

CONSIDERAÇÕES SOBRE CÉLULAS-TRONCO EMBRIONÁRIAS

Aline Silva Rocha¹
Leandro Maia²
Mydian Daroz Guastali¹
Rodrigo Volpato³
Fernanda da Cruz Landim e Alvarenga⁴

RESUMO

As células-tronco embrionárias são células pluripotentes obtidas da massa celular interna do blastocisto. Em razão de sua grande plasticidade, muitos estudos vêm sendo realizados com o objetivo de avaliar o potencial terapêutico deste tipo celular e os resultados têm sido bastante promissores. Neste sentido, o objetivo desta revisão é abordar aspectos relacionados ao isolamento, cultivo, caracterização e aplicação terapêutica das células-tronco embrionárias de mamíferos.

Palavras-chave: células-tronco embrionárias, blastocisto, terapia celular.

CONSIDERATIONS OF EMBRYONIC STEM CELLS

ABSTRACT

The embryonic stem cells are pluripotent lines derived from inner cell mass of developing blastocysts. Because of its great plasticity, many studies have been done to evaluate the therapeutic potential of the stem cells, and have shown very promising results. The present study has the focus to do a literature review about the isolation, cultivate, characterization and therapeutic application of mammals embryonic stem cells.

Keywords: embryonic stem cells, blastocyst, cellular therapy

CONSIDERACIONES DE LAS CÉLULAS MADRE EMBRIONARIAS

RESUMEN

Las células madre embrionarias son células pluripotenciales derivadas de la masa celular interna del blastocito. Debido a su gran plasticidad, muchos estudios se han realizado para evaluar el potencial terapéutico de este tipo de células y los resultados son prometedores. En este sentido, el propósito de esta revisión es para tratar temas relacionados con el aislamiento, cultivo, caracterización y aplicación terapéutica de las células madre embrionarias de los mamíferos.

Palabras clave: células madre embrionarias, blastocito, terapia celular

¹ Mestranda do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP/Botucatu.

Distrito de Rubião Junior s/n, Depto de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP, CEP: 18618-000. Botucatu/SP. Fone/Fax: (014) 3811-6249. aline-srocha@hotmail.com

² Doutorando do Departamento de Clínica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP/Botucatu

³ Doutorando do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP/Botucatu

⁴ Docente do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP/Botucatu

INTRODUÇÃO

As células-tronco embrionárias (CTE) são derivadas da massa celular interna do blastocisto e podem ser expandidas em cultura sem que ocorra perda da potencialidade e da capacidade de autorrenovação, desde que sejam utilizados fatores que impeçam sua diferenciação. Estas células podem, ainda, se diferenciar em diversos tipos celulares de acordo com as condições de cultivo. Em ausência de fatores tróficos, as CTE podem se diferenciar em todos os tipos de tecidos, inclusive em células germinativas, de forma espontânea. Diversos tipos celulares são obtidos dessas culturas, incluindo cardiomiócitos, condrócitos, adipócitos, células endoteliais, osteócitos, neurônios, astrócitos, oligodendrócitos, epitélio alveolar, hepatócitos e ilhotas pancreáticas (1, 2).

Os estudos desenvolvidos a partir das células-tronco têm favorecido um enorme progresso na medicina regenerativa, que consiste na utilização de células, fatores de proliferação e diferenciação celulares e biomateriais que permitem ao próprio organismo reparar tecidos e órgãos lesionados (3).

As CTE têm potencial para serem aplicadas em uma ampla variedade de enfermidades e também podem ser a melhor fonte de tecido humano para o teste de novas drogas *in vitro* (4). Entretanto, os métodos de diferenciação empregados até o momento não produzem populações com 100% de pureza em termos de maturação. Este fato prejudica a utilização clínica dessas células, visto que células indiferenciadas ou comprometidas com mais de uma linhagem celular podem levar a formação de teratomas (tumores embrionários). Outro obstáculo é representado pela imunorreatividade dessas células, que podem ser rejeitadas pelo hospedeiro, necessitando da utilização de terapias imunossupressoras concomitantes (1, 2, 5).

O objetivo desta revisão é abordar aspectos relacionados ao isolamento, cultivo, caracterização e aplicação terapêutica das células-tronco embrionárias em mamíferos.

REVISÃO DE LITERATURA

1. CONCEITO DE CÉLULAS-TRONCO (CT)

As CT são células indiferenciadas que apresentam como características: capacidade de proliferação ilimitada, autorrenovação, produção de diferentes linhagens celulares e regeneração de tecidos (3).

