

## CÉLULAS-TRONCO E REPRODUÇÃO ANIMAL: APLICAÇÕES EM POTENCIAL

[Stem cells and animal breeding: Potential Applications]

Lopes, C.T.A.<sup>1,2</sup>, Domingues, S. F. S<sup>2</sup>, Ohashi, O. M.<sup>1</sup>, Miranda, M.S.<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Fecundação *in vitro*, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará – Belém, PA

<sup>2</sup>Laboratório de Biotecnologia e Medicina de Animais Silvestres, Instituto de Medicina Veterinária – Universidade Federal do Pará – Castanhal, PA. \*Autor para correspondência: E-mail: moyses\_m@yahoo.com

O interesse pelas células tronco fascina os cientistas ao redor do mundo há mais de 100 anos, como reportado nos estudos pioneiros (1877) do embriologista alemão Ernst Haeckel que mencionou sobre a formação de organismos completos a partir de poucas células originais (Ramalho-Santos & Willenbring, 2007). Ao longo dos anos, evidências foram sendo geradas de que células tronco presentes em embriões são responsáveis pela formação de todos os tecidos de um indivíduo adulto e que mesmo após sua formação, estes organismos ainda possuem células tronco em seus tecidos que são capazes de se proliferarem promovendo a renovação/reposição celular.

A partir das pesquisas entre as décadas de 1960 e 1980 grandes avanços foram feitos no campo da pesquisa com células tronco quando, trabalhando independentemente, grupos de pesquisadores foram capazes de cultivar *in vitro* pela primeira vez as células tronco de origem adulta (o Russo Friendstein – 1966 – a partir da medula óssea; revisado por (Bianco et al., 2008; Ramalho-Santos & Willenbring, 2007) e as células tronco de origem embrionária (o Inglês Martin Evans – 1981; revisado por (Evans, 2011).

Desde então, células-tronco de origem adultas (CTAs) tem sido consideradas como multipotentes (capazes de gerar pelo menos outros três tipos de células) e tem sido isoladas dos mais variados tipos de tecidos como por exemplo: gordura, polpa dentária, ligamento periodontal, tendões, cordão umbilical, pele, placenta, fluido amniótico, membrana sinovial, musculo, sangue menstrual, etc. (Murray et al., 2014). Já as células-tronco embrionárias (CTEs) tem sido caracterizadas como pluripotentes (capazes de gerar praticamente todos os tecidos embrionários, exceto a placenta e anexos) e já foram isoladas e eficientemente cultivadas a partir de embriões de humanos, hamsters, ovelhas, coelhos, porcos, bovinos, macaco resus, cavalos, cães, búfalos, etc. (Anand et al. 2011).

Recentemente, em 2006, Yamanaka e colaboradores foram mais além e ao invés de isolar células tronco, desenvolveram um método artificial de produção das mesmas mediante a transformação de fibroblastos de camundongos adultos em células tronco pluripotentes pela introdução de quatro genes indutores da reprogramação celular, criando assim as células tronco de pluripotência induzida (*induced pluripotent stem cells* – iPSCs; (Takahashi & Yamanaka, 2006). Que por sua vez já foram estabelecidas em diversas espécies animais e inclusive a humana.

Juntas, as pesquisas com CTAs, CTEs e iPSCs tem levado a um “boom” de artigos de pesquisa relatando o uso destas células para diversas aplicações especialmente dentro da medicina regenerativa. Porém o sucesso relatado na derivação dos mais variados tipos de tecidos a partir dos três principais tipos de células tronco juntamente com o avanço nos estudos sobre a biologia, isolamento e até cultivo *in vitro* de células germinativas primordiais (*primordial germ cells* – PGCs) obtidas de estágios fetais (Magnúsdóttir & Surani, 2014), naturalmente levaram a uma sobreposição de áreas científicas (células tronco e biotecnologia da reprodução) e a abertura de pelo menos uma nova e muito atrativa possibilidade biotecnológica: a derivação de PGCs e gametas a partir de CTAs, CTEs e iPSCs. Levando-se em consideração o enorme interesse na produção *in vitro* de gametas seja para fins conservacionais (animais selvagens), comerciais (animais de produção) ou terapêuticos (reprodução humana) e a limitação do isolamento de PGCs ao no estágio fetal, a perspectiva futura de derivação de gametas e PGCs a partir de células tronco, em especial aquelas que podem ser derivadas a partir de indivíduos adultos (CTAs ou iPSCs) tem levado ao surgimento de diversos estudos.

