



### Roteiro da semana

- Terapia gênica
- Clonagem terapêutica e reprodutiva
- Perspectivas terapêuticas das células-tronco

### Terapia gênica

Baseado no livro de Strachan

Os princípios das terapias baseadas em genética molecular e de tratamentos com proteínas recombinantes ou vacinas produzidas por engenharia genética ganharam grande impulso após a identificação e caracterização de genes relacionados a doenças. Ferramentas de genética molecular podem ser utilizadas para determinar a sua função e explorar os processos biológicos envolvidos nos estados normais e patológicos. Dessa forma, novas abordagens terapêuticas vêm surgindo e podem ser classificadas em dois grandes grupos: proteínas recombinantes e vacinas produzidas por engenharia genética, e terapia gênica.

Uma das principais motivações da terapia gênica foi a necessidade de desenvolver novos tratamentos para doenças para as quais ainda não há tratamento efetivo.

A terapia gênica é o processo pelo qual se trata ou se alivia uma doença pela modificação genética das células de um paciente. A técnica visa a transferir genes normais para as células do paciente. Teoricamente, os genes normais serão transcritos e traduzidos em produtos gênicos funcionais, que, por sua vez, normalizam o fenótipo.

As principais classes de doenças que podem se beneficiar da terapia gênica são: as doenças infecciosas, diversos tipos de câncer, doenças hereditárias e doenças do sistema imune.

A terapia gênica inclui muitas estratégias diferentes, e o material transferido para as células do paciente pode ser genes, segmentos gênicos ou oligonucleotídeos. O material

genético novo pode ser transferido diretamente para as células, ou as células podem ser removidas do paciente, modificadas por inserção do material genético *in vitro* antes de serem transplantadas de volta para o paciente.

Como a base molecular das doenças pode variar muito, as diferentes estratégias de terapia gênica são particularmente adequadas a tipos específicos de doenças.

As abordagens da terapia gênica incluem a terapia gênica clássica, onde são introduzidos genes em células-alvo apropriadas com o objetivo de obter a sua expressão ótima. Para obter sucesso, os genes exógenos expressados destinam-se aos seguintes propósitos: gerar um produto que está deficiente no paciente, matar células doentes diretamente, por exemplo, pela produção de uma toxina letal, ativar células do sistema imune de modo que auxilie na eliminação de células doentes. Na terapia gênica não clássica, o objetivo consiste em inibir a expressão de genes associados com a patogenia ou corrigir um defeito genético para restaurar a expressão gênica normal.

A terapia gênica corrente é somática, envolvendo a introdução de genes em células somáticas de um indivíduo. A perspectiva de terapia gênica envolvendo linhagens germinativas humanas ainda suscita preocupações éticas.

Para muitos testes de terapia gênica, utilizam-se retrovírus geneticamente modificados como vetores. Os vetores são criados por meio da remoção de três genes do vírus para inserir o gene humano clonado. Depois de empacotado na capa de proteína viral, o vetor recombinante é usado para infectar células. No interior da célula, o vírus não consegue se autorreplicar por falta dos genes virais previamente removidos. Por outro lado, o vírus recombinante contendo o inserto de gene humano consegue se integrar a um sítio cromossômico e se incorpora ao genoma do receptor. Se o gene inserido consegue se expressar, faz um produto gênico normal, que seria capaz de corrigir a mutação do indivíduo portador da doença genética. Esta metodologia foi utilizada primariamente em várias doenças hereditárias, inclusive a imunodeficiência combinada severa (SCID), a hipercolesterolemia familiar e a fibrose cística. Essas terapias foram revistas e foi desenvolvida uma nova geração de vetores virais. Entretanto, ainda existem vários empecilhos para a terapia gênica.

## Estratégias gerais da terapia gênica

### TERAPIA DE AUMENTO GÊNICO

Para doenças causadas pela perda de função de um gene, a introdução de cópias adicionais do gene normal pode aumentar a quantidade do produto gênico normal até o nível em que é restaurado o fenótipo normal. Esta metodologia só se aplica às patologias em que o quadro clínico é reversível, e é particularmente aplicada em doenças autossômicas recessivas, nas quais mesmo níveis de expressão modestos de um gene podem fazer diferença.

### MORTE DIRECIONADA DE CÉLULAS ESPECÍFICAS

Aplicada principalmente em terapias para câncer. Os genes são dirigidos a células-alvo e, depois de expressos, causam a morte dessas células.