A proliferação das CT ocorre por meio de mitoses sendo responsável por garantir um número adequado de células-tronco em determinado local do organismo, em um momento específico de seu desenvolvimento (3).

A autorrenovação é o processo pelo qual as CT geram cópias idênticas de si mesmas por meio de sucessivas mitoses, o que significa que o organismo mantém um “estoque” permanente deste tipo celular (6).

A diferenciação é a capacidade que as CT apresentam de gerar tipos celulares distintos. Não se sabe exatamente como isso ocorre, mas é possível afirmar que o processo de diferenciação é regulado pela expressão preferencial de genes específicos nas CT (6).

A regeneração de tecidos ocorre quando as CT presentes em diversos locais do organismo recebem sinais específicos para se dividirem e reporem as células perdidas se houver lesão tecidual.

Em virtude dessas propriedades peculiares das CT, muitos cientistas buscam a possibilidade de encontrar a cura para diversas enfermidades por meio da substituição dos tecidos danificados por grupos de CT (7).

2. CLASSIFICAÇÕES DAS CÉLULAS-TRONCO

De acordo com a potencialidade, ou seja, a capacidade de uma célula originar novos tipos celulares, as CT podem ser classificadas conforme descrito abaixo:

⇒ **Totipotentes:** capazes de gerar todos os tipos celulares embrionários e extraembrionários. Ex: zigoto, células embrionárias na fase de mórula (8).

⇒ **Pluripotentes:** capacidade de diferenciação em células pertencentes aos três folhetos embrionários: ectoderma, mesoderma e endoderma, assim como as células germinativas primordiais (CGP). Ex: células embrionárias derivadas da massa interna do blastocisto (8).

⇒ **Multipotentes:** diferenciação limitada a determinados tipos celulares. Ex: células em estágio posterior ao desenvolvimento fetal e que persistem após o nascimento (9).

⇒ **Unipotentes:** capacidade de gerar um único tipo de tecido. Ex: células da camada germinativa da epiderme, eritroblastos, espermatogônias dos testículos (9).

Por outro lado, as CT também podem ser classificadas de acordo com a origem:

⇒ **Embrionárias:** obtidas nos estágios iniciais do desenvolvimento embrionário, a partir da massa interna do blastocisto (10).

⇒ **Adultas:** isoladas de órgãos e tecidos diferenciados, como: medula óssea, sangue (periférico ou de cordão umbilical), retina, córnea, cérebro, músculos esqueléticos, polpa dental, fígado, pele, tecido adiposo, epitélio gastrointestinal e pâncreas (11).

3. CÉLULAS-TRONCO EMBRIONÁRIAS (CTE)

3.1. DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO

Após a penetração do espermatozóide, o óvulo fecundado adquire a condição de zigoto. Durante o trajeto pelo corno uterino, o zigoto sofre sucessivas mitoses resultando em um rápido aumento de suas células, as quais são denominadas blastômeros. Estes continuam a divisão celular formando uma esfera compacta denominada mórula. Neste estágio, os líquidos da cavidade uterina penetram nos espaços entre os blastômeros e duas populações celulares são distinguidas: a massa celular externa (trofoblasto) e a massa celular interna (embrioblasto). Com o aumento do líquido, os espaços se fundem originando uma única cavidade conhecida como blastocele. A partir daí, o conceito passa a ser chamado de blastocisto (12).

As CTE encontram-se na massa celular interna (MCI) do blastocisto e dão origem a todos os tipos celulares, sistemas, tecidos e órgãos do indivíduo em formação. Já as células da massa celular externa (MCE) originam os anexos embrionários (12).

3.2. CARACTERÍSTICAS DAS CÉLULAS-TRONCO EMBRIONÁRIAS

As CTE têm como principal característica a pluripotência. Isso significa que elas possuem a capacidade de originar qualquer tipo celular do organismo, podendo ser induzidas a iniciar um programa de diferenciação *in vitro* sem perder a pluripotência e a capacidade de autorrenovação, simulando o desenvolvimento normal de um embrião pré-implantado (10, 13, 14).

Em 1981, foram realizados os primeiros cultivos de CT a partir de embriões de camundongos e, desde então, novos cultivos foram conduzidos em ratos, humanos e, mais recentemente, em equinos (15-18).

