

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE MEDICINA**

Francisco de Assis Nunes Pereira

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE TELOMERASE
EM CÉLULAS-TRONCO EMBRIONÁRIAS
INDIFERENCIADAS E EM CÉLULAS
NEOPLÁSICAS DE CAMUNDONGO**

Belo Horizonte

2008

FRANCISCO DE ASSIS NUNES PEREIRA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE TELOMERASE
EM CÉLULAS-TRONCO EMBRIONÁRIAS
INDIFERENCIADAS E EM CÉLULAS
NEOPLÁSICAS DE CAMUNDONGO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde da Mulher, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Saúde da Mulher.

Área de Concentração: Ciências da Reprodução Humana.

Orientador: Agnaldo Lopes da Silva Filho.

Co-Orientador: Rubens Lene Carvalho
Tavares.

Belo Horizonte

2008

Pereira, Francisco de Assis Nunes.
.P436a Avaliação da atividade de telomerase em células-tronco embrionárias indiferenciadas e em células neoplásicas de camundongo [manuscrito]. / Francisco de Assis Nunes Pereira. - - Belo Horizonte: 2008.
60f.: il.
Orientador: Agnaldo Lopes da Silva Filho.
Co-orientador: Rubens Lene Carvalho Tavares.
Área de concentração: Saúde da Mulher.
Dissertação (mestrado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. Células-Tronco Embrionárias. 2. Telomerase. 3. Células Tumorais Cultivadas. 4. Dissertações acadêmicas. I. Silva Filho, Agnaldo Lopes. II. Tavares, Rubens Lene Carvalho. III. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. IV. Título

NLM: QU 328

À minha esposa Maria Thereza,
pelo significado pleno do encontro.

Ao meu filho Francisco,
por me mostrar a beleza da vida.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Aroldo Fernando Camargos, professor, pai e amigo, pelas lições carregadas de sabedoria e carinho.

Ao Professor Agnaldo Lopes da Silva Filho, orientador, pelo exemplo de profissionalismo e competência.

Ao Professor Rubens Lene Carvalho Tavares, co-orientador, pela amizade e exemplo de rigor científico.

Ao Professor Fernando Marcos dos Reis, pela pronta e inestimável ajuda.

A Professora Suzane Pretti Figueiredo Neves, e funcionários do Laboratório de Sorologia da UFMG, pela disponibilidade e paciência.

Aos amigos do Laboratório de Reprodução Humana do HC-UFMG, Prof^a. Márcia M. Carneiro, Dr^a. Cláudia Navarro C. D. Lemos, Dr^a. Ines Katerina D. C. Cruzeiro, Dra. Márcia Cristina F. Ferreira, Dr. Paulo H. Boy Torres, Dr^a. Simone F. Nery, Maria das Graças R. S. Camargos, Marco Aurélio F. Vieira, Edna M. C. Sant'anna, Juliana A. Oliveira e a todos aqueles que contribuíram para a realização deste trabalho.

Ao Ivan Fagundes Batista, pela revisão da língua inglesa e valiosa amizade.

Ao meu pai, Athos, pelo exemplo de retidão e caráter.

A minha mãe, Vera, pelo exemplo de indignação frente às injustiças do mundo,

Aos meus irmãos, Maria Clara e Pedro, pelo companheirismo.

A minha esposa, Maria Thereza, alma gêmea da minha vida.

Ao meu filho, Francisco, anjo de Deus.

Este trabalho foi financiado pelo Centro de Pós-Graduação em Saúde da Mulher da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), por intermédio de projeto apresentado à Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais, com recursos doados pelo Laboratório Bayer Schering Farma, da Alemanha, e de bolsa fornecida pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

RESUMO

A telomerase é uma enzima envolvida na manutenção da capacidade de replicação das células e na proteção e estabilização dos cromossomos. Sua função principal é reconstruir os telômeros, seqüências repetitivas situadas nas pontas de cada cromossomo, que protegem contra danos no ácido desoxirribonucléico (DNA) e que também funcionam como relógio biológico, limitando o número de vezes pelas quais a célula pode se dividir. A telomerase encontra-se ativa em células com alta capacidade de replicação, como células-tronco e células neoplásicas, e não é detectada na maioria das células diferenciadas de um organismo adulto. O estudo da telomerase pode resultar em maneiras de se controlar, aumentando-se ou inibindo-se, a capacidade de replicação celular, situação bastante útil tanto no campo da oncologia quanto no processo de terapia celular com células-tronco. Os objetivos deste trabalho foram: avaliar a atividade da telomerase (AT) em diferentes passagens de células-tronco embrionárias indiferenciadas de camundongo (CTEc) e comparar a AT das CTEc com linhagens de células de tumor de camundongo. Foi utilizado o método TRAP-ELISA para avaliação semiquantitativa da AT. Foram estudadas três linhagens de CTEc, denominadas CT2, CT3 e CT4. As passagens celulares avaliadas foram as de número 13, 15 e 19, denominadas P13, P15 e P19, respectivamente. Todas as passagens celulares foram avaliadas em relação ao estado de indiferenciação, a partir da presença dos genes OCT4 e NANOG. As linhagens de tumor avaliadas foram B16F1 (melanoma), B16F10 (melanoma metastático) e CT26WT (tumor de cólon). Os resultados são expressos em porcentagem diante de um padrão com alta AT conhecida. A CT2 apresentou 1,09% em P13, 13,24% em P15 e 36,90% em P19. A CT3 apresentou 1,46% em P13, 21,82% em P15 e 22,37% em P19. A CT4 apresentou 3,82% em P13, 39,05% em P15 e 34,22% em P19. A média das três linhagens foi P13 1,59%, P15 18,53% e P19 23,37%. As linhagens de tumor B16F1, B16F10 e CT26WT apresentaram, respectivamente, 128,60, 1,45 e 30,94%. Nas três passagens de CTEc avaliadas, observou-se tendência a aumento inicial, com posterior estabilização da AT. As linhagens celulares de tumor de camundongo apresentam AT com valores mais variáveis. Os resultados permitem concluir que tanto as CTEc quanto as linhagens de tumor apresentam alta capacidade de multiplicação, expressa pelas medidas elevadas de AT encontradas.

Palavras-chave: Telomerase. Células-tronco embrionárias. Células tumorais. Proliferação celular. TRAP-ELISA.

ABSTRACT

Telomerase is an enzyme which plays a role in the maintenance of the proliferation ability of the cells and in the protection and stabilization of the chromosomes. The main function of telomerase is to add telomere sequences at the end of each chromosome, protecting it from DNA damage, and functioning as a biological clock, limiting the maximum number of divisions each cell can undergo. The telomerase activity (TA) can be detected in highly replicative cells, like stem cells and cancer cells, but not in the majority of the differentiated cells of the human organism. The study of telomerase can result in efficient forms of controlling the cell proliferation ability, can also be useful both in the treatment of cancer and also in the researches concerning stem cell therapy. The purpose of this study is to evaluate the TA in different passages of mouse embryonic stem cells (mESC) and to compare the TA of the mESC with mouse neoplastic cells. TRAP-ELISA method was used in a semiquantitative evaluation of TA. Three mESC lineages were evaluated, named CT2, CT3 and CT4 respectively, in three different passages (P13, P15 and P19) each one. All the samples were evaluated according to the presence of undifferentiation markers (genes OCT4 and NANOG). All the samples were evaluated according to the presence of undifferentiation markers (genes OCT4 and NANOG). The cancer cells evaluated were B16F1 (melanoma); B16F10 (metastatic melanoma) and CT26WT (colon carcinoma). The results are expressed as percentage in conformity with a standard of highly known TA. The CT2 showed 1.09%, 13.24% and 36.90% in P13, P15 and P19 respectively. The CT3 showed 1.46%, 21.82% and 22.37% in P13, P15 and P19 respectively. The CT4 showed 3.82%, 39.05% and 34.22% respectively. The mean TA of the three mESC lineages was 1.59% in P13, 18.53% in P15 and 23.37% in P19. The cancer lineages B16F1, B16F10 e CT26WT showed 128.60%, 1.45% and 30.94% respectively. The results obtained demonstrated all the samples with high TA. The three passages of mESC showed a tendency of increase in TA and subsequent stabilization. The cancer lineages showed more variable TA values. The results achieved after data analysis let us conclude that both mESC and cancer lineages demonstrate a high capacity of proliferation, due to the high values of TA found in this study.

Keywords: Telomerase. Embryonic stem cells. Cancer cells. Cell proliferation. TRAP-ELISA.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AntiDIG	Antidigoxigenina
AT	Atividade de telomerase
BP	Pares de bases nitrogenadas
CETEA	Comitê de Ética em Experimentação Animal
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CO ₂	Dióxido de carbono
CT	Células-tronco
CTE	Células-tronco embrionárias
CTEc	Células-tronco embrionárias indiferenciadas de camundongo
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DNase	Enzima de degradação do ácido desoxirribonucléico
DPBS	Solução salina <i>Dulbecco</i> tamponada com fosfato
DTT	<i>Dithiothreitol</i>
EDTA	Etilenodiamino tetra-acético
ELISA	<i>Enzyme-linked immunoabsorbent assay</i>
Eq.Cel.	Equivalentes celulares
EUA	Estados Unidos da América
GGT	Gama Glutamil Transferase
hCG	<i>Human chorionic gonadotropin</i>
HER2	<i>Human epidermal growth factor receptor-type 2</i>
IP	Intraperitoneal
LIF	<i>Leukemia inhibitor factor</i>
MCI	Massa celular interna dos blastocistos
MEM	Aminoácidos não-essenciais
mL	Mililitro
Mm	Milímetro

mM	Milimol
NaCl	Cloreto de sódio
nM	Concentração nanomolar
Nm	Nanômetro
PBS sem Ca ⁺⁺ /MG ⁺⁺	Solução salina tamponada com fosfato, sem cálcio e magnésio
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pH	Potencial de hidrogênio
PMEF-H	<i>Primary mouse embryo fibroblasts hygro resistant</i>
PMSG	<i>Pregnant mare serum gonadotropin</i>
RNA	Ácido ribonucléico
RNAm	RNA mensageiro
RNase	Enzima de degradação do ácido ribonucléico
RNase OUT	Inibidor da enzima de degradação do ácido ribonucléico
RPM	Rotações por minuto
RTA	Atividade relativa de telomerase
RT-PCR	<i>Reverse transcriptase – polimerase chain reaction</i>
TMB	Tetrametilbenzidina
TNQX	2,3,7-trichloro-5-nitroquinoxaline
TRAP	<i>Telomerase Repeat Amplification Protocol</i>
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
UI	Unidades Internacionais
USF 1 e 2	<i>Upstream transcriptional factor 1 e 2</i>
Mm	Micrômetro

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figuras

FIGURA 1 - Cromossomos vistos pela técnica de Fish.....	13
FIGURA 2 - Desenho esquemático da telomerase e seus componentes (hTERT, DKC1, hTERC).....	15
FIGURA 3 - Diminuição progressiva dos telômeros a cada divisão celular, com progressão para o estado de senescência ou apoptose, a não ser que seja recuperada pela ação da telomerase ou pela recombinação homóloga.....	16
FIGURA 4 - Desenho esquemático da ligação das proteínas teloméricas (TRF1, TRF2, TIN2, TPP1, POT1, RAP1, Ku 70/80) aos telômeros.....	17
FIGURA 5 - Cálculo amostral para o isolamento de novas linhagens de CTEc.....	29
FIGURA 6 - Fotografia de gel de eletroforese contendo produto de PCR do gene OCT4 de algumas amostras celulares estudadas.....	46
FIGURA 7 - Fotografia de gel de eletroforese contendo produto de PCR do gene NANOG de algumas amostras celulares estudadas.....	46
FIGURA 8 - Fotografia de gel de eletroforese contendo produto de PCR do gene B-Actina de algumas amostras celulares estudadas.....	46

Gráficos

GRÁFICO 1 - Atividade de telomerase avaliada em três linhagens de CTEc, em três diferentes passagens celulares.....	48
GRÁFICO 2 - Comparação da AT entre as linhagens de CTEc e as linhagens de tumor de camundongo.....	49

Quadros

QUADRO 1 - <i>Primers</i> utilizados em RT-PCR de camundongos.....	38
QUADRO 2 - Protocolo para transferência dos tubos para o termociclador para alongamento e amplificação.....	41
QUADRO 3 - Avaliação da presença de atividade dos genes de indiferenciação, em diferentes passagens celulares das três linhagens de CTEc.....	45

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	13
1.1 Telomerase.....	13
1.2 Células-tronco.....	19
1.3 Telomerase em células-tronco.....	21
1.4 Telomerase em células tumorais.....	22
1.5 Terapias baseadas na telomerase.....	23
1.6 Justificativas.....	26
2 OBJETIVOS.....	27
2.1 Objetivo geral.....	27
2.2 Objetivo específico.....	27
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	28
3.1 Material.....	28
3.2 Superovulação e coleta embrionária.....	29
3.2.1 Superovulação.....	29
3.2.2 Coleta embrionária.....	30
3.3 Cultivo de embriões.....	31
3.3.1 Placas de cultivo de embriões.....	31
3.3.2 Cultivo dos embriões.....	33
3.4 Isolamento e cultivo de células-tronco.....	33
3.4.1 Meio de cultivo de CTEc.....	33
3.4.2 Isolamento de novas linhagens de CTEc.....	34
3.5 Identificação dos marcadores moleculares de indiferenciação das CTEc	35
3.5.1 RT-PCR.....	35
3.5.2 Reação em cadeia da polimerase	37
3.6 Cultivo das células de câncer.....	38
3.7 Avaliação da atividade da telomerase.....	39
3.7.1 Preparação do extrato celular.....	39
3.7.2 Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	40
3.7.2.1 Preparação dos tubos de PCR.....	40

3.7.3 Hibridização e ELISA.....	41
3.7.4 Cálculo da atividade relativa de telomerase.....	43
3.7.5 Comentários sobre as alterações no protocolo original do fabricante.....	43
3.8 Análise estatística.....	44
4 RESULTADOS.....	45
5 DISCUSSÃO.....	50
6 CONCLUSÕES.....	54
REFERÊNCIAS.....	55
ANEXO 1.....	60

1 INTRODUÇÃO

1.1 Telomerase

Nas décadas de 30 e 40, Müller (1938) e McClintock (1941) descreveram os telômeros (do grego *telos*, significando final e *meros* significando parte) como uma estrutura protetora na parte final de cada cromossomo, antes mesmo da descoberta da estrutura em dupla hélice do ácido desoxirribonucléico (DNA). Quando essa estrutura estava ausente, poderia acontecer a fusão ponta a ponta (*end to end*) de cromossomos, levando à morte celular (FIG. 1).