### CORREÇÃO DE MUTAÇÃO DIRIGIDA

Esta metodologia ainda não é aplicável, mas, em princípio, poderia ser utilizada em casos em que a mutação produza um efeito dominante negativo. Nesses casos, a mutação deve ser corrigida através de direcionamento gênico ou em nível do transcrito do RNA, silenciando a cópia com a alteração.

### INIBIÇÃO DIRIGIDA DA EXPRESSÃO GÊNICA

Em casos em que as células doentes apresentam um novo produto gênico, ou expressão inapropriada de um gene para o período de vida. Vários sistemas podem ser utilizados para bloquear especificamente a expressão de um único gene em nível de DNA ou RNA, ou da proteína.

## A tecnologia da terapia gênica clássica

Genes podem ser inseridos em células de pacientes por rotas diretas ou indiretas e os genes inseridos podem ser integrados aos cromossomos ou permanecer extracromossômicos.

A maioria dos protocolos de terapia gênica utiliza vetores virais de mamíferos, em virtude da alta eficiência de transferência gênica desses vetores.

Os tipos de vetores utilizados incluem os vetores retrovirais, Adenovirais, Adeno-virais associados, vírus do herpes simples e Lentivírus. A preocupação em relação à segurança de vírus recombinantes levou a um interesse crescente em sistemas de vetores não-virais para terapia gênica. Entre estes, encontramos os lipossomos, a injeção direta, o bombardeamento de partículas e a endocitose mediada por receptor.

## Principais métodos de transferência gênica: propriedades e aplicações

Características	Retrovírus	Adenovírus	Adeno-associado	Lentivírus	Lipossomo
Tamanho de inserto máximo	7-7,5 kb	> 30 kb	4,0 kb	7-7,5 kb	ilimitado
Integração cromossômica	sim	não, epissômico	sim e não	sim	frequência muito baixa
Duração da expressão <i>in vivo</i>	curta	curta	longa	longa	curta
Estabilidade	boa	boa	boa	não testada	muito boa
Rota de distribuição gênica	<i>ex-vivo</i>	<i>ex-vivo</i> e <i>in vivo</i>	<i>ex-vivo</i> e <i>in vivo</i>	<i>ex-vivo</i> e <i>in vivo</i>	<i>ex-vivo</i> e <i>in vivo</i>
Facilidade de preparação em larga escala	escala piloto até 20-50 litros	facilmente preparado em grande escala	difícil de purificar; difícil de preparar em larga escala	não conhecida	facilmente preparado em larga escala.
Resposta imunológica	poucos problemas	extensiva	não conhecida	poucos problemas	nenhuma
Imunidade pré-existente do hospedeiro	improvável	sim	sim	improvável (exceção possível: pacientes com AIDS)	não
Preocupações com segurança	possibilidade de mutagênese insercional	resposta inflamatória, toxicidade	resposta inflamatória, toxicidade	possibilidade de mutagênese insercional	nenhuma

Tabela 10.1 Principais métodos de transferência gênica: propriedades e aplicações / Fonte: adaptado de Strachan & Read, 2002.

A primeira tentativa de terapia gênica para uma doença hereditária foi iniciada em 1990, em um paciente de 4 anos de idade, portador da doença genética rara ADA - deficiência da enzima adenosina-desaminase.

Nos últimos 10 anos, mais de 4.000 pessoas receberam terapia gênica para uma variedade de distúrbios genéticos. Essas tentativas falharam com muita frequência, o que provocou perda de confiança na terapia gênica.

Ainda, aumentou muito a preocupação quanto à eficácia da terapia gênica quando um adolescente morreu durante o tratamento por causa de uma intensa resposta inflamatória ao vetor adenoviral modificado que ele recebeu. Por outro lado, também foram relatados alguns casos de grande sucesso.

A maioria dos problemas associados à terapia gênica se relaciona com os vetores usados para transferir os genes terapêuticos para as células, que apresentam diversas desvantagens:

- A integração dos genomas retrovirais no genoma das células hospedeiras só ocorre quando estas estão replicando seu DNA. Só um pequeno número de células e tecidos do corpo está se dividindo, o que limita a maioria dos órgãos-alvo de terapias.
- A maioria dos vetores virais é capaz de provocar uma resposta imune no paciente
- A inserção do genoma viral em cromossomos hospedeiros é feita de forma aleatória e pode ativar ou mutar um gene essencial. Alguns casos de indução de câncer foram descritos.
- Os retrovírus não conseguem portar sequências muito maiores que 8 kb e muitos genes humanos são maiores.
- Se o vetor inserido se recombina com um outro genoma viral já presente na célula hospedeira, existe uma possibilidade de se produzir um vírus completamente infeccioso.