As análises morfológicas, imunoistoquímicas e moleculares permitem identificar uma grande variedade de linhagens embrionárias na massa celular diferenciada, incluindo as hematopoiéticas, as neuronais, as endoteliais, as cardíacas e as musculares. Desta maneira, as CTE são utilizadas como modelo de desenvolvimento embrionário precoce *in vitro*, o que as

tornam um poderoso instrumento de pesquisa para o estudo dos mecanismos de diferenciação celular e dos efeitos de substâncias tóxicas e biologicamente ativas no desenvolvimento embrionário (15). Por outro lado, o perfil genético das CTE apresenta dados controversos. Apesar de muitos genes terem sido identificados, ainda não há um consenso entre a comunidade científica.

Publicações de diferentes grupos demonstraram que, em uma mesma espécie, linhagens diferentes apresentavam alto grau de heterogeneidade quanto a sua capacidade de diferenciação e expressão gênica, levando a diferentes respostas quando submetidas aos mesmos tratamentos (19, 20). No entanto, de maneira geral, as células pluripotentes apresentam algumas características que indicam tratar-se de uma célula indiferenciada, como: a atividade de fosfatase alcalina, presença do fator de transcrição Oct-4, alta atividade da telomerase e uma variedade de marcadores celulares reconhecidos por anticorpos monoclonais nos antígenos estágio-específicos embrionários (21). As CTE requerem adesão a uma matriz celular ou extracelular para sobrevivência e crescimento (22).

3.3. ISOLAMENTO E CULTIVO DAS CTE

As células da MCI do blastocisto podem ser isoladas por meio de microcirurgia ou imunocirurgia e transferidas em placas de cultivo previamente preparadas com monocamada de fibroblastos inativados. Tal monocamada de fibroblastos visa o crescimento e sobrevivência das CTE, pois essas requerem adesão a uma matriz celular ou extracelular (22-24).

Geralmente, as CTE são cocultivadas com fibroblastos mitoticamente inativos (Fig.1), mas, metabolicamente ativos, permitindo a síntese estável de receptores e citocinas necessários ao crescimento das CTE. Para esse fim, são utilizadas a inativação química por meio de Mitomicina C ou a inativação por irradiação gama, que inibem a replicação do DNA (25).

A Mitomicina C é um agente quimioterápico que evita a separação da dupla fita de DNA durante a replicação celular por formar ligações covalentes entre as fitas opostas, enquanto a síntese de RNA e de proteínas continua. É capaz de bloquear o ciclo celular em G1, S e G2 enquanto as células permanecem viáveis (26). Já a irradiação gama quebra as fitas de DNA impedindo a duplicação do material genético (27).

Essa camada de fibroblastos inativos contribui com vários fatores essenciais para a manutenção da autorrenovação das CTE, entretanto, a identidade bioquímica desses é desconhecida. Acredita-se que seja um conjunto de fatores de crescimento, moléculas de superfície celular, matriz extracelular e neutralizantes de produtos tóxicos e metabólitos produzidos pelas CTE (28). Por outro lado, pesquisadores identificaram o LIF (Fator inibidor de leucemia) como sendo um fator liberado por fibroblastos embrionários murinos (29).

Fibroblastos secretam promotores da manutenção do estado indiferenciado como o fator de crescimento fibroblástico (FGF), fator de crescimento transformante β (TGF β), activinas, proteínas WNT e antagonistas da sinalização de proteínas morfogenéticas ósseas (BMP).

No cultivo de CTE humanas, a monocamada de fibroblastos murinos pode ser substituída por células do parênquima da glândula mamária, fibroblastos fetais, células endometriais uterinas, células musculares fetais e epiderme adulta de humanos (29).

O LIF atua em um receptor específico que ativa o transdutor de sinal gp130, o qual atua em duas vias de sinalização intracelular: JAK-STAT e Shp-Erk2 (30). A ativação do fator de transcrição STAT3 é suficiente para a manutenção da pluripotência em relação à via Shp-Erk2. A ativação de STAT3 é essencial para a manutenção da pluripotência, mesmo sem a presença de LIF (31, 32).

As CTE de camundongos podem ser mantidas indiferenciadas quando cultivadas em meio de cultivo com adição do LIF (Fig.2). O efeito do LIF consiste em ativar o fator STAT3

indispensável para a continuação da multiplicação de células indiferenciadas. Possivelmente, os fatores de transcrição Oct-4 e STAT3 interagem afetando a função dos mesmos genes (33, 34).