Iniciando com as ESCs, nos últimos anos diversos estudos tem indicando possibilidades e avanços muito interessantes no sentido da produção “artificial” de gametas. Começando pela produção de células semelhantes a PGCs (PGCs-like) a partir

de ESCs (Hübner et al. 2003); (Toyooka et al. 2003); (Wei et al., 2008; Xuemei et al. 2013) e a partir de 2006 com as iPSCs (Park et al., 2009) diferentes protocolos experimentais tem sido tentados porém com resultados baixos em termos de produção de células PGCs-like. Levando-se em consideração que naturalmente as PGCs derivam de células do epiblasto embrionário, (Hayashi et al., 2011) relataram aumento da eficiência do processo de derivação de células PGCs-like a partir de iPSCs e ESCs mediante um protocolo de duas etapas, sendo a primeira a diferenciação das mesmas em células semelhantes a epiblasto para então promover a diferenciação final em células PGCs-like. Inclusive reportando o nascimento de camundongos gerados a partir destas células PGCs-like que foram agregadas a ovários de fêmeas receptoras (Hayashi et al., 2012), assim como recentemente a indução de espermatogênese foi alcançada em camundongos mediante a transferência de células PGCs-like que foram produzidas em “duas etapas” (Li et al., 2014).

Com relação ao uso de células tronco de origem somática, um dos primeiros estudos explorando esta nova possibilidade biotecnológica foi o de um grupo canadense que detectou uma subpopulação de células-tronco isoladas da pele de fetos suínos, que ao longo do cultivo *in vitro* formaram agregados similares a folículos que secretavam estradiol e progesterona, respondiam à estimulação por gonadotrofina e de onde brotavam grandes células similares a oócitos que expressavam, inclusive, marcadores oocitários como o marcador de zona pelúcida e o marcador de meiose SCP3 que e uma proteína do complexo sinaptonêmico (Dyce et al., 2006). Estudos posteriores do mesmo grupo indicaram que esta subpopulação celular além da morfologia distinta, eram positivas para a atividade da fosfatase alcalina e expressão de mais marcadores de células germinativas como o Oct4, Fragilis, Stella, Dazl e Vasa, assim como demonstraram que mesmo células derivadas de machos, formaram as células PGCs-like e estruturas semelhantes a oócitos (Dyce et al., 2011).

Também em 2006, um trabalho de um grupo alemão relatou a produção de espermatogênese *in vitro* e *in vivo* (esta última somente até estágios pré-meióticos) a partir de células tronco derivadas da medula óssea de camundongos (Nayernia et al., 2006), mediante a utilização do ácido retinóico (forma ativa da vitamina A) que havia estimulado a gametogênese *in vitro* a partir de PGCs naturalmente isoladas (Bowles et al., 2006) e a derivação *in vitro* de gametas masculinos a partir de células tronco da medula óssea foi posteriormente corroborada por outros grupos de pesquisa (Drusenheimer et al., 2007; Hua et al., 2009). Em

função da amplamente reportada facilidade de isolamento e multipotencialidade das células tronco derivadas do tecido adiposo, Song et al. (2011), relataram a produção de células semelhantes a oócitos (com a expressão de marcadores oocitários específicos) a partir da diferenciação destas células que foram extraídas de suínos jovens. Mais recentemente, Hosseinzadeh Shirzeily et al. (2013) geraram células PGCs-like a partir de células tronco da medula óssea e do tecido adiposo de suínos jovens mediante o uso do ácido retinóico e concluíram, baseando-se na expressão de marcadores de PGCs, que as células PGCs-like geradas a partir da medula óssea foram melhores que as geradas a partir do tecido adiposo (neste estudo não foi realizada a produção de gametas).

## CONCLUSÃO

Com o avanço das pesquisas em reprogramação e diferenciação celular, a possibilidade de geração de células PGCs-like e gametas a partir de ESCs, iPSCs ou ASCs vem se tornando cada vez mais realística. Muitos desafios ainda precisam ser vencidos em especial com relação a funcionalidade do processo, em especial a ocorrência adequada da meiose (Sun et al., 2014), porém a evidente e excitante aplicabilidade na medicina regenerativa e na solução de problemas de infertilidade femininos e masculinos compele muitos grupos de cientistas nessa direção. Além do que, vale muito a pena ressaltar, a inquestionável possibilidade da utilização também em espécies animais, as quais muitas vezes são apenas utilizadas como modelo experimental.