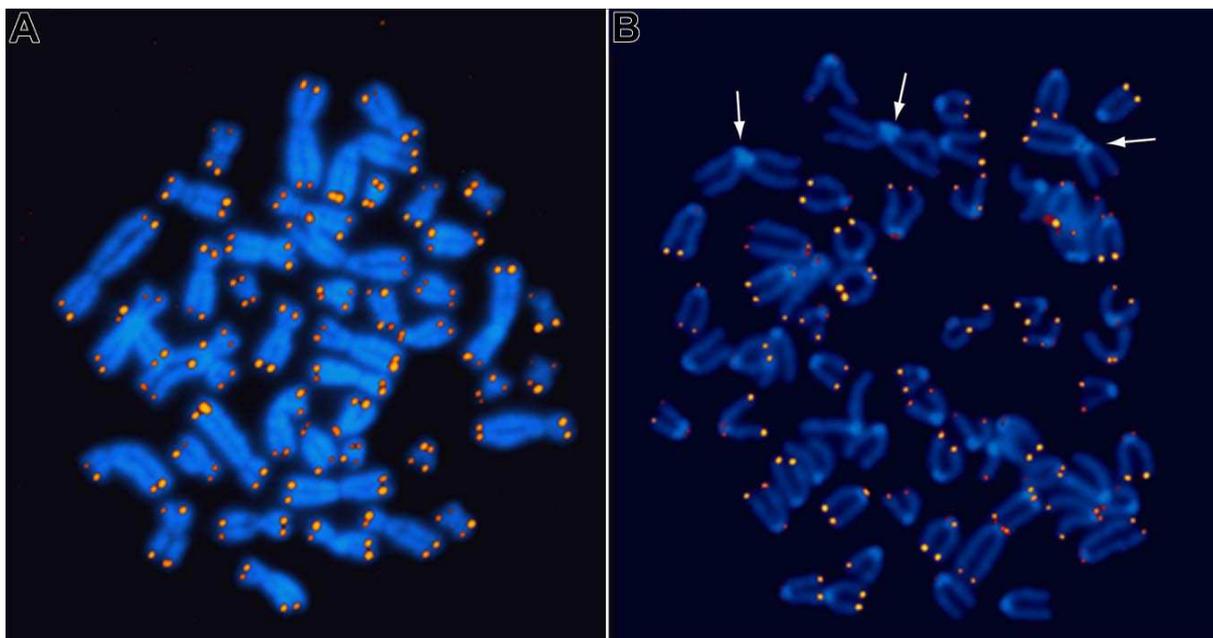


FIGURA 1 - Cromossomos vistos pela técnica de FISH.

Com sonda para detecção de repetições teloméricas (A). As setas indicam fusão de cromossomos acrocêntricos, onde se nota ausência de repetições teloméricas (B).

Fonte: Adaptado de Lansdorp (2008).

Na década de 70, James D. Watson descreveu os chamados problemas de replicação da ponta dos cromossomos. Durante a replicação do DNA, a polimerase não consegue replicar completamente a extremidade 5' de cada cromossomo, levando a uma pequena região não copiada. Watson notou que, se

não houvesse um mecanismo compensatório com divisões celulares sucessivas, os telômeros se encurtariam progressivamente (WATSON; CRICK, 1974).

Anteriormente, na década de 60, Hayflick notou que células humanas diplóides proliferam um número limitado de vezes quando em cultura celular. Ficou conhecido então como “Limite de Hayflick” o número máximo de divisões celulares de uma célula *in vitro* (HAYFLICK, 1965). Quando as células atingissem esse limite, elas passariam por mudanças morfológicas e bioquímicas, com interrupção da capacidade de proliferação, sendo esse processo denominado senescência celular (REDDEL, 2000; SHAY; WRIGHT, 2000).

Foi, então, na década de 70 que Olovnikov conectou a senescência celular ao problema de replicação nas pontas dos cromossomos em sua “Teoria da Marginotomia”, na qual o encurtamento dos telômeros foi proposto como mecanismo intrínseco que, como um relógio, controlaria o número de divisões celulares antes da senescência celular (OLOVNIKOV, 1973). Posteriormente, em 1988, Greider e Blackburn corroboraram essa teoria quando observaram a perda progressiva no comprimento dos telômeros, em células se dividindo *in vitro*, (GREIDER; BLACKBURN, 1996).

Em 1978, Blackburn e Gall (1978) descobriram que a estrutura molecular dos telômeros na *Tetrahymena pyriformis* contém seqüências ricas em timina e guanina. Em 1984, Blackburn e seus colaboradores isolaram a telomerase, enzima responsável pela manutenção e alongação dos telômeros (GREIDER; BLACKBURN, 1985). Em 1989, Gregg reportou a existência de atividade de telomerase em linhagens celulares de cânceres humanos, o que se pensava contribuir para a imortalidade de células tumorais (GREGG, *apud* GREIDER; BLACKBURN, 1996). Praticamente ao mesmo tempo, Greider e Blackburn (1996) descobriram que a telomerase estava ausente em tecidos somáticos normais.

Na década de 90, Kim *et al.* (1994) detectaram atividade de telomerase (AT) em 90 de 101 amostras celulares de tumor (provenientes de 12 tipos diferentes de tumor) e em 98 de 100 linhagens de células imortalizadas, mas não encontraram atividade em 50 amostras de células somáticas normais (provenientes de quatro

diferentes tipos de tecidos). Desde então, mais de 2.600 amostras de tumores humanos foram investigadas e a AT foi detectada em cerca de 90% delas (GREIDER; BLACKBURN, 1996).

Nos seres humanos, a telomerase tem pelo menos dois componentes essenciais: o componente composto por um molde de ácido ribonucléico (RNA) funcional (chamado hTR ou hTERC), que serve como um molde para a síntese telomérica de DNA; e o componente protéico catalítico, com atividade de transcriptase reversa (chamado hTERT), que adiciona as repetições teloméricas nas pontas dos cromossomos (COLLINS, 2006; CONG; SHAY, 2008; CONG *et al.*, 2002) – (FIG. 2).

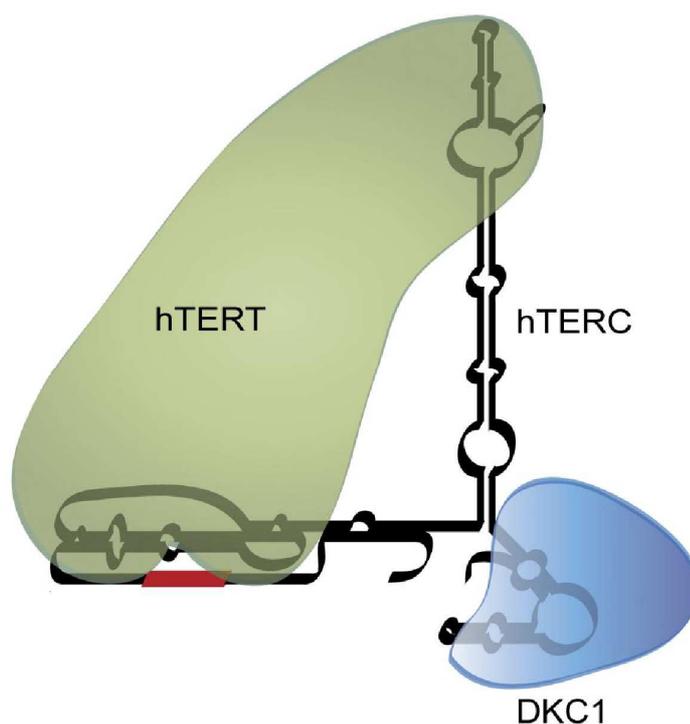


FIGURA 2 - Desenho esquemático da telomerase e seus componentes (hTERT, DKC1, hTERC).

Transcriptase reversa da telomerase (hTERT, em verde), disquerina (DKC1, em azul), que se ligam especificamente a uma molécula de RNA (hTERC, em preto), contendo uma região molde para a repetição telomérica (em vermelho).

Fonte: Adaptado de Aubert e Lansdorp (2008).

A maioria das células somáticas humanas tem níveis indetectáveis de AT devido à repressão da transcrição da subunidade catalítica hTERT desde fases precoces do desenvolvimento embrionário. Conseqüentemente, as células somáticas humanas perdem cerca de 50 a 200 pares de base de DNA telomérico a cada divisão celular (CONG; SHAY, 2008).

Maser e De Pinho (2002) e Deng *et al.* (2008) ressaltaram várias evidências atuais que demonstram que o encurtamento crítico dos telômeros contribui para a tumorigênese, por meio da promoção de instabilidade genômica.

Telomerase é, então, necessária para a manutenção em longo prazo da capacidade proliferativa, como ocorre nas células-tronco (CT) e células de câncer, e para a renovação de tecidos normais. Expressão ectópica de telomerase em células humanas normais leva à extensão da expectativa de vida da célula ou à imortalização em vários tipos de células (BODNAR *et al.*, 1998) – (FIG. 3).

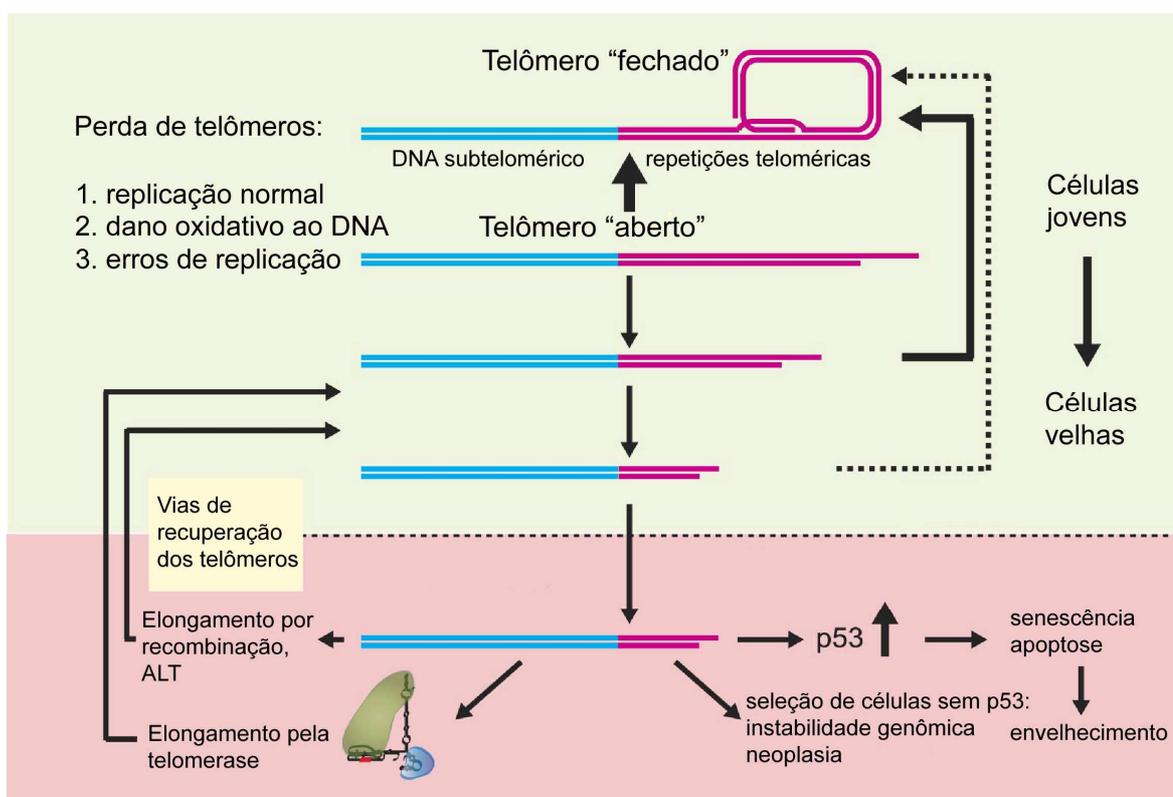


FIGURA 3 - Diminuição progressiva dos telômeros a cada divisão celular, com progressão para o estado de senescência ou apoptose, a não ser que seja recuperada pela ação da telomerase ou pela recombinação homóloga.

Fonte: Adaptada Aubert e Lansdorp (2008).

Os telômeros consistem em longas repetições da seqüência TTAGGG, que são associadas a uma variedade de proteínas ligadoras a telômeros. Segundo Aubert e Lansdorp (2008), quando os telômeros são bastante longos, essas proteínas favorecem uma dobra da extremidade, levando a uma conformação tridimensional que protege a ponta dos cromossomos dos mecanismos de identificação de danos no DNA e também impede o acoplamento da telomerase. Quando, após divisões celulares progressivas, os telômeros ficam curtos, essa dobra não é mais possível (FIG. 4).