Estudos preliminares demonstraram que células da MCI de blastocistos bovinos apresentam receptores para LIF. No entanto, a presença da LIF não auxiliou no estabelecimento e manutenção de CTE em outros ungulados (35). De fato, existe um efeito deletério da adição de LIF ao cultivo de CTE em bovinos. Da mesma maneira, outros fatores de crescimento que suprimem a diferenciação de CTE murinas, como o bFGF, EGF e IGFs, não são capazes de inibir a diferenciação de CTE de suíno. Acredita-se que o bFGF atua na fosforilação da tirosina de várias proteínas e ativação da sinalização extracelular das kinases ERK1/2 (36).

Porém, a remoção dos fibroblastos e de LIF e seu cultivo em suspensão podem induzi-las a entrar em um programa de diferenciação *in vitro* de forma sincronizada. Nestas condições, as CTE formam espontaneamente agregados de células diferenciadas chamados “corpos embrióides” (EB=embryoid bodies), simulando o desenvolvimento de um embrião pré-implantado. Nos primeiros dois a quatro dias de cultura em suspensão, observa-se a formação de endoderma na superfície dos agregados de CTE. Após mais alguns dias em cultura, forma-se uma cavidade cística, células do endoderma e ectoderma se desenvolvem e, a seguir, uma série de linhagens embrionárias podem ser caracterizadas, incluindo linhagens hematopoiética, neuronal, endotelial, cardíaca e muscular (37).

Assim, a diferenciação de CTE em cultura em suspensão representa um modelo *in vitro* poderoso para o estudo da determinação das linhagens embrionárias durante o desenvolvimento mamífero. O potencial pluripotente pode ser avaliado *in vitro* pela indução da diferenciação celular. Um método simples de se verificar a diferenciação espontânea é o cultivo por um período superior a sete dias sem que as células sejam replicadas (38). No entanto, a melhor maneira de caracterizar a pluripotência de CTE é a indução de sua diferenciação para linhagens celulares com origem ectodermal, mesodermal e endodermal (39).

Estratégias diferentes têm sido utilizadas para indução da diferenciação *in vitro* das CTE. As CTE se diferenciam espontaneamente em células derivadas das 3 camadas embrionárias: endoderme, mesoderme e ectoderme pela formação dos corpos embrióides. A maior parte dos métodos para diferenciação das CTE utiliza o plaqueamento dos corpos embrióides em placas cobertas de gelatina, na ausência de monocamada de suporte e suplementação com fatores de crescimento e/ou fatores indutores de diferenciação.

É importante ressaltar que a habilidade dos pesquisadores em manipular de maneira eficiente as CTE para diferenciação em células específicas, permitirá a criação de uma fonte ilimitada de células que poderão ser usadas não apenas para o crescimento de tecidos implantáveis, mas também para testar novas drogas para cura de enfermidades e identificar genes com potencial problemático (2, 40, 41).

3.4. MARCADORES DE PLURIPOTÊNCIA DAS CTE

De maneira geral, as células pluripotentes apresentam algumas características que indicam tratar-se de uma célula indiferenciada, como: atividade de fosfatase alcalina, presença do fator de transcrição Oct-4, alta atividade da telomerase e uma variedade de marcadores celulares reconhecidos por anticorpos monoclonais nos antígenos estágio-específicos embrionários (21).

Em embriões de ratos, a pluripotência é mantida primariamente pelos seguintes genes: POU5F1 (denominado de Oct-4), Sox-2 e Nanog. Esses genes são ativados por fatores de transcrição próprios que também se ligam a genes responsáveis em codificar componentes que irão inibir vias essenciais para o desenvolvimento. A expressão de Oct-4 é considerada

um marco fundamental para a identificação de células pluripotentes de rato. O Oct-4 é expresso em células pluripotentes durante as clivagens, na massa celular interna, no epiblasto em início da fase pós-implantação do embrião e em células-tronco embrionárias em cultivo (42, 43).

Apesar de o gene Oct-4 ser necessário para manutenção da pluripotência de CTE em ratos, o mesmo padrão não é apresentado em outras espécies. Genes ortólogos de Oct-4 com alta homologia de sequência, assim como regiões reguladas pela proteína, foram identificadas em várias espécies de mamíferos (44). No entanto, blastocistos humanos em diferentes estágios apresentam diferentes níveis de expressão do Oct-4. Além disso, diferentes laboratórios demonstraram que a proteína Oct-4 é expressa tanto pela MCI como pelo trofotoderma em embriões de ungulados (35).

