, Yang H-T, Boheler KR. Embryonic Stem Cells as a Model to Study Cardiac, Skeletal Muscle, and Vascular Smooth Muscle Cell Differentiation. In: Turksen K, ed. Methods in molecular biology. Ottawa: Humana Press; 2002:127-156.

Zheng H, Fletcher D, Kozak W, et al. Resistance to fever induction and impaired acute-phase response in interleukin-1[beta]-deficient mice. Immunity. 1995;3(1):9-19.

Abstract

Purpose: this work objectived to study the IL-1 family gene expression in undifferentiated mouse embryonic stem (ES) cells and during diferentiation into cardiomyocytes. **Methods:** Colonies at 5, 10, 15, 20 and 25th passages were taken to perform RT-PCR using SuperScript™ III CellsDirect cDNA Synthesis System. PCR amplification of cDNA was done with Platinum® Taq DNA Polymerase. We used Interleukin-1 β (IL-1F2), IL-1 receptor antagonist (IL-1F3) and IL-1 receptor type I (IL-1RI) primers. **Results:** all 45 undifferentiated ES cells were negative for IL-1F2; one out of 45 (2,2%) was positive for IL-1F3 and also for primitive ectoderm (FGF5) and endoderm (Gata6) markers; one out of 45 (2,2%) was positive for IL-1RI and also for ectoderm and mesoderm. To further study IL-1 at a late stage of cell differentiation, we used embroyd bodies (EB) at day 3 and 5 and ES cell derived cardiomyocytes. None of four embroid bodies studied were positive for IL-1F2. One out of four EB was positive for IL-1F3 and two out of four EB were positive for IL-1RI. Four out of 4 ES cells derived cardiomyocytes were positive for IL-1F2 and also for IL-1F3. Two out of 4 ES cells derived cardiomyocytes were positive for IL-1RI. Two out of 4 ES cells derived cardiomyocytes were positive for IL-1RI. To our knowledge this is the first time to describe an IL-1 family gene expression study in undifferentiated single mouse ES cells. **Conclusion:** undifferentiated mouse ES cells studied didn't produce major components of IL-1 family.