



PUBVET, Publicações em Medicina Veterinária e Zootecnia.

Disponível em: <<https://doi.org/10.31533/pubvet.v02n11a442>>.

Perspectivas para a aplicação de células-tronco embrionárias na clínica veterinária

Jader Nones¹ e Stevens Rehen²

¹Médico Veterinário, CRMV-SC nº03608. Estudante de Doutorado do curso de Morfogênese Celular, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Ciências Biomédicas, Centro de Ciências da Saúde, Bloco F, Ilha do Fundão, 21941-590, Rio de Janeiro, Brasil

²Biólogo, Professor Adjunto da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

RESUMO

Células-tronco embrionárias são derivadas da massa celular interna de blastocistos com poucos dias após sua fertilização in vitro. Tais células podem ser cultivadas indefinidamente num estado indiferenciado e são capazes de se transformar em todos os tecidos de um animal adulto. Essas características facilitam sua utilização em estudos sobre o desenvolvimento, testes toxicológicos de novos fármacos e eventualmente no tratamento de patologias humanas e animais. Nesse trabalho iremos descrever as formas de cultivo e diferenciação das células-tronco embrionárias e quais os desafios que precisam ser superados para sua eventual aplicação terapêutica na medicina veterinária e áreas afins.

Palavras-chave: células-tronco embrionárias, animais, perspectivas, desafios

ABSTRACT

Embryonic stem cells are derived from the inner cell mass of blastocysts in early stages of development. These cells can be cultured indefinitely under an undifferentiated state and are able to differentiate into all tissues of an adult animal. Based on these characteristics, embryonic stem cells are essential for developmental studies, screening of new drugs and potentially as novel therapies related to both humans and animals pathologies. In this work we describe how embryonic stem cells are cultured and which goals should be achieved for its application in veterinary medicine.

Key Words: embryonic stem cells, cell therapy, cell culture

1 Introdução

Células-tronco possuem a capacidade de se auto-renovar e produzir descendentes especializados (WATT & HOGAN, 2000). Essas células podem ser classificadas em três tipos de acordo com seu potencial de diferenciação: totipotentes, pluripotentes e multipotentes.

Quando ocorre a junção do espermatozóide com o óvulo *in vitro*, forma-se uma célula denominada zigoto, único representante da condição totipotente. Nesse caso, se implantado no útero, é capaz de gerar um novo animal, bem como todos os anexos embrionários importantes para o seu desenvolvimento.

Células-tronco pluripotentes são geralmente derivadas da massa celular interna de um embrião em estágios iniciais de formação. Essas células têm a capacidade de originar todos os tecidos adultos, porém não dão origem aos anexos embrionários. Por esse motivo são incapazes de dar origem a um animal. São exemplos de células pluripotentes as células-tronco embrionárias e células derivadas de carcinomas embrionários. Recentemente, células derivadas da pele, reprogramadas geneticamente pela utilização de vírus,

também apresentaram características pluripotentes, de forma semelhante às embrionárias (TAKAHASHI et al., 2007; YU et al., 2007).

Por fim, existem as células-tronco multipotentes capazes de originar um número limitado de tipos celulares distintos (GAGE, 2000). Essas células podem ser encontradas desde tecidos fetais até animais adultos, sendo localizadas em regiões como medula óssea, cérebro, intestino, fígado etc.

O estudo das células-tronco embrionárias tem como marco o ano de 1970, quando foram caracterizadas as primeiras células pluripotentes, obtidas a partir de teratocarcinomas formados pelo implante de embriões em testículos de camundongo (SOLTER et al., 1970; STEVENS, 1970).

Com o avanço das pesquisas, foram isoladas as primeiras células-tronco embrionárias (EVANS & KAUFMAN, 1981) obtidas a partir da massa celular interna de um blastocisto pré-implantado de camundongo (Figura 1).