Por meio da imunistoquímica, a expressão do Oct-4 foi estudada em blastocistos produzidos *in vitro* e *in vivo* nas espécies murina, suína e bovina. Em camundongos, a expressão do Oct-4 foi restrita à MCI, enquanto em suínos (7 dias após a fertilização) e bovinos (8 dias após a fertilização), sua expressão foi observada tanto na MCI quanto no trofotoderma, não havendo diferenças entre embriões produzidos *in vitro* e *in vivo*. Esses dados corroboram com a literatura, segundo os quais, houve expressão de Oct-4 na MCI e trofotoderma de blastocistos caprinos produzidos *in vivo*. Concluiu-se, portanto, que existe marcada diferença na regulação do Oct-4 entre camundongos e animais domésticos (45, 46).

Por outro lado, o Nanog parece ser um bom candidato a marcador de pluripotência em ruminantes, pois estudos detectaram o mRNA para o Nanog e a proteína na MCI de embriões de caprinos, sendo que estes estavam fortemente reprimidos no trofotoderma (47). O gene Nanog também tem se mostrado muito importante, pois a ausência de sua transcrição induz a diferenciação celular para linhagens de endoderme extraembrionária, enquanto uma expressão 50 a 60% menor induz a geração de vários tipos de tecidos, ativando genes da endoderme, mesoderme e ectoderme (48). Sua hiperexpressão permite o crescimento em sistemas livres do cocultivo e melhora a eficiência na produção de células clones (49).

O Sox-2 é um fator de transcrição que é essencial para a manutenção de autorrenovação das células do embrião indiferenciado e de células estaminais. Este gene codifica um membro da família de fatores de transcrição envolvidos na regulação do desenvolvimento embrionário e na determinação do destino da célula. A proteína transcricional codificada pode atuar como um ativador após formar um complexo proteico com outras proteínas. O Sox-2 é um dos principais fatores de transcrição exigido em células-tronco com pluripotência induzida. Um grupo de pesquisadores concluiu que o principal papel do Sox-2 em células-tronco pluripotentes é controlar a expressão de Oct-4, sendo que estes genes perpetuam a sua própria expressão, quando expressos espontaneamente (50).

As CTE da espécie equina apresentam marcadores em sua superfície celular como antígeno estágio específico 1 (SSEA-1), além de serem caracterizadas por expressar o fator de transcrição STAT3 e o Oct-4. Esse padrão de expressão difere do encontrado em camundongos e humanos que, por sua vez, também diferem entre si. O gene Oct-4 é considerado essencial na formação da MCI, pluripotência e renovação celular nas três espécies citadas (51).

Apesar de compartilharem similaridades quanto à morfologia e alguns marcadores de superfície celular e de expressão gênica, as CTE possuem características únicas em cada espécie. As CTE murinas apresentam colônias espessas com células sobrepostas e com bordas não definidas, enquanto as células embrionárias humanas e equinas formam colônias de espessura fina e com bordas bem definidas (17).

A morfologia das células, assim como sua capacidade de formar corpos embrióides quando em cultivo, tem sido utilizada como critério para definir linhagens de CTE. Em bovinos, as CTE devem apresentar tamanho pequeno, aspecto arredondado e alto índice núcleo:citoplasma (52). Esta classificação é particularmente importante, pois, com frequência,

ocorre a contaminação do cultivo por células do trofotoderma, bem como por células do endoderma visceral (hipoblasto). Sendo assim, a caracterização de linhagens de CTE de ungulados deve ser acompanhada pela expressão de marcadores específicos para os tipos celulares contaminantes do cultivo, ou seja, transferrina ou α -fetoproteína para detecção de células da endoderme; interferon-tau para detecção de células do trofotoderma de bovinos; citoqueratina para detecção de células da ectoderme, incluindo o trofoblasto. A propagação continuada de linhagens de CTE inapropriadamente caracterizadas pode induzir os pesquisadores ao erro e, dessa forma, prejudicar a descoberta de condições de cultivo mais adequadas ao cultivo de verdadeiras CTE (35).

Como os marcadores convencionais de pluripotência têm se demonstrado inespecíficos em outros ungulados, é importante a utilização de outros métodos que confirmem a origem embrionária das células em cultivo (52).