A Telômero fechado

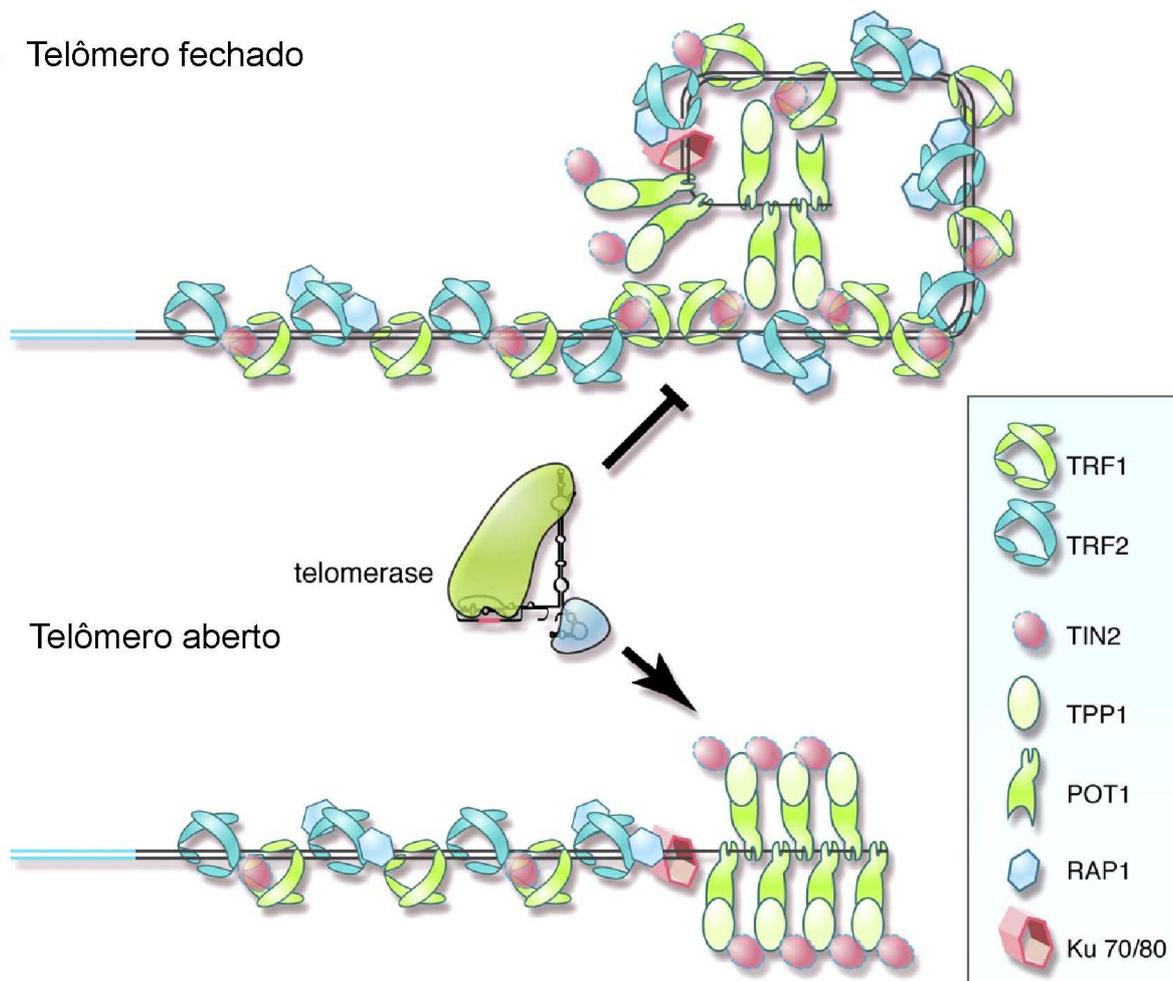


FIGURA 4 - Desenho esquemático da ligação das proteínas teloméricas (TRF1, TRF2, TIN2, TPP1, POT1, RAP1, Ku 70/80) aos telômeros.

Essas proteínas participam da conformação espacial dos telômeros e do acoplamento para ação da telomerase.

Fonte: Adaptado de Aubert e Lansdorp (2008).

Aparentemente, a AT não é a única forma de alongamento dos telômeros. Cerca de 50% dos sarcomas possuem formas alternativas de alongamento dos telômeros, sem apresentar AT. Essa forma é denominada recombinação homóloga, não sendo tão eficiente, nem garantindo mais estabilidade genômica como a ação da telomerase (JOHNSON; BROCCOLI, 2007).

Existem relatos na literatura de efeitos extrateloméricos da telomerase, ou seja, não ligados ao alongamento de telômeros (SARIN *et al.*, 2005). É possível que a telomerase participe do processo de reparação do DNA celular. Foi mostrado que células que tiveram a AT suprimida apresentavam significativa perda da capacidade de reparação do DNA (MASUTOMI *et al.*, 2005). Já se verificou, também, participação da telomerase em outros mecanismos de apoptose celular (BOLLMANN, 2008).

Estudos em camundongos cujas células possuem telômeros bastante longos sugerem a idéia de que a presença de telomerase em células de câncer parece conferir outras vantagens na proliferação celular (CHANG *et al.*, 2003). Outras pesquisas ressaltaram que camundongos com expressão aumentada de telomerase apresentaram elevada incidência de tumores malignos, com mais capacidade de invasão e de proliferação, independentemente do tamanho dos telômeros (CANELA *et al.*, 2004). Segundo outros autores, células neoplásicas que não possuem AT têm sua capacidade de crescimento e de invasão aumentadas quando se transfecta a subunidade TERT (STEWART *et al.*, 2002).

Mutações na hTERC ou hTERT são associadas a vários fenótipos de envelhecimento prematuro (ARTANDI, 2006). Mutações conhecidas em cada um dos componentes da telomerase têm sido associadas à disceratose congênita autossômica dominante, falência de medula óssea (YAMAGUCHI *et al.*, 2005) e fibrose pulmonar idiopática (TSAKIRI *et al.*, 2007). Essas mutações levam a alterações conformacionais na molécula da telomerase, ocasionando redução em cerca de 50% de sua função. Como conseqüência, observa-se comprometimento na manutenção do tamanho dos telômeros, aumentando o apoptose e a senescência de células em proliferação (AUBERT; LANSDORP, 2008).

1.2 Células-tronco

CT são células indiferenciadas que possuem a capacidade de auto-renovação e também a habilidade de se transformar em pelo menos um tipo de célula diferenciada ou madura. As CT podem ser classificadas em algumas categorias, de acordo com sua capacidade de diferenciação. A primeira categoria é a das CT unipotentes, capazes de se diferenciar em apenas um tipo de célula adulta, como as CT da derme ligadas aos queratinócitos. Outra categoria é a das CT multipotentes, que possuem a capacidade de se diferenciar em dois ou mais tipos de células adultas. Exemplos de CT multipotentes são células do feto em desenvolvimento e CT adultas, como as neurais, hematopoiéticas e mesenquimais (DENHAM *et al.*, 2005).

Uma terceira categoria é a das CT pluripotentes, capazes de se transformar em elevado número de tipos de células adultas, mas não todas as células típicas de determinada espécie. Exemplos de células pluripotentes são as CT embrionárias (CTE), derivadas da massa celular interna de embriões em estágio de blastocisto. Essas células são capazes de se transformar em todos os tipos de células de um organismo adulto, mas têm limitada capacidade de se transformar em linhagens extra-embrionárias (DENHAM *et al.*, 2005).

A quarta categoria é a de CT totipotentes, que inclui os oócitos fertilizados e os blastômeros de embriões antes do estágio de mórula. Essas células podem se transformar em qualquer tipo de célula adulta e também nos tecidos extra-embrionários, mas com reduzida capacidade de auto-renovação (DENHAM *et al.*, 2005).

É apontada ainda uma quinta categoria, a das CT derivadas do câncer, que resultam em células neoplásicas indiferenciadas, parcialmente diferenciadas ou diferenciadas (DENHAM *et al.*, 2005).

As CTE podem ser mantidas em estado indiferenciado indefinidamente *in vitro*. As CTE de camundongo (CTEc) representam a mais bem caracterizada linhagem de CTE, já tendo sido induzidas a diferenciarem-se *in vitro* em diversas linhagens,

como músculo cardíaco, células neurais e células hematopoiéticas (DENHAM *et al.*, 2005). A habilidade de manipular CTEc em laboratório tem sido então considerada importante no entendimento dos processos de diferenciação, de desenvolvimento e de doenças.

Já existem na literatura registros animadores de experimentos que utilizaram CTEc para tratamento de modelos animais de algumas doenças. São descritos trabalhos realçando melhoria da função cardíaca (HODGSON *et al.*, 2004; MIN *et al.*, 2002), de doenças hematológicas (RIDEOUT *et al.*, 2002), de aumento de níveis de insulina em camundongos diabéticos (HORI *et al.*, 2002), de redução de sintomas em doença de Parkinson (BJORKLUND *et al.*, 2002; KIM *et al.*, 2002) e melhora parcial em lesões medulares (LIU *et al.*, 2000 McDONALD *et al.*, 1999). Como as CT têm a capacidade de se transformar nos três folhetos embrionários (ectoderma, mesoderma e endoderma), um dos riscos na terapia celular com CT é a formação de teratomas. Entre as estratégias para se evitar esse risco, estão a pré-diferenciação das CT antes do transplante e o controle rigoroso da capacidade de multiplicação das células.

Atualmente, as CT têm sido alvo de intensa investigação científica, devido à possibilidade de inúmeras aplicações terapêuticas, como a substituição de tecidos, a construção de modelos para entender os mecanismos de certas doenças ou para realizar testes de novas drogas. Dessa forma, espera-se conseguir a cura para doenças como a de Parkinson, lesões medulares, insuficiência cardíaca e diabetes. Antes de se atingirem esses objetivos, todavia, vários desafios se apresentam para os pesquisadores. Formas de se conseguir a diferenciação celular para o tipo exato de que se necessita, formas de se controlar adequadamente a multiplicação celular, questões éticas envolvidas na manipulação das células-tronco, possibilidade de rejeição das células pelo organismo, além de formas apropriadas de se transplantarem as células para os órgãos doentes são exemplos de questões ainda sem respostas definitivas (DENHAM *et al.*, 2005).

1.3 Telomerase em células-tronco

Habitualmente, todos os tipos de CT apresentam AT, característica que contribui para a grande capacidade de multiplicação e auto-renovação dessas células. Contudo, a AT não é igual em todos os tipos de células-tronco. As CT adultas possuem baixa AT. Isso permite que ocorra lento e progressivo encurtamento dos telômeros, mas sempre mantendo células disponíveis durante toda a vida do organismo (COLLINS; MITCHELL, 2002). De maneira diferente, as CTE têm alta AT, o que manteria estável o comprimento dos telômeros a cada divisão celular, conferindo, então, teoricamente, capacidade ilimitada de multiplicação a essas linhagens celulares (DENHAM *et al.*, 2005).

Apesar de insuficiente para a prevenção da perda progressiva de telômeros durante o envelhecimento, acredita-se que a existência de telomerase nas CT adultas seja importante no funcionamento dessas células e de todo o organismo. Crescente número de evidências sugere que o envelhecimento e o câncer apresentam aspectos semelhantes na fisiologia e poderiam ser consideradas doenças das CT, resultantes do declínio ou ineficiência da capacidade regenerativa e da homeostase do organismo. Desse modo, a telomerase poderia ser a conexão entre esses dois processos biológicos (SHAY; WRIGHT, 2005).

Alguns estudos demonstraram a indução de efeitos pela telomerase em CT a partir de mecanismos diferentes dos da construção de telômeros. Camundongos transgênicos com expressão aumentada da subunidade catalítica da telomerase TERT apresentaram ativação de CT epidérmicas e mobilização dessas células quando se instituiu estímulo proliferativo. Houve aumento da proliferação de queratinócitos, do crescimento capilar e da hiperplasia celular (FLORES *et al.*, 2005; SARIN *et al.*, 2005).

Trabalhos recentes também corroboram a função da TERT na ativação das CT independentemente da AT. Foi demonstrado que TERTs mutantes, sem AT, mantêm a capacidade de ativação de CT de folículos capilares e de aumento da proliferação de queratinócitos na pele de camundongos (CHOI *et al.*, 2008). Essa pesquisa avaliou, também, por meio de *microarray*, as alterações na expressão

gênica causadas pela alteração nos níveis de TERT. Saliou-se que a diminuição abrupta dos níveis de TERT causa rápida mudança na expressão de genes envolvidos no desenvolvimento epitelial, transdução de sinais e adesão/citoesqueleto. Análise estatística por algoritmos mostrou que o padrão de transcrição gênica estimulado pela TERT se assemelha bastante ao padrão estimulado por Myc e Wnt, dois fatores importantes no funcionamento das CT e no câncer.

Armstrong *et al.* (2005) compararam CTEc normais com CTEc induzidas a uma superexpressão da subunidade TERT e descobriram que essas últimas apresentaram mais capacidade de auto-renovação, mais resistência ao apoptose, aumento de proliferação e mais resistência ao estresse oxidativo.

1.4 Telomerase em células tumorais

Durante a progressão para o câncer, populações de células tumorais passam por transformações genéticas e epigenéticas que lhes permitem escapar dos mecanismos naturais de controle homeostático do organismo. Uma das transformações mais importantes é a ativação da telomerase permitindo às células se desviar do caminho natural da senescência replicativa. Então, apesar da telomerase não ser ela mesma um oncogene, sua supressão parece ser um mecanismo supressor de tumor (HARLEY, 2008).