Espera-se que o uso de novos sistemas de introdução de genes contorne esses problemas e permita a regulação dos sítios de inserção e dos níveis de produtos gênicos produzidos a partir de genes terapêuticos.

A terapia gênica vem sendo também testada em combinação com as terapias de substituição de tecidos utilizando as células-tronco. Recentemente, um grupo de pesquisadores japoneses (Kazuki *et al.*, 2010) realizou uma experiência que ilustra essa tecnologia. Foram retiradas células da pele (fibroblastos), que foram reprogramadas, as células IPS, para serem como as embrionárias. O paciente, um menino com DMD, tinha uma deleção (perda de um pedaço) grande no gene da distrofina. A partir das células da pele foi possível reprogramá-las de modo que fossem obtidas diversas linhagens celulares que possuíam o gene defeituoso. O próximo passo foi introduzir, nessas células, um gene normal contido em um chamado cromossomo artificial, um vetor capaz de carregar o gene inteiro da distrofina (que é gigantesco, o maior gene humano). O próximo passo foi verificar se as células conseguiam formar diferentes tecidos e se esses expressavam a proteína distrofina de tamanho normal. E o experimento mostrou-se um sucesso: células musculares derivadas tinham a distrofina saudável. Embora todo o experimento tenha sido feito no laboratório e ainda não “*in vivo*”, trata-se de mais uma estratégia que visa ao tratamento das distrofias e de outras doenças genéticas. Ainda não podemos saber quanto tempo teremos de esperar para poder usar essa estratégia na clínica. Mas é mais um tijolinho em direção à cura.

# Clonagem terapêutica e reprodutiva

Adaptado do texto de Mayana Zatz, apostila [USP vai a escola](#).

A clonagem é um mecanismo comum de propagação da espécie em plantas ou bactérias. Em humanos, os clones naturais são os gêmeos idênticos que se originam da divisão de um mesmo óvulo fertilizado. A grande revolução da Dolly abriu caminho para a possibilidade de clonagem humana ao demonstrar, pela primeira vez, que era possível clonar um mamífero - isto é, produzir uma cópia geneticamente idêntica a partir de uma célula somática diferenciada. Para entendermos porque essa experiência foi surpreendente precisamos recordar um pouco de embriologia.