Em um futuro próximo, por exemplo, entre as estratégias biotecnológicas de conservação de animais selvagens poderá existir a de formação de bancos de células pluripotentes ou multipotentes que podem ser utilizadas para a produção artificial de gametas destas espécies ameaçadas, assim como, no caso de animais de produção, a multiplicação de indivíduos de alto mérito zootécnico pode ser substancialmente acelerada se a produção dos gametas (geneticamente modificados ou não – transgenia animal) destes animais poderá ser realizada em larga escala dentro laboratório.

## REFERÊNCIAS

- Anand, T. et al., 2011. Buffalo (*Bubalus bubalis*) Embryonic Stem Cell-Like Cells and Preimplantation Embryos Exhibit Comparable Expression of Pluripotency-Related Antigens. *Reproduction in Domestic Animals*, 46(1), pp.50–58.
- Bianco, P., Robey, P.G. & Simmons, P.J., 2008. Mesenchymal Stem Cells: Revisiting History, Concepts, and Assays. *Cell stem cell*.

- Bowles, J. et al., 2006. Retinoid Signaling Determines Germ Cell Fate in Mice. *Science*, 312(5773), pp.596–600.
- Drusenheimer, N. et al., 2007. Putative human male germ cells from bone marrow stem cells. *Society of Reproduction and Fertility supplement*, 63, pp.69–76.
- Dyce, P.W. et al., 2011. Analysis of Oocyte-Like Cells Differentiated from Porcine Fetal Skin-Derived Stem Cells. *dx.doi.org*, 20(5), pp.809–819.
- Dyce, P.W., Wen, L. & Li, J., 2006. In vitro germline potential of stem cells derived from fetal porcine skin. *Nature cell biology*, 8(4), pp.384–390.
- Evans, M., 2011. Discovering pluripotency: 30 years of mouse embryonic stem cells. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 12(10), pp.680–686.
- Hayashi, K. et al., 2012. Offspring from Oocytes Derived from in Vitro Primordial Germ Cell-like Cells in Mice. *Science*, 338(6109), pp.971–975.
- Hayashi, K. et al., 2011. Reconstitution of the mouse germ cell specification pathway in culture by pluripotent stem cells. *cell*, 146(4), pp.519–532.
- Hosseinzadeh Shirzeily, M. et al., 2013. Comparison of differentiation potential of male mouse adipose tissue and bone marrow derived-mesenchymal stem cells into germ cells. *Iranian Journal of Reproductive Medicine*, 11(12), pp.965–976.
- Hua, J. et al., 2009. Derivation of male germ cell-like lineage from human fetal bone marrow stem cells. *Reproductive biomedicine online*, 19(1), pp.99–105.
- Hübner, K. et al., 2003. Derivation of oocytes from mouse embryonic stem cells. *Science*.
- Li, Y. et al., 2014. Generation of male germ cells from mouse induced pluripotent stem cells in vitro. *Stem cell research*, 12(2), pp.517–530.
- Magnúsdóttir, E. & Surani, M.A., 2014. How to make a primordial germ cell. *Development*, 141(2), pp.245–252.
- Murray, I.R. et al., 2014. Natural history of mesenchymal stem cells, from vessel walls to culture vessels. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 71(8), pp.1353–1374.
- Nayernia, K. et al., 2006. Derivation of male germ cells from bone marrow stem cells. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 86(7), pp.654–663.
- Park, T.S. et al., 2009. Derivation of Primordial Germ Cells from Human Embryonic and Induced Pluripotent Stem Cells Is Significantly Improved by Coculture with Human Fetal Gonadal Cells. *STEM CELLS*, 27(4), pp.783–795.
- Ramalho-Santos, M. & Willenbring, H., 2007. On the origin of the term "stem cell". *Cell stem cell*, 1(1), pp.35–38.
- Song, S.-H. et al., 2011. Characterization of porcine multipotent stem/stromal cells derived from skin, adipose, and ovarian tissues and their differentiation in vitro into putative oocyte-like cells. *Stem cells and development*, 20(8), pp.1359–1370.
- Sun, Y.-C. et al., 2014. Reconstitution of Gametogenesis In Vitro: Meiosis Is the Biggest Obstacle. *Journal of genetics and genomics = Yi chuan xue bao*, 41(3), pp.87–95.
- Takahashi, K. & Yamanaka, S., 2006. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*.
- Toyooka, Y. et al., 2003. Embryonic stem cells can form germ cells in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(20), pp.11457–11462.
- Wei, W. et al., 2008. Primordial Germ Cell Specification from Embryonic Stem Cells. *PLoS One*, 3(12), p.e4013.
- Xuemei, L. et al., 2013. Retinoic acid improve germ cell differentiation from human embryonic stem cells. *Iranian Journal of Reproductive Medicine*, 11(11), pp.905–912.