Segundo Londoño-Valejo (2008), durante o processo normal de divisão celular, ao atingirem tamanhos teloméricos críticos, alguns mecanismos celulares impedem a proliferação, como o p53. Células que tiveram oncogenes introduzidos, por exemplo, inativando o gene p53, continuam a dividir-se, apesar dos telômeros curtos, levando à instabilidade gênica acentuada, recombinação e fusão de cromossomos. Essa instabilidade aumenta progressivamente, ocorrendo translocações com perdas e ganhos de braços de cromossomos, assim como deleções e ampliações. Pode haver também duplicações de cromossomos ou até do genoma inteiro (tetraploidização). Todo esse processo é denominado crise e a célula termina por tornar-se inviável e morrer.

Para escapar da morte, células que entram em crise precisam adquirir um mecanismo para a manutenção dos telômeros. Frequentemente, isso é conseguido na re-expressão da telomerase, que estabiliza os telômeros e as pontas dos cromossomos, permitindo a proliferação indefinida. Não se sabe ao certo como ocorre a reativação da telomerase. Amplificação do *lôcus* da TERT (situado próximo da ponta do braço curto do cromossomo 5) é achado freqüente *in vitro* e *in vivo*, assim como duplicações e translocações do *lôcus* também já foram associadas à reativação da enzima. Além disso, o promotor da TERT é alvo de vários oncogenes (como c-Myc), supressores de tumores (como p53) e outros fatores de transcrição (como *Upstream transcriptional factor 1 e 2* - USF1 e 2), cujos genes podem ser, na vigência de instabilidade cromossômica, afetados na sua integridade ou nível de expressão.

O momento da reativação da telomerase é crítico na definição do potencial oncogênico da célula. Como várias alterações gênicas são necessárias para que a célula adquira capacidade tumorigênica, se a telomerase for reativada muito cedo na crise descrita anteriormente, a célula pode ter sua capacidade de replicação restabelecida, mas também recupera a estabilidade genômica, a partir de reparação de danos no DNA, e pode não ter adquirido ainda o potencial oncogênico. Caso contrário, se o processo de instabilidade genômica progride, quando a telomerase é reativada a célula já pode ter desenvolvido fenótipo tumorigênico.

A reativação da AT é, então, necessária para a manutenção da capacidade replicativa de grande parte dos tumores conhecidos. Além disso, já é significativo o número de evidências de que a inibição da telomerase em células de câncer pode levar à indução da morte celular (HAHN *et al.*, 1999; HERBERT *et al.*, 1999; ZHANG *et al.*, 1999).

1.5 Terapias baseadas na telomerase

O desenvolvimento de drogas inibidoras da telomerase apresenta-se como uma atraente proposta não só como tratamento de doenças malignas, mas também

para o tratamento de diversas doenças com o uso de CT, já que um dos obstáculos do uso de CT é o risco de desenvolvimento de tumores. Várias substâncias são descritas na literatura como tendo capacidade de inibição da telomerase, como a axinelloside A (WARABI *et al.*, 2005), BIBR1532 (PASCOLO *et al.*, 2002), 2,3,7-trichloro-5-nitroquinoxaline - TNQX (KIM *et al.*, 2003) e GNR163L (ASAI *et al.*, 2003; DIKMEN *et al.*, 2005).

Um questionamento que se faz sobre a terapia oncológica com inibidores da telomerase é quanto ao efeito sobre as células normais que exibem a AT, como a medula óssea e os linfócitos. Entretanto, a observação de que os telômeros das células neoplásicas são menores que os das células normais pode sugerir que as células neoplásicas sejam mais susceptíveis a essas drogas. Outro problema é que alguns tumores mantêm seus telômeros a partir da recombinação homóloga (DUNHAM *et al.*, 2000), sem exibir AT, mas esse fenômeno é relativamente raro, ocorrendo em menos de 10% dos tumores (KELLAND, 2005).

Devido ao papel no envelhecimento celular, na patogênese do câncer e nas síndromes de envelhecimento prematuro, telômeros e telomerase estão atualmente sob extensa investigação (WAI, 2004).

Como a maioria dos tumores é dependente de AT para manutenção de sua imortalidade e a telomerase é codificada por genes não redundantes, é provável que a possibilidade de os tumores desenvolverem resistência ao tratamento com drogas inibidoras da telomerase seja menor do que com o uso de outras classes de drogas antineoplásicas atualmente em uso. Além disso, a expressão baixa e transitória em células somáticas normais, incluindo as CT adultas, somada ao comprimento relativamente longo dos telômeros dessas células, comparadas com as células tumorais, proveria relativa especificidade à ação das drogas inibidoras da telomerase, com baixa probabilidade de toxicidade em tecidos normais (HARLEY, 2008).

Existem duas metodologias atuais com o objetivo de eliminação de células tumorais positivas para telomerase em fase de testes clínicos. A primeira é a utilização de drogas inibidoras da telomerase, como o GRN163L, e a segunda é a

produção de vacinas contra a subunidade TERT da telomerase, com o objetivo de se estimular uma resposta imunocitotóxica.

Em testes pré-clínicos, Goldblat *et al.* (2008) enfatizaram que o GRN163L atuou sinergicamente com o Trastuzumab, inibindo o crescimento de células de câncer de mama positivas para *human epidermal growth factor receptor-type 2* (HER2), a partir da inibição da AT e do encurtamento dos telômeros. Outro achado interessante foi a restauração da sensibilidade ao Trastuzumab de células anteriormente resistentes a ele.

Shammas *et al.* (2008) constataram morte celular por apoptose de células de mieloma múltiplo após o período de duas a três semanas de incubação com GRN163L. A princípio, os inibidores de telomerase só poderiam ser usados isoladamente como antineoplásicos em tumores com telômeros bastante curtos e com *turnover* acelerado. Essa situação é pouco comum. No entanto, a associação dos inibidores da telomerase com outras drogas citotóxicas pode resultar em mais durabilidade da resposta, devido à ação conjunta nas CT tumorais presentes no tumor, além de conferir resposta clínica mais duradoura ao tratamento.

O GRN163L já se encontra em testes clínicos em humanos para leucemia linfocítica crônica, mieloma múltiplo, tumores sólidos e câncer de pulmão de células não-pequenas. Em encontro da Sociedade Americana de Oncologia Clínica em maio de 2008, em Chicago, nos Estados Unidos da América (EUA), foram divulgados resultados parciais sobre testes de toxicidade fase I do GRN163L, realizados por Ratain *et al.* (2008). Foram verificados efeitos adversos comuns como prolongamento do tempo de tromboplastina parcial ativado, efeitos gastrointestinais, fadiga, anevia, elevação de gama glutamil transferase (GGT) e neuropatia periférica. Houve morte de um paciente por causa desconhecida e trombocitopenia em outro. Dados sobre eficácia clínica ainda não estavam disponíveis.

As vacinas contra telomerase oferecem a possibilidade de eliminação das células tumorais a partir da citotoxicidade específica pela telomerase. Os testes clínicos atuais não demonstraram toxicidade para os tecidos normais. As vacinas

estão sendo testadas em leucemia e em cânceres de rim, próstata, pulmão, pele, pâncreas e mama (HARLEY, 2008).

1.6 Justificativas

O isolamento e o cultivo de CT embrionárias ou adultas, humanas ou animais são procedimentos já descritos na literatura mundial. Todavia, os mecanismos básicos de replicação durante o isolamento ainda necessitam de melhor entendimento para eficiência no processo.

O estudo da telomerase pode resultar em maneiras de se controlar, aumentando-se ou inibindo-se a capacidade de replicação celular, situação bastante útil tanto no campo da oncologia quanto no processo de terapia celular com células-tronco.

O conhecimento atual sobre a regulação da AT provém principalmente de estudos em células neoplásicas ou imortalizadas. Apesar de úteis para a avaliação da oncologia, estudos de telomerase baseados em CT euplóides normais se fazem necessários, sendo as CT um ótimo modelo para pesquisa dos mecanismos de indução da senescência celular (MIURA *et al.*, 2004).

Segundo Kelland (2005), alvos ideais para ação de drogas em células neoplásicas seriam aqueles que fossem mais específicos das células neoplásicas e que tivessem papel importante na manutenção do fenótipo maligno das células. A estreita correlação entre AT e células de câncer coloca a telomerase como importante objeto de pesquisa para novos métodos diagnósticos e terapêuticos para neoplasias. A partir de drogas que inibissem especificamente a telomerase, seria possível recuperar a função de limitação da capacidade replicativa das células, exercida pelos telômeros, levando as células neoplásicas à senescência e/ou apoptose (BAYNE; LIU, 2005).

Como já citado, a telomerase está presente em 80 a 90% dos tipos de câncer. Nenhum outro gene associado a tumores é tão largamente expressado (CORTEZ-GONZALEZ; ZANETTI, 2007).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- Avaliar a atividade da telomerase em diferentes passagens das CTEc.

2.2 Objetivo específico

- Comparar a atividade de telomerase das CTEc com linhagens de células de tumor de camundongo.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Trata-se de um estudo descritivo que foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais (CETEA – UFMG – protocolo nº 004/06) e pela Câmara Departamental do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da UFMG.

Para este estudo foram utilizadas CTEc previamente isoladas no Laboratório de Reprodução Humana Professor Aroldo Fernando Camargos, cuja metodologia de isolamento é resumida a seguir. Toda citação referente às amostras de CTEc utilizadas nos experimentos deste estudo refere-se a células indiferenciadas.

3.1 Material

Foram utilizados camundongos da linhagem 129Sv, sendo machos com oito a 12 semanas de vida e fêmeas com três a quatro semanas de vida, adquiridos do Biotério da Universidade de São Paulo e mantidos de acordo com leis de proteção e manuseio dos mesmos no biotério da Faculdade de Medicina da UFMG.

Os machos foram separados, na sua chegada ao biotério, em gaiolas individuais medindo 30,5 x 19,8 x 13,4 cm, para evitar possível supressão de testosterona nos mesmos, devido à presença de outro camundongo macho dominante, evitando-se diminuição na produção de espermatozoides. Um máximo de cinco fêmeas foi alojado por gaiola, num regime de 12 horas de luz/12 horas de escuridão, com temperatura ambiente de 21-23°C e ração e água *ad libitum* (BAIER *et al.*, 2004). Foram utilizadas gaiolas de acrílico em estante com filtragem de ar (Alesco, Campinas, SP). Os animais foram avaliados diariamente em relação à disponibilidade de água e ração, à limpeza das gaiolas e à ocorrência de qualquer anormalidade. O método de sacrifício dos camundongos utilizado foi o deslocamento cervical.

Calculou-se, inicialmente, um número de 20 fêmeas a serem utilizadas no experimento com o objetivo de se isolarem quatro linhagens de CTEc. A taxa de sucesso de isolamento de novas linhagens é de cerca de 20% das massas celulares internas recuperadas após cultivo. O fluxograma da FIG. 5 descreve as etapas do processo. As porcentagens citadas referem-se à expectativa do resultado de cada etapa, segundo a literatura, e foram utilizadas para a previsão dos números realçados em negrito.

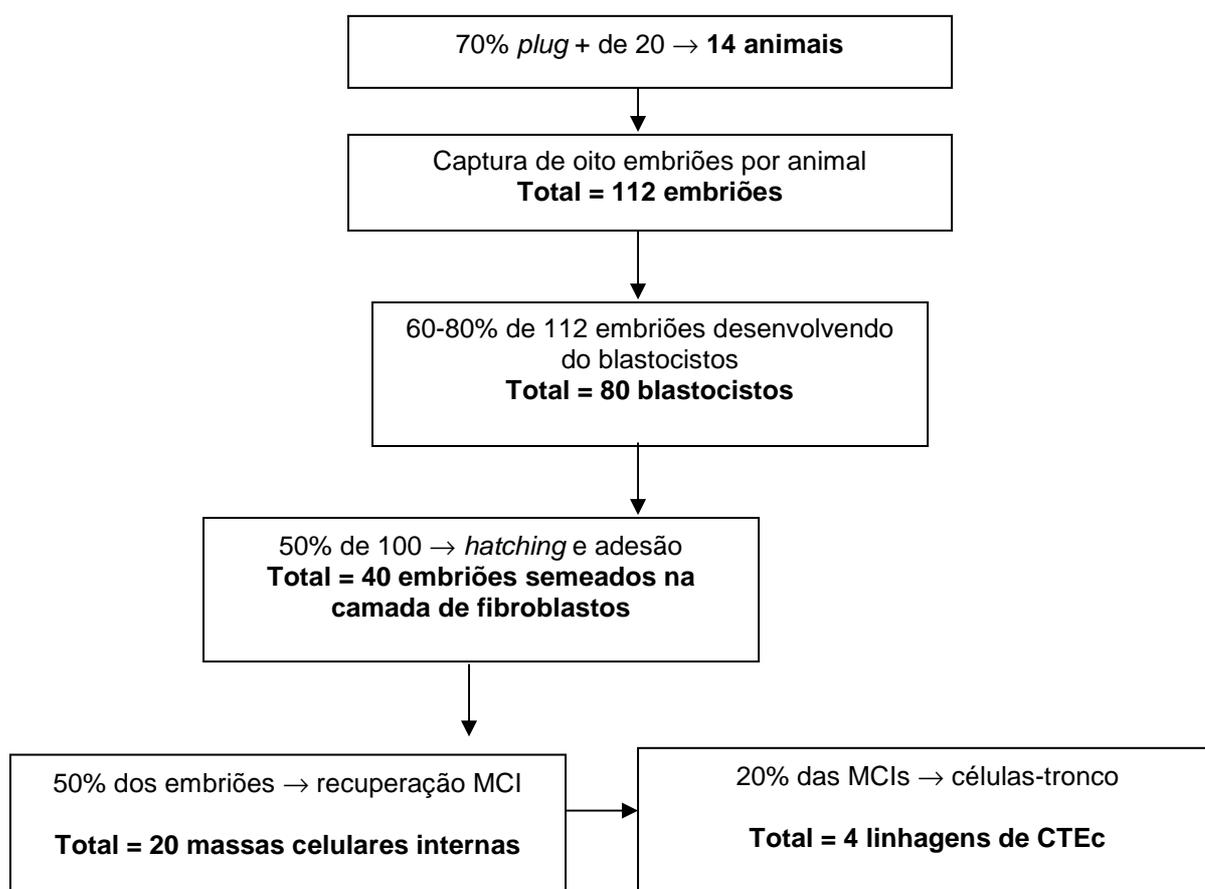


FIGURA 5 - Cálculo amostral para o isolamento de novas linhagens de CTEc.