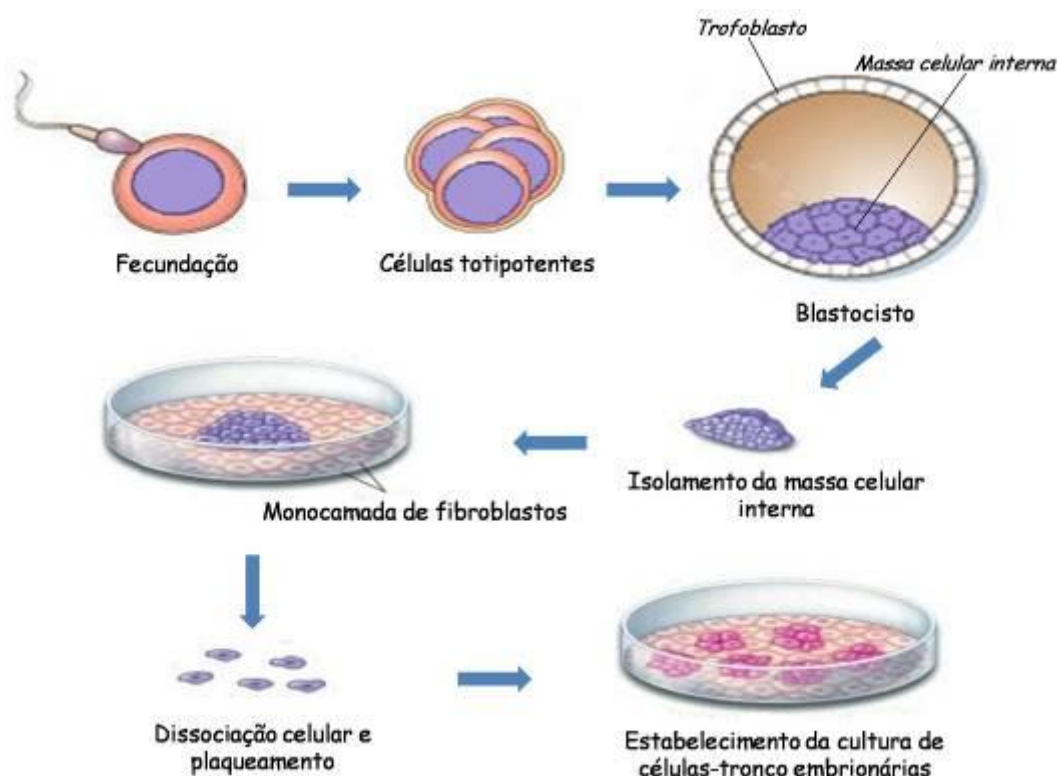


Figura 1: Esquema sobre a obtenção de células-tronco embrionárias a partir da massa celular interna de um blastocisto.

Desde seu isolamento até os dias atuais houve grande avanço nas técnicas de cultivo e manipulação desses tipos celulares. No final da década de 1980, o fator inibidor de leucemia, conhecido pelo acrônimo LIF, foi descrito e desde então tem sido amplamente utilizado para a manutenção das células-tronco embrionárias de camundongos numa condição pluripotente (SMITH & HOOPER, 1987).

Em 1995 foram isoladas as primeiras células-tronco embrionárias de primatas não humanos e três anos depois, as de blastocistos humanos foram obtidas (THOMSON et al., 1998).

Em 2005, foi aprovada a Lei de Biossegurança (n. 11.105/05) que autorizou o uso de células-tronco embrionárias humanas no Brasil sem, entretanto, regulamentar a utilização dessas células, isoladas de outras espécies.

"Art. 5º É permitida, para fins de pesquisa e terapia, a utilização de células-tronco embrionárias obtidas de embriões humanos produzidos por fertilização in vitro e não utilizados no respectivo procedimento, atendidas as seguintes condições:

I – sejam embriões inviáveis; ou

II – sejam embriões congelados há 3 (três) anos ou mais, na data da publicação desta Lei, ou que, já congelados na data da publicação desta Lei, depois de completarem 3 (três) anos, contados a partir da data de congelamento.

1º Em qualquer caso é necessário o consentimento dos genitores.

2º Instituições de pesquisa e serviços de saúde que realizem pesquisa ou terapias com células-tronco embrionárias humanas deverão submeter seus projetos à apreciação e aprovação dos respectivos comitês de ética em pesquisa.

3º É vedada a comercialização do material biológico a que se refere este artigo e sua prática implica o crime tipificado no art. 15º da Lei nº 9.434, de 4 de fevereiro de 1997."