A pluripotência das CTE pode ser avaliada pela administração intraperitoneal ou subcutânea dessas células indiferenciadas em camundongos imunossuprimidos (*SCID mice*) resultando na formação de teratomas. Em suínos, teratomas foram pouco observados (53, 54).

3.5. APLICAÇÃO TERAPÊUTICA

O princípio da terapia celular consiste em restaurar a função de um órgão ou tecido com a substituição das células perdidas por uma enfermidade ou substituir células que não funcionam adequadamente devido a um defeito genético, vascular ou iatrogênico (3).

A aplicação das CT na reconstituição de tecidos não reparáveis cresce de forma marcante. Enfermidades dos sistemas hematológico (leucemias, linfomas), nervoso (acidente vascular cerebral, esclerose múltipla, traumatismo raquimedular) e cardiovascular (infarto do miocárdio, insuficiência cardíaca) são alvos naturais de interesse (55).

Recentemente, testaram a aplicação de CTE e CTM (células-tronco mesenquimais) para tratamento de tendinite no tendão do músculo flexor digital superficial de equinos. Os resultados revelaram que as CTE apresentaram taxa de sobrevida maior que as CTM, sendo encontradas em todas as áreas de injúria tecidual, diferentemente das CTM, que apenas se mantiveram no local onde foram injetadas. Ainda, durante os 90 dias de realização do experimento, as CTE não induziram resposta imune ou formação de tumores no local de aplicação (56).

As CTE apresentam evidente potencial de aplicação em diversas áreas da medicina, uma vez que são capazes de originar todas as células de um indivíduo adulto. Porém, por questões éticas e de biossegurança, o uso das CTE para fins terapêuticos ainda encontra-se limitado (55).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os estudos sobre CTE têm gerado grandes expectativas na área da saúde. Entretanto, considerações de ordem ética, religiosa, moral, legal e econômica são inevitáveis e geram uma grande polêmica no que diz respeito à obtenção dessas células.

O desenvolvimento biotecnológico alcançado poderá permitir que muitas enfermidades consideradas incuráveis até a ocasião, possam ser tratadas com as células-tronco embrionárias permitindo uma perspectiva de vida melhor para muitos pacientes. Porém, os resultados ainda são preliminares tornando-se necessária muita cautela na execução e divulgação de novos resultados, particularmente, para fins terapêuticos.

REFERÊNCIAS

1. Araújo JD, Araújo Filho JD, Ciorlin E, Ruiz M, Ruiz LP, Greco OT, et al. A terapia celular no tratamento da isquemia crítica dos membros inferiores. *J Vasc Bras*. 2005;4:357-65.
2. National Institutes of Health. Stem cells: a primer. Bethesda, Maryland; 2011 [cited 2011 Nov 15]. Available from: <http://www.travisroyfoundation.org/pages/PDF/NIH-stemcells.pdf>.
3. Oliveira GK. Células-tronco mononucleares autólogas na cicatrização de defeitos tibiais agudos experimentais de cão [dissertação]. Santa Maria: Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria; 2008.
4. Schwindt TT, Barnabé GF, Mello L. Proliferar ou diferenciar? Perspectivas de destino das células-tronco. *J Bras Neurocir*. 2005;16:13-9.
5. Bydlowski SP, Debes AA, Duarte AS, Janz FL, Cavaglieri RC, Maselli LMF. Células-tronco do líquido amniótico. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2009;31:45-52.
6. Braga FHP, Bonomo A. Células-tronco e câncer: vida e morte com uma origem comum? Campinas; 2011 [acesso em 2011 Nov 22]. Disponível em: <http://www.comciencia.br/reportagens/celulas/13.html>.
7. Souza MH, Elias DO. As células-tronco e o seu potencial na reparação de órgãos e tecidos. In: Manual de instrução programada: princípios de hematologia e hemoterapia. 2ª ed. 2005 [acesso em 2011 Nov 20]. Disponível em: <http://perflin.com/cear/artigos /stem.pdf>.
8. Benjamin ER, Martin FP, Chui-Yee F, Bongso A. Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro. *Nat Biotechnol*. 2000;18:399-404.
9. Fibbe WE. Mesenchymal stem cells. A potential source for skeletal repair. *Ann Rheum Dis*. 2002;61:29-31.
10. Riveros DM, Chagoyán JCV, Morales RA, Juárez MC. Células madre y células troncoembrionarias: diferencias biológicas. *Vet Mex*. 2007;38:477-501.
11. Gomes D. Células-tronco embrionárias: implicações bioéticas e jurídicas. *Bioethikos*. 2007;1:78-87.
12. Ramírez PH, Balea ED. Medicina regenerativa. Células madre embrionarias y adultas. *Rev Cuba Hematol*. 2004;20:1-17.
13. Stocum DL. Stem cells in regenerative biology and medicine. *Wound Repair Regen*. 2001;9:429-42.
14. Keller GM. In vitro differentiation of embryonic stem cells. *Curr Opin Cell Biol*. 1995;7:862-9.
15. Pereira LV. A importância do uso das células-tronco para a saúde pública. *Cienc Saude Coletiva*. 2008;13:7-14.

16. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*. 1998;282:1145-7.
17. Li X, Zhou SG, Imreh MP, Allen WR. Horse embryonic stem cell lines from the proliferation of inner cell mass cells. *Stem Cells Dev*. 2006;15:523-53.
18. Taylor SE, Smith RKW, Clegg PD. Mesenchymal stem cell therapy in equine musculoskeletal disease: scientific fact or clinical fiction? *Equine Vet J*. 2007;39:172-80.
19. Hoffman LM, Carpenter MK. Characterization and culture of human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol*. 2005;23:699-708.
20. Allegrucci C, Young LE. Differences between human embryonic stem cell lines. *Hum Reprod Update*. 2007;13:103-20.
21. Donovan JP, Gearhart J. The end of the beginning for pluripotent stem cells. *Nature*. 2001;414:399-405.
22. Nieto A, Cabrera CM, Catalina P, Cobo F, Barnie A, Cortés JL, et al. Effect of mitomycin-C on human foreskin fibroblasts used as feeders in human embryonic stem cells: Immunocytochemistry MIB1 score and DNA ploidy and apoptosis evaluated by flow cytometry. *Cell Biol Int*. 2007;31:269-78.
23. Fortier LA. Stem cells: classifications, controversies, and clinical applications. *Vet Surg*. 2005;34:415-23.
24. Koch TG, Lise CB, Betts DH. Concepts for the clinical use of stem cells in equine medicine. *Can Vet J*. 2008;49:1009-17.
25. Roy A, Krzykwa E, Lemieux R, Néron S. Increased efficiency of gamma-irradiated versus mitomycin C-treated feeder cells for the expansion of normal human cells in long-term cultures. *J Hematother Stem Cell Res*. 2001;10:873-80.
26. Tomasz M, Lipman R, Chowdary D, Pawlak J, Verdine GL, Nakanishi K. Isolation and structure of a covalent cross-link adduct between mitomycin C and DNA. *Science*. 1987;235:7212-20.
27. Malinowski K, Pullis C, Raisbeck AP, Rapaport FT. Modulation of human lymphocyte marker expression by gamma irradiation and mitomycin C. *Cell Immunol*. 1992;143:368-77.
28. Pedersen RA. Feeding hungry stem cells. *Nature*. 2002;20:882-3.
29. Unger C, Skottman H, Blomberg P, Sirac DM, Hovatta O. Good manufacturing practice and clinical-grade human embryonic stem cell lines. *Hum Mol Genet*. 2008;17:48-53.
30. Friel E, Sar S, Mee JP. Embryonic stem cells: understanding their history, cell biology and signalling. *Adv Drug Deliv Rev*. 2005;57:1894-903.