3.2 Superovulação e coleta embrionária

3.2.1 Superovulação

A superovulação de camundongos foi realizada com 5 UI via intraperitoneal (IP)

de *pregnant mare serum gonadotropin* (PMSG), Sigma – catálogo G-4527 e, após 48 horas, com 5 UI via IP de *human chorionic gonadotropin* (hCG), Sigma – catálogo C-8554.

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

3.2.2 Coleta embrionária

A coleta de embriões de camundongos foi realizada no dia 3,5 após detecção do *plug* vaginal (o dia 0,5 é definido como a manhã em que se detectou o *plug* vaginal). Para coleta dos blastocistos foi realizada anti-sepsia no abdômen do animal, com álcool a 70% logo após a realização da eutanásia. Os dois cornos uterinos foram retirados utilizando-se pinça e tesoura cirúrgicas esterilizadas e imediatamente imersos e lavados em 5 mL de meio M2 (*Sigma-Aldrich*, Saint Louis, MO, EUA, www.sigma-aldrich.com) em placa de Petri mantida a 37°C. A microdissecação das peças cirúrgicas foi realizada com microscópio estereoscópico (Nikon, SMZ – 2T, Japão) sob capela de fluxo laminar (Veco Flow, Veco, São Paulo, SP) com mesa aquecida a 37°C, com controle digital de temperatura.

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 35 mm com a ajuda de seringa de teste tuberculínico preenchida com 1 mL de meio M2 previamente aquecido a 37°C, iniciando-se a identificação dos blastocistos no 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 100 µm.

Na limpeza dos blastocistos, utilizou-se sistema de cultivo de microgotas preparado na noite anterior à coleta e mantido em estufa para equilíbrio de potencial de hidrogênio (pH) e temperatura. Cada sistema foi composto de cinco microgotas laterais e uma central com cerca de 30 μ L de meio M16 em placa de Petri estéril de 35 mm, coberta 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 nas cinco 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 (*Sigma-Aldrich*, Saint Louis, MO, EUA, www.sigma-aldrich.com). A placa foi então colocada 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 6% de dióxido de carbono (CO₂) em mistura de ar ambiente e atmosfera úmida. Esses valores foram checados e anotados diariamente.

A etapa desde a remoção dos cornos até a incubação dos blastocistos foi realizada com rapidez para evitarem-se danos aos blastocistos, tendo se estendido por no máximo 15 minutos.

3.3 Cultivo de embriões

3.3.1 Placas de cultivo de embriões

Todo o trabalho de manipulação de placas de cultivo celular e de embriões foi realizado em capela de fluxo laminar (Veco Flow, Veco, São Paulo, SP).

Durante a fase inicial de isolamento das CTEc 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). Aproximadamente 0,5 mL de gelatina a 0,1% foi adicionado em cada poço e deixado por pelo menos 30 minutos para a formação de uma película aderente à porção inferior de cada um deles. Após esse período, a solução de gelatina de cada poço foi substituída por 1 mL do meio de cultivo para fibroblastos contendo a concentração de $1,0 \times 10^5$ fibroblastos primários de embriões de camundongos (PMEF-H, *Specialty Media*, Phillipsburg, NJ, EUA, www.specialtymedia.com). Esses fibroblastos não possuem atividade mitótica devido à exposição prévia à mitomicina pelo fabricante e são adquiridos prontos para uso, em forma de *criovials*, estando eles no estágio de terceira passagem. Cada frasco de PMEF contém 1 mL de meio crioprotetor dimetil sulfoxido (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* a -80°C . O frasco posteriormente foi descongelado de forma rápida em banho-maria, a 37°C , antes de ser ressuspensado 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: 870 mL de DMEM, 100 mL de soro fetal bovino, 10 mL de solução de glutamina, 10 mL de solução de penicilina/estreptomicina e 10 mL de betamercaptoetanol. Após o degelo do PMEF, o conteúdo do frasco foi transferido com o auxílio de pipeta estéril de 2 mL para tubo de Falcon de 15 mL contendo 10 mL 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 , com 1.000 rotações por minuto (rpm).

O sobrenadante contendo a maior parte do DMSO foi removido e as células do *pellet* ressuspensas 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.

3.3.2 Cultivo dos embriões

Antes de receber os blastocistos, cada poço foi preenchido com um 1 mL de meio de cultivo das CTEc, 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 6% de 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 (Telaval 31, Carl Zeiss, Alemanha). 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 tratadas com gelatina 0,1% e camada celular de fibroblastos como anteriormente descrito.

3.4 Isolamento e cultivo de células-tronco

3.4.1 Meio de cultivo de CTEc

O meio de cultivo utilizado para CTEc teve, em cada litro de sua composição, reagentes adquiridos da empresa Speciality Media (EUA): 750 mL - *Dulbecco's modified Eagle's médium* - DMEM (catálogo - SLM-220-B); 200 mL de soro fetal bovino (catálogo - ES-009-B); 2 mM L – glutamina (catálogo - TMS-002-C); 50 µg/mL penicilina/streptomicina (catálogo - TMS-AB2 – C); 0,1 mM aminoácidos não-essenciais - MEM (catálogo - TMS-001 - C); 10 mL nucleosídeos (catálogo - ES-008 - D); 0,1 mM beta-mercaptoetanol (catálogo - ES-007 – E) e 2.000 U/mL de LIF.

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

dias.

3.4.2 Isolamento de novas linhagens de CTEc

As CTEc 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 Tavares *et al.* (2007), exceto pelo uso de pipeta P-200.

Antes da remoção da MCI, cada poço foi lavado com cerca de 1 mL 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. Utilizando-se ponteiras não-tóxicas e estéreis (Gilson, Middleton, WI, EUA, www.gilson.com), a partir de movimento de sucção rápida próximo da posição da MCI, a mesma se deslocava para dentro da ponteira, junto com pequeno volume de DPBS modificado sem cálcio ou magnésio.

Previamente à remoção da MCI, preparou-se uma placa de cultivo de 96 poços utilizando-se pequena quantidade de solução de tripsina 0,25%/1 mM 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 CTEc, 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 e 400 µm. Durante a realização das passagens, foram anotados o dia e o número do procedimento.

Em cada passagem celular realizada, foram retiradas amostras de células que foram lavadas em solução salina tamponada com fosfato, sem cálcio e magnésio

(PBS sem Ca⁺⁺/Mg⁺⁺), centrifugadas e armazenadas em forma de *pellet* em *freezer* a -80°C. Essas amostras foram utilizadas para a realização da *reverse transcriptase – polymerase chain reaction* (RT-PCR) para identificação dos marcadores de indiferenciação.

3.5 Identificação dos marcadores moleculares de indiferenciação das CTEc

Antes de avaliar a atividade de telomerase, foi realizada a identificação do estado indiferenciado das CTEc a partir da identificação de genes ou fatores de transcrição específicos. Os marcadores Oct-4 e Nanog foram investigados com base na análise da RT-PCR (CHAMBERS *et al.*, 2003; HAY *et al.*, 2004; KRUSSEL *et al.*, 1997).

Fatores de transcrição relacionados à manutenção e renovação da população das CT tais como o Oct3/4 e o Nanog têm sido estudados e utilizados na caracterização das mesmas. O Oct3/4 pertence a uma família de reguladores de fatores de transcrição e se expressa em populações celulares *in vitro* e *in vivo*, observando-se *downregulation* à medida que a célula se diferencia. O Nanog, por sua vez, é um dos genes-alvo do Oct3/4 cujos papéis na manutenção da totipotencialidade e na diferenciação celular ainda não foram completamente elucidados (HOFFMAN; CARPENTER, 2005).

3.5.1 RT-PCR

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 DNA genômico. Os componentes foram mantidos em recipiente com gelo em escamas durante todo o procedimento.

Preparação de cada amostra para realização da RT-PCR:

- Tratamento com Tripsina 0,25% a 37°C, 6% CO₂, neutralização com meio de CT e retirada de alíquota para contagem celular com câmara de Neubauer. Transferência da solução celular para tubo de Falcon de 15 mL para centrifugação (Centrífuga Excelsa Baby I – Modelo 206, FANEN, São Paulo, Brasil).
- Centrifugação a 200 x g por cinco minutos para formação do *pellet*.
- Determinação da concentração celular a partir de hematocítômetro durante a centrifugação.
- Ajuste da concentração celular pelo acréscimo de PBS gelado para a faixa de 200 a 400 células por microlitro.
- Adicionaram-se 1 a 2 µL dessa solução celular em um novo tubo de PCR contendo 10 µL de tampão de ressuspensão e 1 µL de inibidor de ribonuclease recombinante (40 unidades/µL – inibidor da enzima de ácido ribonucléico - RNaseOUT™) e armazenaram-se essas amostras em *freezer* - 20°C para posterior realização de RT-PCR.
- Degelo e tratamento das amostras a 75°C, por 10 minutos.

Degradação do DNA genômico com DNase I

- Em cada tubo contendo o lisado celular adicionaram-se 5 µL de DNase I (1U/µL) e 1,6 µL de tampão para DNase I.
- Agitação gentil da solução.
- Incubação em temperatura ambiente por cinco minutos.
- Centrifugação breve e adição de 1,2 µL de EDTA 25 mM.
- Incubação a 70°C por cinco minutos.

Síntese do DNA complementar

- Em cada tubo da etapa anterior adicionaram-se 2 µL de Oligo(dT)₂₀(50 nM) e 1 µL de oligonucleotídeos (10 nM dNTP *Mix*).
- Mistura gentil da solução e incubação por 70°C por cinco minutos.
- Incubação no gelo por dois minutos.
- Adição de 6 µL de tampão de transcrição reversa, 1 µL de ribonuclease recombinante (RNaseOUT 40 U/ µL), 1 µL de transcriptase reversa

(SuperScript III RT 200 U/ μ L) e 1 μ L de dithiothreitol (DTT) 0,1 M.

- Agitação gentil da solução.
- Incubação a 50°C, por 50 minutos, em termociclador pré-aquecido.
- Inativação da reação a 85°C, por cinco minutos.
- Adição de 1 μ L de enzima da quebra do ácido ribonucléico (RNase H (2U/ μ L) em cada tubo, com incubação a 37°C por 20 minutos.
- Resfriamento no gelo.
- Armazenamento dos tubos com o DNAc, a -20°C, até a realização da PCR.

3.5.2 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

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 (10 mM), 1,5 μ L de MgCl₂ (50 mM), 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 5403, Alemanha) por poucos segundos 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 no QUADRO 1. Para mais segurança, confirmou-se a existência dos nucleotídeos no interior de cada ácido ribonucléico mensageiro (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 com base na 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 1 µL de RNA total HeLa presente no *kit*. Empregaram-se blastocistos sem zonas pelúcidas como controle positivo da PCR para estudo da expressão gênica do OCT-4 e Nanog; a β-Actina foi usada para controle da presença de amostra. Para controle negativo utilizaram-se 2 µL de água destilada. Realizou-se a análise de 10 µL do produto da reação de PCR por meio de eletroforese com uso de gel de agarose a 2%.

QUADRO 1

Primers utilizados em RT-PCR de camundongos

<i>Primers</i>	Seqüência sintetizada (5'□3')	TA (°C)	Tamanho (bp)	Posição no cDNA	Tm (°C) (50 mM NaCl)	Seqüências	Referências
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>	Krussel <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)

NaCl = cloreto de sódio.

3.6 Cultivo das células de câncer

As amostras de células de câncer de camundongo utilizadas foram B16F1, linhagem de melanoma, B16F10, linhagem de melanoma metastático e CT26WT, linhagem de adenocarcinoma de cólon. As três linhagens foram cultivadas em estufa a 37°C, 6% de CO₂ e umidade constante, em bandeja de água destilada estéril. O meio de cultivo utilizado foi o RPMI-1640 (R8758 - *Sigma-Aldrich*).

3.7 Avaliação da atividade da telomerase

A avaliação da AT foi realizada com metodologia semiquantitativa, pelo método TRAP (*Telomerase Repeat Amplification Protocol*) - (KIM *et al.*, 1994) seguido de reação de *enzyme-linked immunoabsorbent assay* (ELISA), para quantificação dos produtos da PCR. Foi utilizado o *kit* TeloTAGGG Telomerase PCR ELISA PLUS (Roche, Catálogo 12 013 789 001), com algumas modificações no protocolo. A escolha de ELISA para quantificação dos produtos do TRAP parece sofrer menos interferências, que poderiam ocorrer no uso de excesso de amostra, diante de outros tipos de células contaminantes e de substâncias inibidoras na amostra, do que o método TRAP seguido de eletroforese em gel de poliacrilamida (WU *et al.*, 2000).