Apesar de sua aprovação pelo Congresso Nacional, a polêmica em torno da pesquisa com células-tronco embrionárias humanas persistiu. Ainda em 2005, o então Procurador Geral da República, Cláudio Fonteles, questionou a constitucionalidade do artigo 5º da Lei de Biossegurança.

Segundo o artigo 5º, é permitida a utilização, em pesquisas científicas, de dois tipos de embriões humanos para a derivação de células-tronco embrionárias: os considerados “inviáveis” e os que estão congelados há mais de três anos. Para Fonteles, este artigo da lei de Biossegurança fere o princípio da “inviolabilidade do direito à vida” da Constituição brasileira, pois embriões serão destruídos e esse ato representaria um atentado à vida humana. O Supremo Tribunal Federal analisou a ação direta de inconstitucionalidade contra o artigo da Lei de Biossegurança que liberou essa linha de pesquisa e, em maio deste ano, aprovou definitivamente o uso de células-tronco embrionárias no Brasil.

2 Desenvolvimento

2.1 Cultivo das células-tronco embrionárias

A preservação das características de células-tronco embrionárias enquanto em cultura é um grande desafio para a comunidade científica. Inúmeros cuidados com sua manipulação experimental são necessários para que se preserve sua pluripotencialidade sem que ocorram alterações genéticas (LONGO et al., 1997).

A adição de fatores capazes de mantê-las indiferenciadas, como é o caso do LIF para células-tronco embrionárias murinas ou o fator de crescimento básico de fibroblastos (FGF-2) para as humanas, além do contato com uma monocamada de células “alimentadoras” são condições essenciais para seu cultivo. Tal monocamada é, na verdade, um conjunto de células aderidas a uma placa de cultivo, as quais formam um tapete que secreta fatores complementares e essenciais às células-tronco embrionárias. Na maioria dos

casos, a monocamada é formada por fibroblastos embrionários de camundongos (Figura 2A). Esses fibroblastos têm seu crescimento impedido por mitomicina C ou através de irradiação. Tal procedimento é realizado para evitar a competição por espaço e nutrientes entre as células da monocamada e as células-tronco embrionárias. Há formas de cultivar-se células-tronco embrionárias sem a monocamada alimentadora. Tal metodologia consiste na utilização de um meio de cultura definido, com fatores em concentrações determinadas o que, entretanto apresenta custo financeiro proibitivo em muitas situações.

As células-tronco embrionárias crescem como colônias. A análise morfológica ao microscópio óptico dessas colônias auxilia na avaliação da qualidade das mesmas. Estas, quando cultivadas corretamente, devem apresentar-se brilhantes, com contornos bem visíveis e definidos (Figura 2B).

Embora as condições básicas de cultivo mantenham a grande maioria das células-tronco embrionárias em um estágio indiferenciado, algumas acabam por diferenciar-se espontaneamente (AMIT & ITSKOVITZ-ELDOR, 2002). Por esse motivo, é necessária a utilização de técnicas capazes de identificar proteínas ou fatores de transcrição, como OCT4, SOX2 e NANOG, considerados clássicos marcadores de células-tronco embrionárias (NICHOLS et al., 1998; AVILION et al., 2003; CHAMBERS et al., 2003; MITSUI et al., 2003) para comprovar a manutenção da pluripotencialidade em cultura (figura 2C).

Quando a monocamada de fibroblastos embrionários e o LIF são retirados do meio de cultivo e as células-tronco embrionárias são transferidas para placas não aderentes, formam-se estruturas esféricas denominadas corpos embrióides. Estas estruturas recapitulam o início do desenvolvimento e dão origem aos três folhetos embrionários primordiais: ectoderma, mesoderma e endoderma (ZHOU et al., 2005) (Figura 2D).