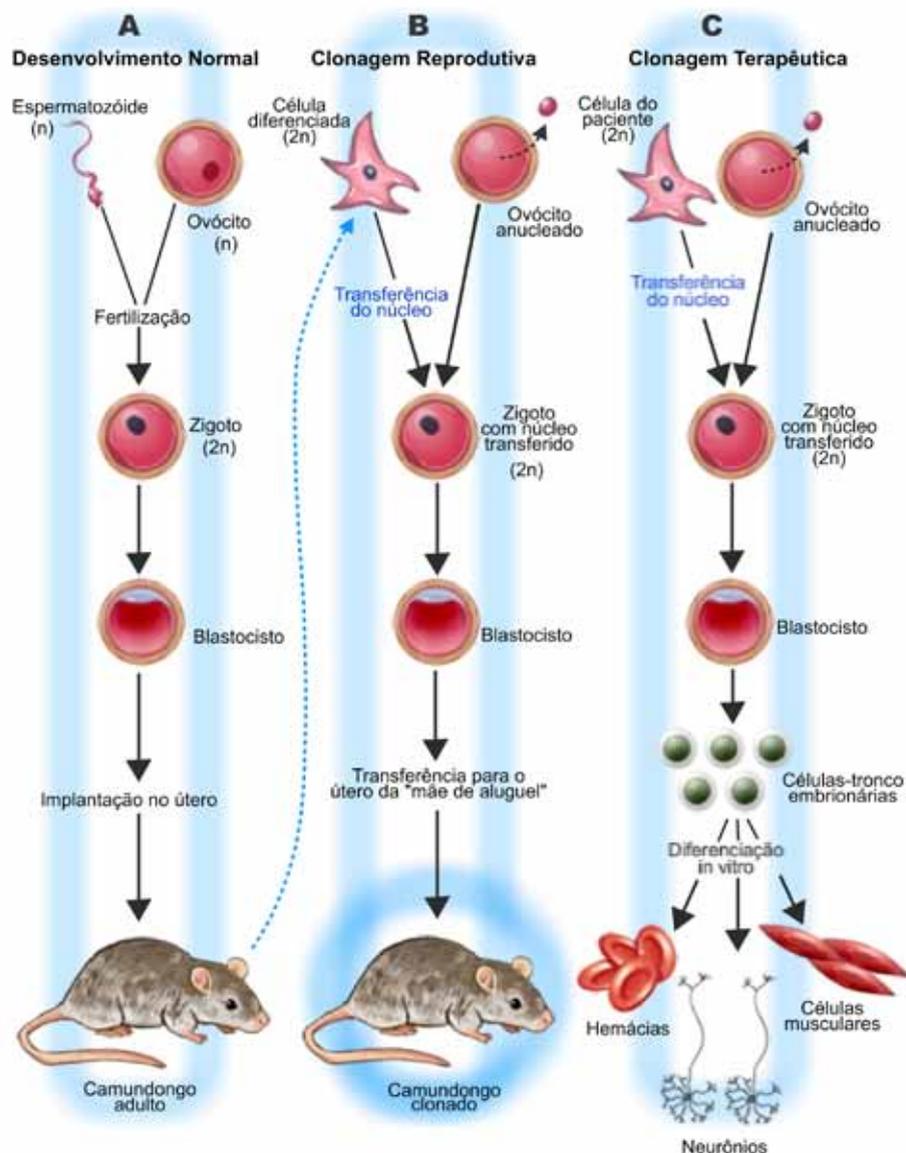


Fig. 10.1 Clonagem / Fonte: CEPA, adaptado de apostila disponível no site do Centro de Estudos do Genoma Humano - IB/USP.

Todos nós já fomos uma célula única, resultante da fusão de um óvulo e um espermatozoide. Esta primeira célula já tem no núcleo o DNA com toda a informação genética necessária para o novo ser. No núcleo das nossas células, o DNA se organiza em pares de cromossomos e se apresenta muito condensado. Com exceção das células sexuais — o óvulo e o espermatozoide, que têm 23 cromossomos —, em todas as outras células do corpo humano há 46 cromossomos (23 pares) em seus núcleos. As células do corpo, não sexuais, são as chamadas células somáticas.

A grande contribuição da clonagem da Dolly foi justamente a descoberta de que uma célula somática de mamífero, já diferenciada, poderia ser reprogramada ao estágio inicial e voltar a ser totipotente. Os cientistas escoceses realizaram esse feito ao transferir o núcleo de uma célula somática da glândula mamária de uma ovelha para um óvulo anucleado — quer dizer, de onde tinham retirado o núcleo. Surpreendentemente, o óvulo começou a se comportar como um óvulo recém-fecundado por um espermatozoide.

## Clonagem reprodutiva

Como descrito no item anterior, para a obtenção de um clone, o óvulo para o qual os cientistas transferem o núcleo da célula somática é inserido no útero de uma mãe de aluguel. Se desejássemos fazer clonagem humana reprodutiva, teríamos de retirar o núcleo de uma célula somática que, teoricamente, poderia ser de qualquer tecido de uma criança ou de um adulto, inserir o núcleo em um óvulo, e depois implantá-lo no útero de uma mulher, que funcionaria como barriga de aluguel. Se o óvulo se desenvolvesse, teríamos um novo ser com as mesmas características físicas da criança ou do adulto de quem foi retirada a célula somática. Seria como um gêmeo idêntico nascido posteriormente (Figura A).

Já sabemos que esse processo não é fácil. Dolly só nasceu depois de 276 tentativas fracassadas. Além disso, dos núcleos das 277 células da “mãe de Dolly” inseridos em um óvulo sem núcleo, 90% não alcançaram nem o estágio de blastocisto. As tentativas posteriores de clonar outros mamíferos, camundongos, porcos, bezerras, um cavalo e um veado, também mostraram eficiência muito baixa e uma proporção muito grande de abortos e embriões malformados. Penta, a primeira bezerra brasileira clonada a partir de uma célula somática adulta, em 2002, morreu com pouco mais de um mês. Ainda em 2002, foi anunciada a clonagem do “copycat”, o primeiro gato de estimação clonado a partir de uma célula somática adulta. Para chegar a isso, foram utilizados 188 óvulos, que geraram 87 embriões e apenas um animal vivo. Na realidade, experiências recentes, com diferentes modelos animais, têm mostrado que é extremamente difícil a reprogramação da célula somática para um estágio embrionário, indiferenciado, que originou Dolly.