Todas as etapas da preparação do extrato celular e da PCR foram realizadas em condições assépticas, em ambiente de capela de fluxo laminar, com tubos de PCR estéreis DNase, RNase *free*, ponteiros estéreis DNase, RNase *free* e centrífuga refrigerada conforme orientações do fabricante do *kit*. As alterações no protocolo original do fabricante do *kit* estão ressaltadas a seguir e são discutidas após o detalhamento de todo o processo.

3.7.1 Preparação do extrato celular

- Transferência de 2×10^4 células para um tubo Eppendorf (comentário 1 do subitem 3.7.5).
- Centrifugação por cinco minutos a 3.000 giros à temperatura de 4°C.
- Remoção do sobrenadante, ressuspensão em PBS e repetição da centrifugação.
- Remoção do sobrenadante e ressuspensão do *pellet* celular em 100 µL de reagente de lise pré-resfriado em gelo por retropipetação (comentário 2 do subitem 3.7.5).
- Incubação em gelo por 30 minutos.

- Centrifugação do lisado celular a 16.000 giros por 20 minutos a 4°C.
- Remoção cuidadosa do sobrenadante (87,5 µL) e transferência para um tubo novo. A concentração do lisado celular é de 200 equivalentes celulares (Eq.Cel.) por microlitro (comentário 3 do subitem 3.7.5).
- Transferência de 1,25 uL do lisado celular para novo tubo de PCR, adicionando 48,75 uL de reagente de lise, produzindo lisado celular com concentração de 5 Eq.Cel. por microlitro (comentário 4 do subitem 3.7.5).
- Congelamento do lisado celular a partir de mergulho em nitrogênio líquido e armazenamento a -80°C até a realização da PCR.

3.7.2 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Para cada amostra processada foi produzido um controle negativo, a partir do tratamento de uma alíquota dessa amostra a 85°C, por 10 minutos. Foi realizado também um controle negativo com utilização do reagente de lise, no lugar da amostra. O *kit* emprega também amostras com concentração conhecida de telômeros, denominadas *control template low* e *control template high*, contendo, respectivamente, 0,001 e 0,1 amol/uL. Como controle positivo da PCR, em cada tubo processado, além da amplificação dos telômeros, é amplificado também um “padrão interno”, constituído de uma seqüência de 216 pares de base. O *kit* fornece já pronta uma “mistura de reação” contendo a Taq DNA polimerase, os *primers* biotinilados para os telômeros e para o “padrão interno” e os nucleotídeos que serão utilizados pela Taq DNA polimerase.

3.7.2.1 Preparação dos tubos de PCR

- Para cada amostra testada e os controles, foram adicionados 25 µL de “mistura de reação” e 5 µL do “padrão interno” em um frasco apropriado para PCR.
- Amostras: adicionados 2 µL do extrato celular (correspondendo a 10 Eq.Cel.). Controle negativo: adicionados 2 µL do extrato celular

correspondente inativado pelo calor. *Control template Low* e *Control template High*: adicionado 1 μL de cada em dois tubos separados. Todos os tubos foram completados com água bidestilada livre de RNase e DNase para volume final de 50 μL .

- Transferência dos tubos para o termociclador para os ciclos de alongamento/amplificação, segundo o seguinte protocolo do QUADRO 2:

QUADRO 2

Protocolo para transferência dos tubos para o termociclador
para alongamento e amplificação

	Tempo	Temperatura	Ciclos
Elongamento	30 min	25°C	1
Inativação da telomerase	5 min	94°C	1
Amplificação:			
Desnaturação	30 seg	94°C	30
Anelização	30 seg	50°C	
Polimerização	90 seg	72°C	
	10 min	72°C	1
Armazenamento		4°C	

3.7.3 Hibridização e ELISA

Cada tubo contendo os produtos de PCR das amostras em estudo foi processado durante a realização do ELISA em dois poços separados, um deles contendo tampão de hibridização para telômeros e o outro poço contendo tampão de hibridização para o “padrão interno”. Os controles negativos foram hibridizados com tampão de hibridização para telômeros.

A preparação da hibridização e ELISA seguiu os passos:

- Para cada amostra foram pipetados 10 μL de reagente de desnaturação em dois tubos separados.

- Em cada tubo adicionaram-se 2,5 μL do produto de amplificação e incubou-se a 15 a 25 $^{\circ}\text{C}$, por 10 minutos.
- Foram adicionados 100 μL do tampão de hibridização para telômeros em um dos tubos e 100 μL do tampão de hibridização para o “padrão interno” no outro tubo. Misturou-se por *vortex* completamente. Os controles negativos foram tratados apenas com tampão de hibridização para telômeros.
- Foram transferidos 100 μL de cada mistura para cada poço correspondente na microplaca.
- Cobriram-se os poços com a folha adesiva.
- Incubou-se a microplaca em um agitador a 37 $^{\circ}\text{C}$ a 300 rpm por duas horas.
- Removeram-se as soluções de hibridização completamente.
- Foram realizadas três lavagens com 250 μL de tampão de lavagem por no mínimo 30 segundos cada e, então, removeu-se completamente o tampão.
- Adicionaram-se 100 μL de solução de anticorpo policlonal antidigoxigenina (AntiDIG) conjugado com peroxidase de cavalo marinho, cobriu-se com a folha adesiva e incubou-se no agitador a 300 rpm, por 30 minutos, a 15 a 25 $^{\circ}\text{C}$.
- Removeu-se a solução completamente e foram realizadas cinco lavagens (30 segundos cada) com 250 μL de tampão de lavagem, removendo-se completamente o tampão ao final.
- Adicionaram-se 100 μL de solução de Tetrametilbenzidina, substrato para produção de cor, pré-aquecida a 15 a 25 $^{\circ}\text{C}$ por poço. Cobriu-se a microplaca com a folha adesiva e incubou-se a 300 rpm, por 20 minutos, a 15 a 25 $^{\circ}\text{C}$.
- Sem remover o substrato em reação, adicionaram-se 100 μL do reagente de parada (*stop*), para interromper a formação de cor, com mudança da cor de azul para amarelo.
- Usando um leitor de microplaca (ELISA), mediu-se a absorbância das amostras a 450 nm (com um comprimento de onda de referência de 630 nm) em até 30 minutos após o acréscimo do *stop reagent* (comentário 5 do subitem 3.7.5).

3.7.4 Cálculo da atividade relativa de telomerase

Segundo recomendação do fabricante, a atividade relativa de telomerase deve ser calculada segundo a equação 1:

$$RTA = \frac{(A_S - A_{S0})/A_{S,IS}}{(A_{TS8} - A_{TS8,0})/A_{TS8,IS}} \times 100 \quad (1)$$

RTA: atividade relativa de telomerase

A_S : Absorbância da amostra

A_{S0} : Absorbância do controle negativo da amostra tratado pelo calor

$A_{S,IS}$: Absorbância do padrão interno da amostra

A_{TS8} : Absorbância da amostra de referência com alta AT

$A_{TS8,0}$: Branco da reação

$A_{TS8,IS}$: Absorbância do padrão interno da amostra com alta AT

3.7.5 Comentários sobre as alterações no protocolo original do fabricante

- **Comentário 1** - o fabricante recomenda que sejam transferidas 2×10^5 células para a realização do lisado celular. Entretanto, as amostras de CT foram congeladas em alíquotas de 2×10^4 células. A utilização de número mais baixo de células para a realização do lisado celular encontra respaldo na literatura (KIM *et al.*, 1994). Apesar das amostras de câncer avaliadas possuírem mais que 2×10^5 células, também foi utilizado o número de 2×10^4 para padronização da metodologia.
- **Comentário 2** - o protocolo original sugere a utilização de 200 μ L de reagente de lise. Optou-se pela redução para 100 μ L devido à utilização de menor número de células (vide comentário 1).
- **Comentário 3** - foram transferidos apenas 87,5 μ L, em vez de 175 μ L, devido à redução na quantidade de reagente de lise utilizado (vide comentário 2).
- **Comentário 4** - a diluição até 5 Eq.Cel/uL foi realizada porque foi necessário o uso de apenas 10 Eq.Cel para realização da PCR. O protocolo original recomenda o uso de 1.000 a 3.000 células na PCR.

Contudo, em experimentos-piloto realizados, os resultados obtidos na PCR com a utilização de 1.000 Eq.Cel, 330 Eq.Cel e 100 Eq.Cel. mostraram inibição da amplificação do padrão interno (controle positivo utilizado na reação), mas que também tem seu valor de absorbância utilizado no cálculo final da AT. A inibição da amplificação do padrão interno acontece em amostras com muito alta AT, devido à competição na PCR (as duas reações acontecem em um mesmo tubo). Portanto, foi necessário diminuir o número de equivalentes celulares utilizados na PCR, como forma de se diminuir a quantidade de telomerase presente, para permitir a amplificação do padrão interno. A utilização de 10 equivalentes celulares está dentro da faixa de sensibilidade do *kit*, segundo o fabricante, e foi, então, utilizada em todas as amostras em que se avaliou a AT.

- **Comentário 5** - o valor do segundo comprimento de onda recomendado pelo fabricante é de 690 nm. No entanto, a leitora de microplacas disponível para realização da leitura não dispunha desse filtro, sendo utilizado o de 630 nm. A adoção do segundo filtro de leitura permite que se subtraia da absorbância principal (450 nm) o ruído, obtendo-se, assim, leitura mais apurada, livre de interferências do meio. Deve ser usado, então, um filtro com comprimento de onda fora do espectro de absorbância do cromógeno utilizado. Como o comprimento de onda de 630 nm sai do espectro de absorbância da tetrametilbenzidina (TMB), espera-se que essa mudança não influencie os resultados finais.

3.8 Análise estatística

O presente estudo utilizou análise descritiva dos resultados devido ao fato de a avaliação de três linhagens celulares não permitir o uso de testes estatísticos para a investigação de diferenças entre os grupos.

4 RESULTADOS

Foram avaliadas três linhagens diferentes de CTEc, denominadas, respectivamente, de CT2, CT3 e CT4. Cada uma foi cultivada até a passagem número 19, sendo congeladas amostras de cada uma das passagens de todas elas.

Devido ao reduzido número de células nas passagens iniciais durante o período de expansão das mesmas, optou-se por trabalhar com as células a partir da passagem 11. As passagens 11, 13, 15, 17 e 19 foram submetidas à RT-PCR para avaliação de características de indiferenciação (presença de RNAm dos genes OCT-4 e NANOG). Os resultados dessa avaliação estão detalhados no QUADRO 3.

QUADRO 3

Avaliação da presença de atividade dos genes de indiferenciação, em diferentes passagens celulares das três linhagens de CTEc

	CT2					CT3					CT4				
	P11	P13	P15	P17	P19	P11	P13	P15	P17	P19	P11	P13	P15	P17	P19
β-Actina	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	○	X
OCT-4	X	X	X	X	X	○	X	X	X	X	X	X	X	X	X
NANOG	X	X	X	X	X	○	X	X	○	X	X	X	X	○	X

Nota: CT= Célula-tronco; P= passagem celular; X= identificação positiva do gene; ○= identificação negativa do gene.

As FIG. 6, 7 e 8 mostram exemplos de fotografias com leituras de gel de eletroforese das avaliações constantes no QUADRO 3.



FIGURA 6 - Fotografia de gel de eletroforese contendo produto de PCR do gene OCT4 de algumas amostras celulares estudadas.

Ladder: marcador com diferentes comprimentos de segmentos de DNA; Contr -: controle negativo; CT: linhagem de célula-tronco; P: passagem celular; BP: pares de base.

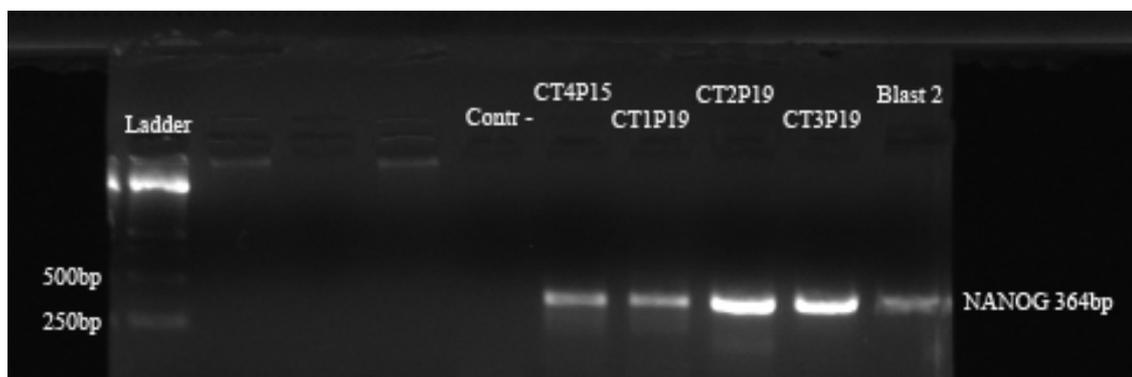


FIGURA 7 - Fotografia de gel de eletroforese contendo produto de PCR do gene NANOG de algumas amostras celulares estudadas.

Ladder: marcador com diferentes comprimentos de segmentos de DNA; Contr -: controle negativo; CT: linhagem de célula-tronco; P: passagem celular; Blast 2: blastocisto usado como controle positivo; BP: pares de base.

