

CÉLULAS ISOLADAS DE FRANGO E CARACTERIZADAS GENETICAMENTE COM POTENCIAL PARA DESENVOLVIMENTO DE CARNE CULTIVADA

Vanessa Haach¹, Karine R. D. Silveira¹, Maíra A. Peixoto¹, Ana Paula P. e Sá¹, Ana Paula A. Bastos¹

¹Embrapa Suínos e Aves, Concórdia, Santa Catarina, Brasil

ABSTRACT/RESUMO

Cultured meat is a promising technology that aims to satisfy the growing demand for animal protein without sacrificing animals, associated with food safety, disease-free and reduced environmental impact. In this study, the muscle cells obtained showed potential for producing cultured meat. Furthermore, analysis of the relative gene expression profiles of pluripotency genes in blastoderm cells, adult stem cells, and myoblasts revealed variations in the expression of cOCT4, cSOX3, cNANOG, cSALL4, cCLDN3, cKIT, and cLIN28A. Each cell type exhibited specific regulation patterns and distinct functions. Blastoderm cells indicated a highly undifferentiated state, adult stem cells reflected more restricted pluripotency, and myoblasts were consistent with their differentiated function. This research not only promotes technological innovation in food production but also offers a sustainable and ethical approach to meeting the growing global demand for animal protein.

PALAVRAS-CHAVE: Células tronco, mioblastos, genes de pluripotência, frango, carne cultivada.

INTRODUÇÃO

A indústria alimentícia introduziu mudanças, inovações e possibilidades para a produção de novos alimentos, dentre esses o mais promissor tem sido a carne cultivada. A produção de carne cultivada, ou proteína a base de células animais, emprega técnicas laboratoriais de engenharia de tecidos para obtenção de um alimento para consumo sem comprometer o perfil nutricional e sem necessidade do abate de animais. Para tal, as células animais são obtidas, isoladas, induzidas a proliferação/diferenciação, forma-se a biomassa para depois processar em produtos alimentares finais. Dentre as células potencialmente utilizadas existem as células

tronco embrionárias, as mesenquimais e as células progenitoras, como os mioblastos. Os mioblastos, células progenitoras musculares, de frango têm a capacidade de se proliferar, migrar para áreas específicas e se fundir para formar miotubos, que se desenvolvem em fibras musculares maduras (Benny et al., 2022). Ademais, os genes de pluripotência em frangos desempenham papéis cruciais na manutenção da capacidade de células tronco de se diferenciarem em diversos tipos celulares. Em células tronco, especialmente as células tronco embrionárias, esses genes garantem a manutenção de um estado indiferenciado e a capacidade de se transformar em qualquer célula do organismo. Através da manipulação

desses genes, é possível reprogramar células diferenciadas de frango para um estado pluripotente, permitindo a sua posterior diferenciação em células musculares, aplicações importantes para a biotecnologia e a agricultura. Estudos têm investigado a expressão e a funcionalidade desses genes de pluripotência em aves, buscando entender como eles podem ser manipulados para melhorar a eficiência da reprogramação celular e a qualidade das células derivadas, levando a avanços significativos na biotecnologia avícola (Lavial & Pain, 2010). Assim, esse estudo teve como objetivo isolar células musculares de frango para produção de carne cultivada, e avaliar o perfil da expressão gênica relativa dos genes de pluripotência de frango cOCT4, cSOX3, cNANOG, cSALL4, cCLDN3, cKIT e cLIN28A em células da blastoderme, células tronco adultas e mioblastos de frango.

MATERIAL E MÉTODOS

As células tronco embrionária da blastoderme no estágio X de Eyal-Giladi e Kochav (EGK), foram isoladas de ovos férteis não incubados de galinhas livres de patógenos específicos (SPF), colocando um papel filtro com abertura central de forma a emoldurar a blastoderme. Após, foram cortadas as membranas vitelinas ao redor do papel filtro, realizadas lavagens com PBS para remoção da gema, e a suspensão celular foi filtrada em filtro de 70 µm. As células tronco adultas e mioblastos foram isoladas de embriões de galinhas SPF com 15 dias de incubação. Os músculos do tórax e dos membros posteriores foram dissociados em populações unicelulares utilizando colagenase do tipo I, seguido de digestão com tripsina a 0,25%, ambos a 37 °C. A suspensão celular foi filtrada e as hemácias foram lisadas. As células foram cultivadas em meio DMEM-High Glucose suplementado com 20% de soro fetal bovino e 1% de antibiótico-antimicótico. As células tronco adultas foram obtidas após duas horas de incubação do plaqueamento, e os mioblastos foram obtidos após a quarta passagem pelo método de adesão seletiva. Posteriormente, os mioblastos foram induzidos a diferenciação em miotubos e, em seguida, em miofibras, com meio DMEM-High Glucose suplementado com