Ian Wilmut, o cientista escocês famoso pela experiência que resultou no nascimento de Dolly, afirma que praticamente todos os animais clonados nos últimos anos, a partir de células não-embrionárias, estão com problemas (Rhind, 2003). Entre os diferentes defeitos dos pouquíssimos animais que nasceram vivos após inúmeras tentativas, observaram-se: placentas anormais, gigantismo em ovelhas, defeitos cardíacos em porcos, problemas pulmonares em vacas, ovelhas e porcos, problemas imunológicos, falha na produção de leucócitos, defeitos musculares em carneiros. De acordo com Hochedlinger e Jaenisch (2003), os avanços recentes em clonagem reprodutiva permitem quatro conclusões importantes:

- a maioria dos clones morre no início da gestação;
- os animais clonados têm defeitos e anormalidades semelhantes, independentemente da célula doadora ou da espécie;

- essas anormalidades, provavelmente, ocorrem por falhas na reprogramação do genoma das células somáticas;
- a eficiência da clonagem depende do estágio de diferenciação da célula doadora.

De fato, a clonagem reprodutiva a partir de células embrionárias tem mostrado uma eficiência de 10 a 20 vezes maior, provavelmente porque os genes importantes no início da embriogênese estão ainda ativos no genoma da célula doadora. (Hochedlinger e Jaenisch, 2003).

Entre todos os mamíferos já clonados, é interessante notar que a eficiência é um pouco maior em bezerros. Outro fato intrigante é não haver notícias de macaco que tenha sido clonado. Talvez por essa razão, a cientista inglesa Ann McLaren afirma que as falhas na reprogramação do núcleo somático podem vir a se constituir em barreira intransponível para a clonagem humana. Mesmo assim, pessoas como o médico italiano Antinori e a seita dos raelianos defendem a clonagem humana, um procedimento que tem sido proibido em todos os países. De fato, em 2003, as academias de ciências de 63 países, inclusive a brasileira, formalizaram documento conjunto em que pedem o banimento da clonagem reprodutiva humana. O fato é que a simples possibilidade de clonar humanos suscita discussões éticas em todos os segmentos da sociedade: Por que clonar? Quem deveria ser clonado? Quem iria decidir? Quem será o pai ou a mãe do clone? O que fazer com os clones que nascerem defeituosos?

Na realidade, o maior problema ético atual é o enorme risco biológico associado à clonagem reprodutiva. Apesar de todos esses argumentos contra a clonagem humana reprodutiva, as experiências com animais clonados têm nos ensinado muito acerca do funcionamento celular. Por outro lado, a tecnologia de transferência de núcleo para fins terapêuticos, a chamada clonagem terapêutica, poderá ser extremamente útil para a obtenção de células-tronco embrionárias.

## A técnica de clonagem terapêutica para obtenção de células tronco embrionárias

Se tivermos um óvulo humano, cujo núcleo tenha sido substituído por um núcleo de célula somática, e deixarmos que se divida no laboratório – não em um útero –, teremos a possibilidade teórica de obter blastocistos e usar suas células-tronco embrionárias pluripotentes para formar diferentes células (Figura 10.2). Isso já foi feito em animais. O