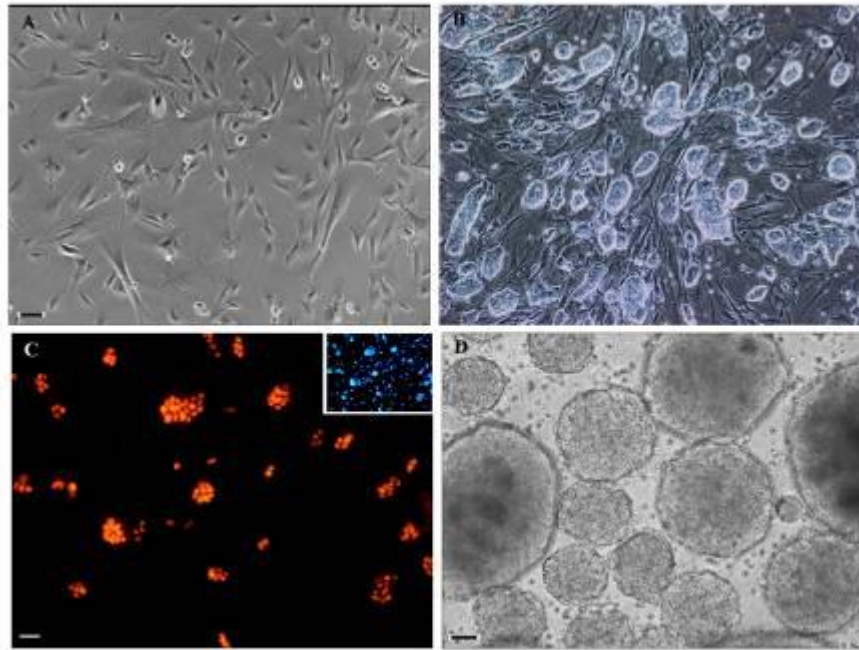


Figura 2: Cultivo de células-tronco embrionárias. A) Monocamada de fibroblastos embrionários murinos. B) Colônias de células-tronco embrionárias cultivadas sobre monocamada de fibroblastos embrionários murinos. Barra de calibração de 50 μm . C) Identificação da proteína OCT4 (clássico marcador de células pluripotentes) por imunocitoquímica. No canto superior direito, núcleos de fibroblastos e colônias de células-tronco embrionárias marcadas com DAPI (marcador nuclear). Barra de calibração corresponde a 30 μm . D) Corpos embrióides, cultivados em suspensão, após dois dias de cultivo. Barra de calibração de 50 μm .

2.2 Perspectivas para a utilização de células-tronco embrionárias

Células-tronco embrionárias, conforme descrito anteriormente, possuem capacidade para se diferenciar em todos os tipos de tecidos presentes no organismo. Essa capacidade gera grandes expectativas sobre sua eventual aplicação clínica, tanto veterinária, quanto humana, uma vez que poderão favorecer o tratamento de diversas doenças, muitas delas consideradas

incuráveis até o momento, incluindo acidentes vasculares cerebrais, lesões medulares, distrofias musculares, doenças hepáticas, renais, auto-imunes, cegueira e câncer (GOYA et al., 2007; JOANNIDES & CHANDRAN, 2008).

Além de seu potencial terapêutico, as células-tronco embrionárias têm grande importância em pesquisa básica (LILLEY et al., 2005) e constituem ferramentas para o estudo da biologia do desenvolvimento celular, identificação de fatores envolvidos na regulação dos processos de diferenciação assim como para testar a eficácia de novas drogas *in vitro* (POUTON & HAYNES, 2005; AHUJA et al., 2007; THOMSON, 2007).

O isolamento de células-tronco embrionárias foi importante para a produção de camundongos transgênicos (REHEN & PAULSEN, 2007) e futuramente, poderão ser utilizadas para a geração de animais capazes de produzir substâncias de alto valor comercial ou relevância para a saúde. Já foram isoladas células-tronco embrionárias provenientes da espécie suína, eqüina, bovina, entre outras. (TECIRLIOGLU & TROUNSON, 2007; SAITO et al., 2005; GJØRRET & MADDOX-HYTTEL, 2005; STROJEK et al., 1990).

Embora o potencial para sua aplicação terapêutica seja grande, ainda não há qualquer tratamento clínico para animais ou humanos utilizando células-tronco embrionárias disponível no momento.

2.3 Desafios

Para se alcançar o potencial pleno de utilização de células-tronco embrionárias, desafios em relação aos protocolos de cultivo, diferenciação e validação de sua eficácia terapêutica em animais de experimentação precisarão ser superados.