2% de soro fetal bovino e 1% de antibiótico-antimicótico, a 41 °C. Para caracterização genética, o RNA total das células da blastoderme, células tronco adultas e mioblastos foi extraído utilizando TRIzol (Invitrogen) associado ao RNeasy Mini Kit (Qiagen), de acordo com as recomendações dos fabricantes. A digestão de DNA foi realizada na coluna utilizando RNase-Free DNase Set (Qiagen) para remover DNA genômico contaminante. As amostras de RNA foram quantificadas usando o espectrofotômetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific). O DNA complementar (cDNA) foi sintetizado utilizando o kit SuperScript III First-Strand Synthesis SuperMix (Invitrogen), conforme as instruções do fabricante. As reações de RT-qPCR foram realizadas usando o kit QuantiNova SYBR Green PCR (Qiagen), com ajuste da concentração de cada par de iniciadores. Os genes de frango avaliados foram cOCT4, cSOX3, cNANOG, cSALL4 e cCLDN3, utilizando pares de iniciadores descritos por Giotis et al., 2019, e cKIT e cLIN28A, usando pares de iniciadores descritos por Han et al., 2018. As corridas foram realizadas no ABI 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems), e cada amostra foi amplificada em triplicata utilizando 50 ng de cDNA. A expressão gênica relativa foi calculada após normalização com o gene endógeno cGAPDH usando a fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os mioblastos isolados de embriões de frango, proliferaram e, posteriormente, se diferenciaram em miotubos e miofibras. Essas células musculares apresentam potencial para produção de carne cultivada ao serem cultivadas com um biomaterial, formando estruturas musculares semelhantes às encontradas na carne tradicional. Na caracterização genética, a expressão dos genes de pluripotência variou entre os diferentes tipos celulares de frango. As células da blastoderme, as quais representam um estágio inicial de desenvolvimento embrionário, exibiram alta expressão desses genes, refletindo sua pluripotência. Nessas células o gene mais expresso foi cOCT4, seguido dos genes cSALL4, cNANOG, cLIN28A, cSOX3,

cCLDN3 e cKIT. Em contraste, as células tronco adultas, que possuem capacidade de auto-renovação e diferenciação, mostraram uma expressão moderada, sustentando uma pluripotência restrita. Nesse tipo celular, cKIT foi o gene mais expresso, seguido dos genes cSALL4, cCLDN3, cLIN28A, cOCT4 e cSOX3, e o gene cNANOG não foi expresso. Os mioblastos, os quais são células precursoras musculares comprometidas com a diferenciação em fibras musculares, apresentaram baixa ou não detectável expressão desses genes, indicando a perda de pluripotência e a especialização funcional. Assim, houve apenas expressão dos genes cSALL4, cSOX3, cKIT e cCLDN3. Outros estudos demonstraram também que as células embrionárias expressaram genes clássicos relacionados à pluripotência, como cOCT4, cNANOG, cSOX3 e cSALL4 (Jean et al., 2015). Em frangos, cOCT4 e cNANOG são críticos para a manutenção da pluripotência e auto-renovação

das células tronco embrionárias (Lavial et al., 2007). Além disso, o gene cSOX3 também pode desempenhar um papel importante na aquisição inicial da pluripotência (Han et al., 2018). Essas variações de expressão nos genes de pluripotência são essenciais para as diferentes capacidades e funções desses tipos celulares. Células tronco pluripotentes têm a capacidade de se diferenciar em qualquer tipo de célula relevante para a produção de carne cultivada, representando uma fonte celular praticamente infinita devido às suas capacidades de auto-renovação. Além disso, técnicas de engenharia genética podem ser utilizadas para melhorar a capacidade de expansão e maturação dessas células, aumentando sua proliferação e eficiência na produção de tecidos específicos, podendo resultar em carne cultivada com melhores características nutricionais e sensoriais (Jara et al., 2023).

CONCLUSÃO

A obtenção das células musculares de frango potencializa a obtenção de carne cultivada em laboratório, podendo apresentar características nutricionais e sensoriais comparáveis à da carne convencional associada a um baixo impacto ambiental. A análise do perfil de expressão gênica relativa dos genes de pluripotência em diferentes tipos de células de frango, como células da blastoderme, células tronco adultas e mioblastos, apresentou um padrão distinto de expressão dos genes, refletindo suas características e potencialidades. Esses genes trabalham em conjunto para manter a pluripotência das células tronco de frango, permitindo a auto-renovação e a capacidade de se diferenciar em diversos tipos celulares. A compreensão e a manipulação desses genes são fundamentais para avanços em biotecnologia avícola, como a produção de carne cultivada em laboratório e a melhoria da eficiência da reprogramação celular.

BIBLIOGRAFIA

BENNY, A. et al. Techniques, challenges and future prospects for cell-based meat. Food

Science and Technology, v. 31, n. 10, p. 1225-1242. GIOTIS, E. S. et al. Chicken embryonic-stem cells are permissive to poxvirus recombinant vaccine vectors. Genes, v. 10, n. 3, p. 237, 2019. HAN, J. Y. et al. Acquisition of pluripotency in the chick embryo occurs during intrauterine embryonic development via a unique transcriptional network.

Journal of Animal Science and Biotechnology, v. 9, n. 31, 2018. JARA, T. C. et al. Stem cell-based strategies and challenges for production of cultivated meat. Nature Food, v. 4, n. 10, p. 841-853, 2023. JEAN, C. et al.

Transcriptome analysis of chicken ES, blastodermal and germ cells reveals that chick ES cells are equivalent to mouse ES cells rather than EpiSC. Stem Cell Research, v. 14, n. 1, p. 54-67, 2015. LAVIAL, F. et al. The Oct4 homologue PouV and Nanog regulate pluripotency in chicken embryonic stem cells.

Development, v. 134, n. 19, p. 3549-3563, 2007. LAVIAL & PAIN. Chicken embryonic stem cells as a non-mammalian embryonic stem cell model. Development, Growth & Differentiation, v. 52, n. 1, p. 101-114, 2010.