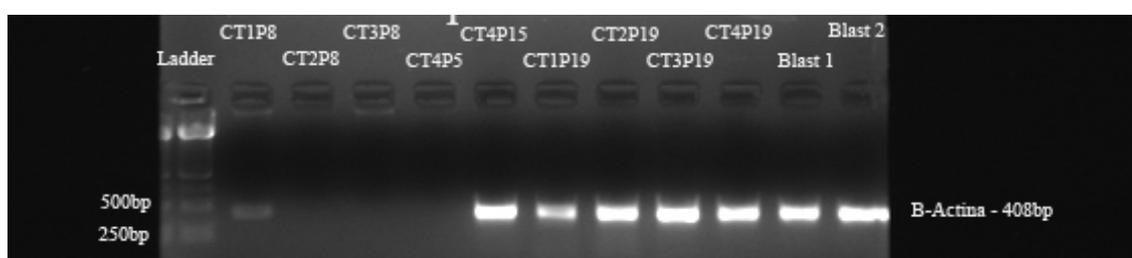


FIGURA 8 - Fotografia de gel de eletroforese contendo produto de PCR do gene β -Actina de algumas amostras celulares estudadas.

Ladder: marcador com diferentes comprimentos de segmentos de DNA; CT: linhagem de célula-tronco; P: passagem celular; Blast 2: blastocisto usado como controle positivo; BP: pares de base.

As passagens 13, 15 e 19 foram então escolhidas para avaliação da AT, pois foram positivas para os genes β -Actina, OCT-4 e NANOG nas três linhagens de CTEc. Os resultados são resumidos na TAB. 1. O coeficiente de variação intra-ensaio foi de 11,9%.

TABELA 1
Atividade de telomerase avaliada em três linhagens de CTEc,
em três diferentes passagens celulares

	P13	P15	P19
CT2	1,09	13,24	36,90
CT3	1,46	21,82	22,37
CT4	3,82	39,05	34,22
Média das linhagens de células-tronco	1,59	18,53	23,37

CT: célula-tronco; P: passagem celular.

Os tumores B16F1, B16F10 e CT26WT também foram avaliados quanto à AT. Os resultados são descritos na TAB. 2.

TABELA 2
Atividade de telomerase avaliada em três linhagens
de tumores de camundongo

Tumor	AT
B16F1	128,60
CT26WT	30,94
B16F10	1,45

AT: atividade de telomerase; B16F1: linhagem de melanoma de camundongo; CT26WT: linhagem de adenocarcinoma de cólon de camundongo; B16F10: linhagem de melanoma metastático de camundongo.

O GRAF. 1 destaca o comportamento da AT nas amostras de CTEc avaliadas. Os dados sugerem tendência a aumento da AT entre as passagens 13 e 15, com estabilização entre as passagens 15 e 19.

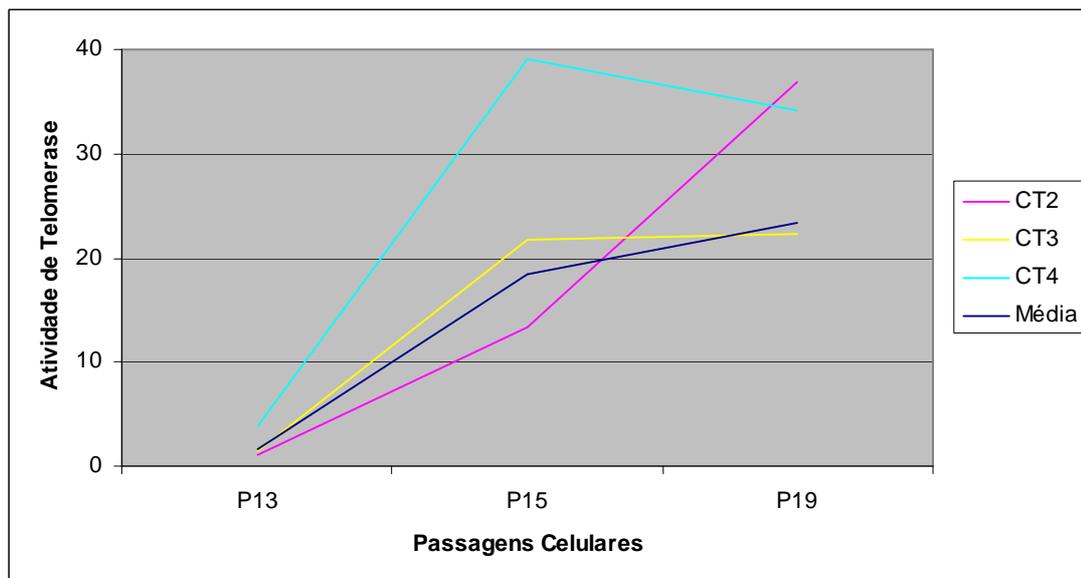


GRÁFICO 1 - Atividade de telomerase avaliada em três linhagens de CTEc, em três diferentes passagens celulares.

CT: célula-tronco; P: passagem celular.

O GRÁF. 2 mostra a comparação da AT entre as linhagens de CTEc e as linhagens de tumor de camundongos avaliadas. Pode-se observar que a AT das linhagens de CTEc foi mais próxima da atividade da linhagem de tumor CT26WT. A linhagem B16F1 mostrou resultados bem mais elevados, enquanto a linhagem B16F10 mostrou resultados de AT comparáveis aos da passagem 13 das três linhagens de CTEc.

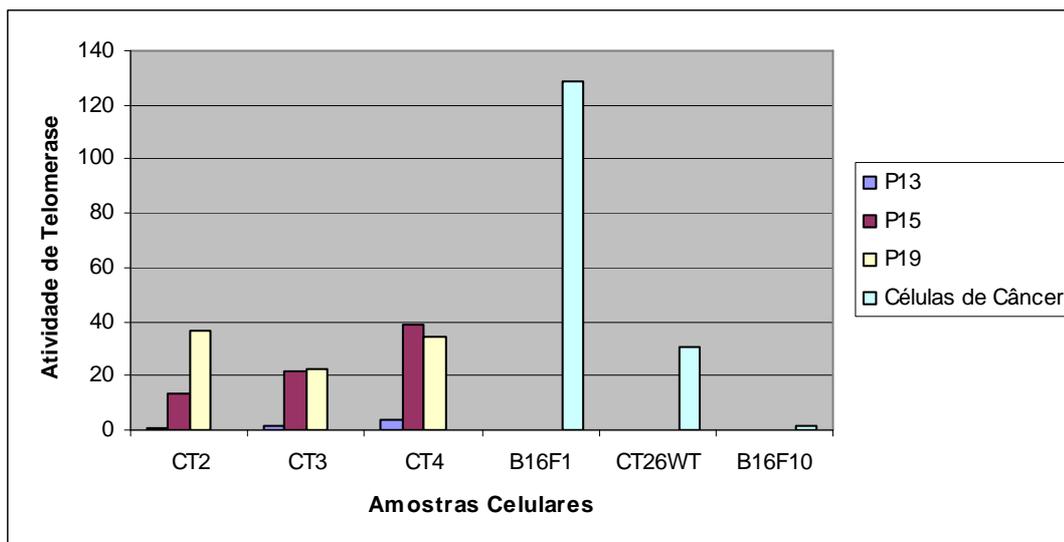


GRÁFICO 2 - Comparação da AT entre as linhagens de CTEc e as linhagens de tumor de camundongo.

CT: célula-tronco; P: passagem celular; B16F1: linhagem de melanoma de camundongo; CT26WT: linhagem de adenocarcinoma de cólon de camundongo; B16F10: linhagem de melanoma metastático de camundongo.

5 DISCUSSÃO

A medida da AT é hoje um campo bastante promissor para pesquisas, devido à sua marcante presença em células de grande interesse para a ciência, como as CT e as células de câncer. A associação da telomerase com a fisiopatologia do câncer, a possibilidade de seu uso como alvo em terapias antineoplásicas, a associação com doenças do envelhecimento, assim como a necessidade de um fino controle da replicação celular na terapia celular com CT justificam os investimentos atuais na tentativa de elucidação de sua regulação e suas funções.

Os resultados encontrados neste trabalho mostram alta AT em todas as células avaliadas, mas aparentemente existem diferenças entre as passagens de CTEc e entre os tumores avaliados. Entre as três passagens de CTEc avaliadas, ocorreu tendência a aumento inicial, com posterior tendência a estabilização. As causas dessa variação permanecem obscuras. Esse aumento inicial da AT poderia significar uma seleção de células mais agressivas, com maior capacidade de proliferação. Quando uma placa de cultivo de células chega à confluência num período de tempo curto, possivelmente as células mais agressivas daquele conjunto foram as que mais se multiplicaram, ocupando maior extensão da placa.

Outra hipótese para explicar essas variações seria a semeadura de concentrações celulares maiores ou menores durante a realização de cada passagem. Isso poderia ter gerado alterações no ambiente do meio de cultivo, afetando a expressão gênica das células e, conseqüentemente, a AT. Não sendo objetivo deste trabalho, o controle estrito da concentração celular semeada em cada placa de cultivo não foi realizado.

A alta AT evidenciada nas CT está em concordância com a literatura mundial. Armstrong *et al.* (2005), através de metodologia similar, também encontraram resultados elevados. Gao *et al.* (2008) encontraram alta AT em CTEc, em comparação com CTEc isoladas de animais *knockout* para o gene TERT, medida sem a metodologia ELISA.

Conhece-se então a presença da AT nas CTE, mas não se tem ainda completo entendimento sobre o seu comportamento. São poucos os trabalhos na literatura que avaliaram a variação da AT nessas células durante longo tempo de cultivo *in vitro*. A maioria apenas cita a elevada presença de AT em CTE, e presume que essa AT seria suficiente para nunca permitir o encurtamento dos telômeros (DENHAM *et al.*, 2005).

Thomson *et al.* (1998) avaliaram a AT utilizando o TRAP, em cinco linhagens de CTE humanas, entre as passagens 10 e 13, e descreveram os resultados como “altos”, em comparação com linhagens de tumor de rim e de mama.

Rosler *et al.* (2004), utilizando três das linhagens de CTE humanas isoladas por Thomson *et al.* (1998), estudaram o comportamento das células após um ano em cultivo. Entre outras características, compararam a AT avaliada entre as passagens 30 e 40 com a AT avaliada entre as passagens 60 a 130, por meio do TRAP, e não encontraram diferenças. Entretanto, algumas diferenças sutis foram encontradas em alguns subgrupos de genes após análise detalhada da expressão antigênica pela citometria de fluxo e da expressão gênica por meio de *microarray*, o que mostra que pode haver transformações nas CTE após longo tempo de cultivo. Ainda após cultivo prolongado, Buzzard *et al.* (2004) e Draper *et al.* (2004) chamam a atenção para a possibilidade de ocorrência de anormalidades cromossômicas, dependendo das condições específicas de cultura utilizadas.

A evolução da metodologia na avaliação da AT também pode proporcionar a elucidação de algumas questões. A avaliação da AT através do TRAP é bastante sensível, pois utiliza amplificação por PCR. Entretanto, é necessária a utilização de uma segunda técnica para tentar quantificar os produtos do TRAP. Os trabalhos citados de Thomson *et al.* (1998) e Rosler *et al.* (2004) utilizaram eletroforese em gel de poliacrilamida, com identificação da banda correspondente a 6 pares de base e medição da intensidade do sinal.

Neste trabalho, foi utilizado o método de ELISA para a quantificação dos produtos do TRAP. A metodologia TRAP-ELISA parece ser menos afetada por interferências como o uso de excesso de amostra, a presença de outros tipos de

células contaminantes, e a presença de substâncias inibidoras na amostra, do que o método TRAP seguido de eletroforese em gel de poliacrilamida (WU *et al.*, 2000). Atualmente, já está disponível uma nova forma para a quantificação real da AT, através do PCR em tempo real (*Real Time-PCR*). A nova metodologia vem apresentando resultados mais rápidos e mais precisos e acredita-se que possa contribuir bastante para o avanço das pesquisas (HOU *et al.*, 2001).

Um dos principais interesses atualmente em se trabalhar com CT é a possibilidade de seu uso futuro em terapias celulares. A grande capacidade de proliferação das CT seria então desejável no início do processo, para se produzir um grande número de células disponíveis para utilização. Contudo, a proliferação tem que ser contida em algum momento, devido ao risco de formação de tumores, como os teratomas. Todos os mecanismos de controle da divisão celular devem ser entendidos e dominados na manipulação das CT, assim como as transformações sofridas durante o cultivo e o comportamento da AT após várias passagens celulares.

O estudo da telomerase deve avançar na direção de um melhor entendimento de suas funções, sua regulação, assim como em formas eficazes e seguras de se ativá-la ou de se inibi-la. Os efeitos extrateloméricos da telomerase, como a estabilização do DNA genômico e a reparação de danos do DNA, precisam ser mais bem estudados e conhecidos.

As amostras de tumor mostraram resultados bastante variáveis, mas todas foram fortemente positivas. Esses achados são compatíveis com a descrição, na literatura, da existência de AT em cerca de 90% dos tumores (GREIDER; BLACKBURN, 1996) e reforçam a estratégia de pesquisa da telomerase como alvo de terapias antineoplásicas, pois nenhuma outra característica é tão freqüente entre os mais diversos tipos de tumor (CORTEZ-GONZALEZ; ZANETTI, 2007).

Com o avanço da expectativa de vida da espécie humana, cada vez mais pessoas estarão expostas ao risco do desenvolvimento de câncer no mundo. Em muitos casos, os tratamentos disponíveis não atingem o resultado esperado,

ocasionando efeitos colaterais importantes e permitindo a interrupção prematura de milhões de vidas. A ciência precisa continuar a busca por tratamentos mais eficazes; e as terapias antitelomerase se mostram como áreas bastante promissoras.