Desde o isolamento das primeiras células-tronco embrionárias, monocamadas de fibroblastos murinos foram utilizadas para seu cultivo, independente da espécie animal da qual foram isoladas. Pesquisas recentes sugerem que a forma mais adequada de cultivar células-tronco embrionárias humanas visando sua aplicação terapêutica seja aquela realizada na ausência

da monocamada de fibroblastos de camundongos visto que há risco de rejeição quando células humanas entram em contato com células de camundongos, pois passam a apresentar moléculas murinas em sua superfície. MARTIN e colaboradores (2005) demonstraram que células-tronco embrionárias humanas cultivadas sobre uma monocamada de células murinas são contaminadas por *xeno-carbohydrate N-glycolylneuraminic acid* (Neu5Gc), uma proteína exclusivamente animal. A presença dessa proteína impossibilitaria, por exemplo, o uso dessas células em terapias para seres humanos. Essa descoberta fortalece a hipótese de que será pouco provável que algum tipo de tratamento clínico possa ser realizado com células-tronco embrionárias mantidas em contato com células de outras espécies.

Não há dados na literatura que confirmem se células-tronco embrionárias derivadas de eqüinos, caninos ou bovinos, por exemplo, seriam também comprometidas pelo contato com monocamadas de fibroblastos de camundongos de modo a causar rejeição no caso de uma eventual aplicação em medicina veterinária.

Outra questão importante, que ainda precisa ser melhor estudada diz respeito aos métodos de diferenciação. Já foi descrito, por exemplo, que o ácido retinóico induz a diferenciação de células-tronco embrionárias em fibroblastos, neurônios, células da glia, miócitos, osteoblastos e condrócitos, dependendo do tempo de exposição e da ação conjunta com outros fatores (SOPRANO et al., 2007) (Figura 3). Essa substância, no entanto, causa alta mortalidade celular (OKAZAWA et al., 1996), o que diminui o rendimento na produção dessas células especializadas. Por isso, a prospecção de substâncias que permitam diferenciação celular sem induzir morte celular serão necessárias para que se alcance a produção de células em quantidade suficiente para uma eventual aplicação terapêutica.

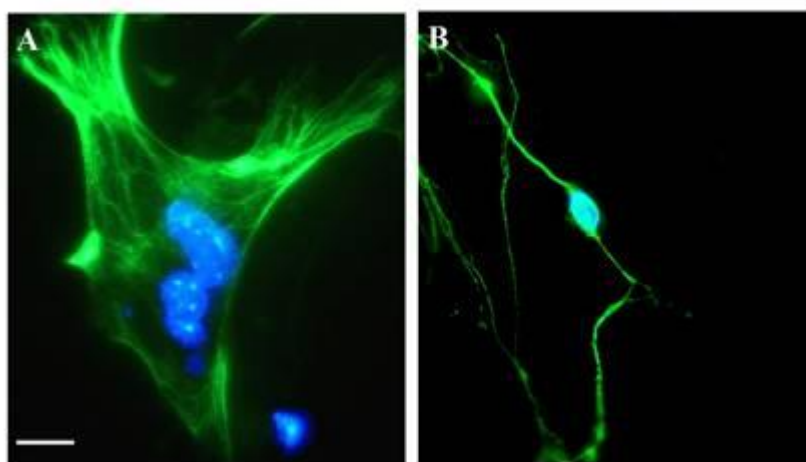


Figura 3: Células-tronco embrionárias diferenciadas. Células-tronco embrionárias cultivadas em suspensão formam corpos embrióides. Estas estruturas, quando tratadas com ácido retinóico sofrem processo de diferenciação. A) Técnica de imunocitoquímica demonstrando células pré-diferenciadas em progenitores neurais, nestina positivas (em verde), com seus núcleos marcados com DAPI (em azul). Estas células poderão dar origem a neurônios, astrócitos ou microglia. B) Técnica de imunocitoquímica demonstrando neurônio marcado pelo anticorpo contra β tubulina III, clássico marcador deste tipo celular. Barra de calibração corresponde a 10 μ m.