31. Minami M, Inoue M, Wei S, Takeda K, Matsumoto M, Kishimoto T, et al. STAT 3 activation is a critical step in gp130-mediated terminal differentiation and growth arrest of a myeloid leukemia cell line. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996;93:3963-6.
32. Matsuda T, Nakamura T, Nakao K, Arai T, Katsuki M, Heike T, et al. STAT 3 activation is sufficient to maintain na undifferentiated state of mouse embryonic stem cells. *EMBO J*.1999;18:4261-9.
33. Niwa H, Burdon T, Chambers I, Smith A. Self-renewal of pluripotent embryonic stem cells is mediated via activation of STAT3. *Genes Dev*. 1998;12:2048-60.
34. Niwa H, Miyazaki J, Smith AG. Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat Genet*. 2000;24:372-6.
35. Keefer CL, Pant D, Blomberg L, Talbot NC. Challenges and prospects for the establishment of embryonic stem cell lines of domesticated ungulates. *Anim Reprod Sci*. 2007;98:147-68.
36. Veljsted M, Du Y, Vatja G, Maddox-Hyttel P. Post-hatching development of the porcine and bovine embryos-defining criteria for expected development in vivo and in vitro. *Theriogenology*. 2006;65:153-65.
37. Ling V, Neben S. In vitro differentiation of embryonic stem cells: immunophenotypic analysis of cultured embryoid bodies. *J Cell Physiol*. 1997;171:104-15.
38. Heins N, Englund MCO, Sjoblom C, Dahl U, Tønning A, Bergh C, et al. Derivation, characterization, and differentiation of human embryonic stem cells. *Stem Cells*. 2004;22:367-76.
39. Brook FA, Gardner RL. The origin and efficient derivation of embryonic stem cells in the mouse. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997;94:5709-12.
40. Gomillion CT, Burg KJL. Stem cells and adipose tissue engineering. *Biomaterials*. 2006;27:6052-63.
41. Cortesini R. Stem cells, tissue engineering and organogenesis in transplantation. *Transpl Immunol*. 2005;15:81-9.
42. Cowan CA, Klimanskaya I, McMahon J, Atienza J, Witmyer J, Zucker JP, et al. Derivation of embryonic stem-cell lines from human blastocysts. *N Engl J Med*. 2004;350:1353-6.
43. Pesce M, Scholer HR. Oct-4: gatekeeper in the beginnings of mammalian development. *Stem Cells*. 2001;19:271-8.
44. Nordhoff V, Hubner K, Bauer A, Orlova I, Malapesta A, Scholer HR. Comparative analysis of human, bovine, and murine Oct-4 upstream promoter sequences. *Mamm Genome*. 2001;12:309-17.

45. Kirchof NJW, Carnwath E, Lemme K, Anastassiadis H, Schöler HN, Niemann H. Expression pattern of Oct-4 in preimplantation embryos of different species. *Biol Reprod.* 2000;63:1698-705.
46. He S, Pant D, Schiffmacher A, Bischoff S, Melican D, Gavin W, et al. Developmental expression of pluripotency determining factors in caprine embryos: novel pattern of nanog protein localization in the nucleolus. *Mol Reprod Dev.* 2006;73:1512-22.
47. Bhattacharya B, Miura T, Brandenberger R, Mejido J, Luo YAX, Joshi BH, et al. Gene expression in human embryonic stem cell lines: unique molecular signature. *Blood.* 2004;103:2956-64.
48. Hatano S, Tada M, Kimura H, Yamaguchi S, Kono T, Nakano T, et al. Pluripotential competence of cells associated with Nanog activity. *Mech Dev.* 2005;122:67-79.
49. Darr H, Mayshar Y, Benvenisty N. Overexpression of NANOG in human ES cells enables feeder-free growth while inducing primitive ectoderm features. *Development.* 2006;133:1193-201.
50. Masui S. Pluripotency governed by Sox2 via regulation of Oct3/4 expression in mouse embryonic stem cells. *Nat Cell Biol.* 2007;9:625-35.
51. Saito S, Ugai H, Sawai K, Yamamoto Y. Isolation of embryonic stem-like cells from equine blastocysts and their differentiation in vitro. *FEBS Lett.* 2002;531:389-96.
52. Muñoz M, Rodríguez C, De Frutos C, Caamaño JN, Díez C, Facal N, et al. Conventional pluripotency markers are unspecific for bovine embryonic-derived cell-lines. *Theriogenology.* 2008;69:1159-64.
53. Lin T, Chao C, Saito S, Mazur S, Murphy M, Appella E, et al. p53 induces differentiation of mouse embryonic stem cells by suppressing Nanog expression. *Nat Cell Biol.* 2004;7:165-71.
54. Brevini TAL, Tosetti V, Crestan M, Antonini S, Gandolfi F. Derivation and characterization of pluripotent cell lines from pig embryos of different origins. *Theriogenology.* 2007;67:54-63.
55. Okamoto OK, Holthausen AC. Perspectivas em terapia celular: células-tronco. *Einstein.* 2004;2:355-8.
56. Diniz D, Avelino D. Cenário internacional da pesquisa em células-tronco embrionárias. *Rev Saude Publica.* 2009;43:541-7.

Recebido em: 05/12/11

Aceito em: 25/07/12