Mais estudos são necessários para confirmação das diferenças encontradas na AT entre as passagens celulares das CT e das linhagens tumorais.

6 CONCLUSÕES

- As CTEc e as linhagens B16F1, CT26WT e B16F10 apresentaram alta capacidade de multiplicação, expressa pela elevada medida da atividade de telomerase.

REFERÊNCIAS

ARMSTRONG, L. *et al.* Overexpression of telomerase confers growth advantage, stress resistance, and enhanced differentiation of ESCs toward the hematopoietic lineage. **Stem Cells**, v.23, n.4: p.516-29, 2005.

ARTANDI, S.E. Telomeres, telomerase, and human disease. **N Engl J Med**, v.355, n.12: p.1195-7, 2006.

ASAI, A. *et al.* A novel telomerase template antagonist (GRN163) as a potential anticancer agent. **Cancer Res**, v.63, n.14: p.3931-9, 2003.

AUBERT, G.; LANSDORP, P.M. Telomeres and aging. **Physiol Rev**, v.88, n.2: p.557-79, 2008.

BAIER, P.C. *et al.* Behavioral changes in unilaterally 6-hydroxy-dopamine lesioned rats after transplantation of differentiated mouse embryonic stem cells without morphological integration. **Stem Cells**, v.22, n.3: p.396-404, 2004.

BAYNE, S.; LIU, J.P. Hormones and growth factors regulate telomerase activity in ageing and cancer. **Mol Cell Endocrinol**, v.240, n.1-2: p.11-22, 2005.

BJORKLUND, L.M. *et al.* Embryonic stem cells develop into functional dopaminergic neurons after transplantation in a Parkinson rat model. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.99, n.4: p.2344-9, Epub Jan 2002.

BLACKBURN, E.H.; GALL, J.G. A tandemly repeated sequence at the termini of the extrachromosomal ribosomal RNA genes in Tetrahymena. **J Mol Biol**, v.120, n.1: p.33-53, 1978.

BODNAR, A.G. *et al.* Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. **Science**, v.279, n.5349: p.349-52, 1998.

BOLLMANN, F.M. The many faces of telomerase: emerging extratelomeric effects. **Bioessays**, v.30, n.8: p.728-32, 2008.

BUZZARD, J. J. *et al.* Karyotype of human ES cells during extended culture. **Nat Biotechnol**, v.22, n.4: p.381-2, 2004.

CANELA, A. *et al.* Constitutive expression of tert in thymocytes leads to increased incidence and dissemination of T-cell lymphoma in Lck-Tert mice. **Mol Cell Biol**, v.24, n.10: p.4275-93, 2004.

CHAMBERS, I. *et al.* Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. **Cell**, v.113, n.5: p.643-55, 2003.

CHANG, S.,C. *et al.* Telomere-based crisis: functional differences between telomerase activation and ALT in tumor progression. **Genes Dev**, v.17, n.1: p.88-

100, 2003.

CHOI, J. *et al.* TERT promotes epithelial proliferation through transcriptional control of a Myc- and Wnt-related developmental program. **PLoS Genet**, v.4, n.1: p.e10, Epub Dec 2007.

COLLINS, K. The biogenesis and regulation of telomerase holoenzymes. **Nat Rev Mol Cell Biol**, V.7, n.7: p.484-94, 2006.

COLLINS, K.; MITCHELL, J.R. Telomerase in the human organism. **Oncogene**. v.21, n.4: p.564-79, 2002.

CONG, Y.; SHAY, J.W. Actions of human telomerase beyond telomeres. **Cell Res**, v.18, n.7: p.725-32, 2008.

CONG, Y.S. *et al.* Human telomerase and its regulation. **Microbiol Mol Biol Rev**, v.66, n.3: p.407-25, table of contents, 2002.

CORTEZ-GONZALEZ, X.; ZANETTI, M. Telomerase immunity from bench to bedside: round one. **J Transl Med**, v.5: p.12, 2007.

DENG, Y. *et al.* Telomere dysfunction and tumour suppression: the senescence connection. **Nat Rev Cancer**, v.8, n.6: p.450-8, 2008.

DENHAM, M. *et al.* Stem cells: an overview. **Curr Protoc Cell Biol**, c.23: p.Unit 23.1, 2005.

DIKMEN, Z.G. *et al.* In vivo inhibition of lung cancer by GRN163L: a novel human telomerase inhibitor. **Cancer Res**, v.65, n.17: p.7866-73, 2005.

DRAPER, J. S. *et al.* Culture and characterization of human embryonic stem cells. **Stem Cells Dev**, v.13, n.4: p.325-36, 2004.

DUNHAM, M.A. *et al.* Telomere maintenance by recombination in human cells. **Nat Genet**, v.26, n.4: p.447-50, 2000.

FLORES, I. *et al.* Effects of telomerase and telomere length on epidermal stem cell behavior. **Science**, v.309, n.5738: p.1253-6, Epub Jul 2005.

GAO, Q. *et al.* Telomerase-dependent and -independent chromosome healing in mouse embryonic stem cells. **DNA Repair (Amst)**, v.7, n.8: p.1233-49, 2008.

GOLDBLATT, E.M. *et al.* Lipid-conjugated telomerase template antagonists sensitize resistant HER2-positive breast cancer cells to trastuzumab. **Breast Cancer Res Treat**, v.14: p.14, 2008.

GREIDER, C.W.; BLACKBURN, E.H. Identification of a specific telomere terminal transferase activity in Tetrahymena extracts. **Cell**, v.43, n.2 Pt 1: p. 405-13, 1985.

GREIDER, C.W.; BLACKBURN, E.H. Telomeres, telomerase and cancer. **Sci Am**,

v.274, n.2: p.92-7, 1996.

HAHN, W.C. *et al.* Inhibition of telomerase limits the growth of human cancer cells. **Nat Med**, v.5, n.10: p.1164-70, 1999.

HARLEY, C.B. Telomerase and cancer therapeutics. **Nat Rev Cancer**, v.8, n.3: p.167-79, 2008.

HAY, D.C. *et al.* Oct-4 knockdown induces similar patterns of endoderm and trophoblast differentiation markers in human and mouse embryonic stem cells. **Stem Cells**, v.22, n.2: p.225-35, 2004.

HAYFLICK, L. The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. **Exp Cell Res**, v.37: p.614-36, 1965.

HERBERT, B. *et al.* Inhibition of human telomerase in immortal human cells leads to progressive telomere shortening and cell death. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.96, n.25: p.14276-81, 1999.

HODGSON, D.M. *et al.* Stable benefit of embryonic stem cell therapy in myocardial infarction. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v.287, n.2: p.H471-9, 2004.

HOFFMAN, L.M.; CARPENTER, M.K. Characterization and culture of human embryonic stem cells. **Nat Biotechnol**, v.23, n.6: p.699-708, 2005.

HORI, Y.I. *et al.* Growth inhibitors promote differentiation of insulin-producing tissue from embryonic stem cells. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.99, n.25: p.16105-10, Epub Nov 2002.

HOU, M. *et al.* Real-time quantitative telomeric repeat amplification protocol assay for the detection of telomerase activity. **Clin Chem**, v.47, n.3: p.519-24, 2001.

JOHNSON, J.E.; BROCCOLI, D. Telomere maintenance in sarcomas. **Curr Opin Oncol**, v.19, n.4: p.377-82, 2007.

KELLAND, L.R. Overcoming the immortality of tumour cells by telomere and telomerase based cancer therapeutics--current status and future prospects. **Eur J Cancer**, v.41, n.7: p.971-9, 2005.

KIM, J.H. *et al.* Dopamine neurons derived from embryonic stem cells function in an animal model of Parkinson's disease. **Nature**, v.418, n.6893: p.50-6, Epub Jun 2002.

KIM, J.H. *et al.* Identification of a quinoxaline derivative that is a potent telomerase inhibitor leading to cellular senescence of human cancer cells. **Biochem J**, v.373, n.Pt 2: p.523-9, 2003.

KIM, N.W. *et al.* Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. **Science**, v.266, n.5193: p.2011-5, 1994.

KRUSSEL, J.S. *et al.* Expression of interleukin-1 system mRNA in single blastomeres from human preimplantation embryos. **Hum Reprod**, v.13, n.8: p.2206-11, 1998.

LANSDORP, P.M. Telomeres, stem cells, and hematology. **Blood**, v.111, n.4: p.1759-66, Feb 2008.

LIU, S. *et al.* Embryonic stem cells differentiate into oligodendrocytes and myelinate in culture and after spinal cord transplantation. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.97, n.11: p.6126-31, 2000.

LONDOÑO-VALLEJO, J.A. Telomere instability and cancer. **Biochimie**, v.90, n.1: p.73-82, Epub Jul 2008.

MASER, R.S.; De PINHO, R.A. Connecting chromosomes, crisis, and cancer. **Science**, v.297, n.5581: p.565-9, 2002.

MASUTOMI, K. *et al.* The telomerase reverse transcriptase regulates chromatin state and DNA damage responses. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.102, n.23: p.8222-7, Epub May 2005.

McCLINTOCK, B. The stability of broken ends of chromosomes in *zea mays*. **Genetics**, v.26, n.2: p.234-82, 1941.

McDONALD, J.W. *et al.* Transplanted embryonic stem cells survive, differentiate and promote recovery in injured rat spinal cord. **Nat Med**, v.5, n.12: p.1410-2, 1999.

MIN, J.Y. *et al.* Transplantation of embryonic stem cells improves cardiac function in postinfarcted rats. **J Appl Physiol**, v.92, n.1: p.288-96, 2002.

MIURA, T. *et al.* Cellular lifespan and senescence signaling in embryonic stem cells. **Ageing Cell**, v.3, n.6: p.333-43, 2004.

MÜLLER, H. The remaking of chromosomes. **Collect Net**, v.13: p.181-198, 1938.

OLOVNIKOV, A.M. A theory of marginotomy. The incomplete copying of template margin in enzymic synthesis of polynucleotides and biological significance of the phenomenon. **J Theor Biol**, v.41, n.1: p.181-90, 1973.

PASCOLO, E. *et al.* Mechanism of human telomerase inhibition by BIBR1532, a synthetic, non-nucleosidic drug candidate. **J Biol Chem**, v.277, n.18: p.15566-72, Epub Feb 2002.

RATAIN, M.J. *et al.* A phase I trial of GRN163L (GRN), a first-in-class telomerase inhibitor, in advanced solid tumors. **J Clin Oncol**, v.26(Suppl): abstr p.3581, 2008.

REDDEL, R.R. The role of senescence and immortalization in carcinogenesis. **Carcinogenesis**, v.21, n.3: p.477-84, 2000.

RIDEOUT, W.M. *et al.* Correction of a genetic defect by nuclear transplantation and combined cell and gene therapy. **Cell**, v.109, n.1: p.17-27, 2002.

ROSLER, E.S. *et al.* Long-term culture of human embryonic stem cells in feeder-free conditions. **Dev Dyn**, v.229, n.2: p.259-74, 2004.

SARIN, K.Y. *et al.* Conditional telomerase induction causes proliferation of hair follicle stem cells. **Nature**, v.436, n.7053: p.1048-52, 2005.

SHAMMAS, M.A. *et al.* Telomerase inhibitor GRN163L inhibits myeloma cell growth in vitro and in vivo. **Leukemia**, v.22, n.7: p.1410-8, Epub May 2008.

SHAY, J.W.; WRIGHT, W.E. Hayflick, his limit, and cellular ageing. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v.1, n.1: p.72-6, 2000.

SHAY, J.W.; WRIGHT, W.E. Senescence and immortalization: role of telomeres and telomerase. **Carcinogenesis**, v.26, n.5: p.867-74, Epub Oct 2005.

STEWART, S.A. *et al.* Telomerase contributes to tumorigenesis by a telomere length-independent mechanism. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.99, n.20: p.12606-11, Epub Aug 2002.

TAVARES, R.L. *et al.* A specific and quick gene expression study in mouse ES cells. **J Assist Reprod Genet**, v.24, n.8: p.366-72, Epub Jul 2007, 2007.

THOMSON, J.A. *et al.* Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. **Science**, v.282, n.5391: p.1145-7, 1998.

TSAKIRI, K.D. *et al.* Adult-onset pulmonary fibrosis caused by mutations in telomerase. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.104, n.18: p.7552-7, Epub Apr 2007.

WAI, L.K. Telomeres, telomerase, and tumorigenesis: a review. **Med Gen Med**, v.6, n.3: p.19, 2004.

WARABI, K. *et al.* Axinelloside A, an unprecedented highly sulfated lipopolysaccharide inhibiting telomerase, from the marine sponge, *Axinella infundibula*. **J Am Chem Soc**, v.127, n.38: p.13262-70, 2005.

WATSON, J.D.; CRICK, F.H.C. Molecular structure of nucleic acids: a structure for deoxyribose nucleic acid, *Nature*, n.4356, April 1953. Reimpresso: **Nature**, v.248, n.5451: p.765, 1974.

WU, Y.Y. *et al.* Limitations on the quantitative determination of telomerase activity by the electrophoretic and ELISA based TRAP assays. **Clin Chim Acta**, v.293, n.1-2: p.199-212, 2000.

YAMAGUCHI, H. *et al.* Mutations in TERT, the gene for telomerase reverse transcriptase, in aplastic anemia. **N Engl J Med**, v.352, n.14: p.1413-24, 2005.

ZHANG, X. *et al.* Telomere shortening and apoptosis in telomerase-inhibited human tumor cells. **Genes Dev**, v.13, n.18: p.2388-99, 1999.