Para o estabelecimento de terapias também será preciso que as células transplantadas consigam se integrar aos órgãos ou nos sistemas lesados, tornando-se de fato funcionais. Questões sobre a melhor forma de aplicação dessas células e quanto tempo persistiriam seus hipotéticos efeitos terapêuticos ainda precisam ser respondidas, antes que sua aplicação em medicina veterinária esteja disponível.

3 Conclusões

Cabe mencionar que os estudos com células-tronco adultas não substituem os estudos envolvendo células-tronco embrionárias. Pesquisas com

Nones, J.N. e Rehen, S. Perspectivas para a aplicação de células-tronco embrionárias na clínica veterinária. PUBVET, Londrina, V. 2, N. 45, Art#442, Nov2, 2008.

células derivadas da medula óssea, tecido adiposo, entre outras fontes, não eliminam a importância de se pesquisar células-tronco embrionárias. São células distintas, com potencial e aplicações diferentes, tanto em medicina veterinária quanto para seres humanos.

Estimular as pesquisas sobre células-tronco embrionárias de diferentes espécies poderá acelerar o desenvolvimento de terapias para doenças com grande prevalência em animais, tais como as doenças neurodegenerativas e musculoesqueléticas de gatos, cães e cavalos (TECIRLIOGLU & TROUNSON, 2007).

4 Referências Bibliográficas

AHUJA, Y. R., V. VIJAYALAKSHMI e K. POLASA. Stem cell test: a practical tool in toxicogenomics. Toxicology, v.231, n.1, Feb 28, p.1-10. 2007.

AMIT, M. e J. ITSKOVITZ-ELDOR. Derivation and spontaneous differentiation of human embryonic stem cells. J Anat, v.200, n.Pt 3, p.225-32. 2002.

AVILION, A. A., S. K. NICOLIS, L. H. PEVNY, L. PEREZ, N. VIVIAN e R. LOVELL-BADGE. Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. Genes Dev, v.17, n.1, p.126-40. 2003.

CHAMBERS, I., D. COLBY, M. ROBERTSON, J. NICHOLS, S. LEE, S. TWEEDIE e A. SMITH. Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. Cell, v.113, n.5, p.643-55. 2003.

EVANS, M. J. e M. H. KAUFMAN. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. Nature, v.292, n.5819, p.154-6. 1981.

GAGE, F. H. Mammalian neural stem cells. Science, v.287, n.5457, p.1433-8. 2000.

GJORRET, J. O. e P. MADDOX-HYTTEL. Attempts towards derivation and establishment of bovine embryonic stem cell-like cultures. Reprod Fertil Dev, v.17, n.1-2, p.113-24. 2005.

GOYA, R. L., W. L. KUAN e R. A. BARKER. The future of cell therapies in the treatment of Parkinson's disease. Expert Opin Biol Ther, v.7, n.10, p.1487-98. 2007.

JOANNIDES, A. J. e S. CHANDRAN. Human embryonic stem cells: An experimental and therapeutic resource for neurological disease. J Neurol Sci, v.265, n.1-2, p.84-8. 2008.

LILLEY, C. E., C. T. CARSON, A. R. MUOTRI, F. H. GAGE e M. D. WEITZMAN. DNA repair proteins affect the lifecycle of herpes simplex virus 1. Proc Natl Acad Sci U S A, v.102, n.16, p.5844-9. 2005.

Nones, J.N. e Rehen, S. Perspectivas para a aplicação de células-tronco embrionárias na clínica veterinária. PUBVET, Londrina, V. 2, N. 45, Art#442, Nov2, 2008.

LONGO, L., A. BYGRAVE, F. G. GROSVELD e P. P. PANDOLFI. The chromosome make-up of mouse embryonic stem cells is predictive of somatic and germ cell chimaerism. Transgenic Res, v.6, n.5, p.321-8. 1997.

MARTIN, M. J., A. MUOTRI, F. GAGE e A. VARKI. Human embryonic stem cells express an immunogenic nonhuman sialic acid. Nat Med, v.11, n.2, p.228-32. 2005.

MITSUI, K., Y. TOKUZAWA, H. ITOH, K. SEGAWA, M. MURAKAMI, K. TAKAHASHI, M. MARUYAMA, M. MAEDA e S. YAMANAKA. The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. Cell, v.113, n.5, p.631-42. 2003.

NICHOLS, J., B. ZEVNIK, K. ANASTASSIADIS, H. NIWA, D. KLEWE-NEBENIUS, I. CHAMBERS, H. SCHOLER e A. SMITH. Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. Cell, v.95, n.3, Oct 30, p.379-91. 1998.

OKAZAWA, H., J. SHIMIZU, M. KAMEI, I. IMAFUKU, H. HAMADA e I. KANAZAWA. Bcl-2 inhibits retinoic acid-induced apoptosis during the neural differentiation of embryonal stem cells. J Cell Biol, v.132, n.5, p.955-68. 1996.

POUTON, C. W. e J. M. HAYNES. Pharmaceutical applications of embryonic stem cells. Adv Drug Deliv Rev, v.57, n.13, p.1918-34. 2005.

REHEN, S. K. e B. PAULSEN. Células-tronco: O que são? Para que servem? Rio de Janeiro. Vieira e Lent, 2007. 90p.

SAITO, S., K. YOKOYAMA, T. TAMAGAWA e I. ISHIWATA. Derivation and induction of the differentiation of animal embryonic stem cells as well as human pluripotent stem cells derived from fetal membrane. Hum Cell, v.18, n.3, p.135-41. 2005.

SMITH, A. G. e M. L. HOOPER. Buffalo rat liver cells produce a diffusible activity which inhibits the differentiation of murine embryonal carcinoma and embryonic stem cells. Dev Biol, v.121, n.1, p.1-9. 1987.

STEVENS, L. C. The development of transplantable teratocarcinomas from intratesticular grafts of pre- and postimplantation mouse embryos. Dev Biol, v.21, n.3, p.364-82. 1970.

SOLTER, D., N. SKREB e I. DAMJANOV. Extrauterine growth of mouse egg-cylinders results in malignant teratoma. Nature, v.227, n.5257, p.503-4. 1970.

SOPRANO, D. R., B. W. TEETS e K. J. SOPRANO. Role of retinoic Acid in the differentiation of embryonal carcinoma and embryonic stem cells. Vitam Horm, v.75, p.69-95. 2007.

STROJEK, R. M., M. A. REED, J. L. HOOVER e T. E. WAGNER. A method for cultivating morphologically undifferentiated embryonic stem cells from porcine blastocysts. Theriogenology, v.33, n.4, p.901-13. 1990.

TAKAHASHI K., TANABE, K., OHNUKI, M., NARITA, M., ICHISAKA, T., TOMODA, K. e S. YAMANAKA . Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. Cell, v.131, p.861-872. 2007.

THOMSON, H. Bioprocessing of embryonic stem cells for drug discovery. Trends Biotechnol, v.25, n.5, p.224-30. 2007.

Nones, J.N. e Rehen, S. Perspectivas para a aplicação de células-tronco embrionárias na clínica veterinária. PUBVET, Londrina, V. 2, N. 45, Art#442, Nov2, 2008.

THOMSON, J. A., J. ITSKOVITZ-ELDOR, S. S. SHAPIRO, M. A. WAKNITZ, J. J. SWIERGIEL, V. S. MARSHALL e J. M. JONES. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. Science, v.282, n.5391, p.1145-7. 1998.

TECIRLIOGLU, R. T. e A. O. TROUNSON. Embryonic stem cells in companion animals (horses, dogs and cats): present status and future prospects. Reprod Fertil Dev, v.19, n.6, p.740-7. 2007.

YU J., VODYANIK M. A., SMUGA-OTTO K., ANTOSIEWICZ-BOURGET J., FRANE J. L., TIAN S., NIE J., JONSDOTTIR G. A., RUOTTI V., STEWART R., SLUKVIN I. I. e J. A. THOMSON. Induced of pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. Science. v.318, p.1879-80. 2007.

WATT, F. M. e B. L. HOGAN. Out of Eden: stem cells and their niches. Science, v.287, n.5457, p.1427-30. 2000.

ZHOU, Q. J., J. Z. SHAO, L. X. XIANG, R. Z. HU, Y. L. LU, H. YAO e L. C. DAI. Generation of embryoid bodies from mouse embryonic stem cells cultured on STO feeder cells. Cell Biol Int, v.29, n.9, p.817-25. 2005.