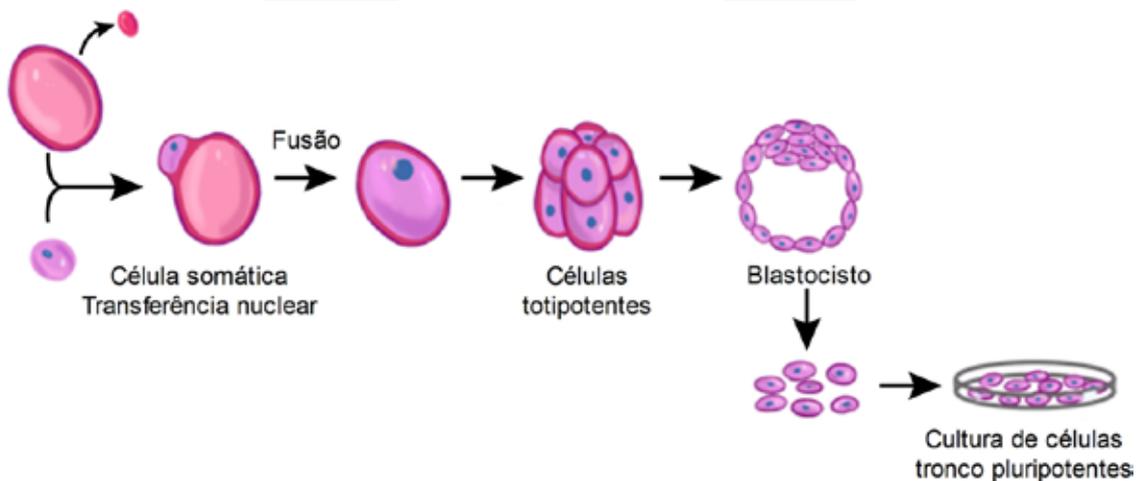


Fig. 10.2 Clonagem Terapêutica / Fonte: CEPA, adaptado de apostila disponível no site do Centro de Estudos do Genoma Humano – IB/USP.

sucesso desse processo abriria perspectivas fantásticas para futuros tratamentos. Hoje, só se consegue cultivar em laboratório células com as mesmas características do tecido de onde foram retiradas ou transformá-las em poucos tipos celulares.

É importante esclarecer que, na clonagem para fins terapêuticos, os tecidos seriam produzidos apenas em laboratório. Não se trata de clonar um feto até alguns meses dentro do útero para depois lhe retirar os órgãos para transplante, como alguns acreditam.

## Aspectos éticos

As 63 academias de ciências do mundo, que se posicionaram contra a clonagem reprodutiva, defendem as pesquisas com células embrionárias para fins terapêuticos. Em relação aos que acham que a clonagem terapêutica pode abrir caminho para a clonagem reprodutiva, devemos lembrar que existe uma diferença fundamental entre os dois procedimentos: a implantação ou não em um útero humano. Bastaria simplesmente proibir a implantação no útero para conter os abusos!

A cultura de tecidos é uma prática comum em laboratório. É realizada a partir de diversos tipos de células sem dilemas éticos. No caso da clonagem terapêutica, a diferença seria o início da cultura a partir de óvulos, que permitiriam a produção de qualquer tecido no laboratório, ou seja: ao invés de produzir apenas um tipo de tecido, já especializado, o uso de óvulos permitiria fabricar qualquer tipo de tecido. Em relação ao risco de comércio de óvulos, esse risco seria o equivalente ao que ocorre hoje com transplante de órgãos.

Em relação ao problema da destruição de “embriões humanos”, novamente devemos lembrar que estamos falando de cultivar tecidos - ou, futuramente, órgãos -, a partir de embriões e que estes nunca serão inseridos em um útero. Sabemos que 90% dos embriões gerados em clínicas de fertilização e inseridos no útero de uma mulher não geram vida. Além disso, um trabalho recente (Mitalipova *et al.*, 2003) mostrou que células obtidas de embriões de má qualidade, que não teriam potencial para gerar uma vida, mantêm a capacidade de gerar linhagens de células-tronco embrionárias em laboratório e, portanto, de gerar tecidos. Ao usar células-tronco embrionárias com potencial baixíssimo de gerar indivíduos para regenerar tecidos em uma pessoa condenada por uma doença letal, poderíamos interpretar que na realidade estamos criando vida. Isso é comparável ao que se faz hoje em transplante quando se retiram órgãos de uma pessoa com morte cerebral (mas que poderia permanecer em vida artificialmente mantida por mais tempo).

É extremamente importante que as pessoas entendam a diferença entre clonagem reprodutiva humana, clonagem terapêutica e terapia celular com células-tronco embrionárias antes de tomar posição. Por outro lado, também não podemos acreditar que as células-tronco vão curar todas as doenças humanas. As pesquisas que estão sendo iniciadas agora serão fundamentais para responder a questões sobre o potencial das células-tronco adultas em comparação com as embrionárias, que doenças poderão ser tratadas e quais são os benefícios e riscos da terapia celular.

## Situação brasileira

Com a aprovação da Lei de Biossegurança pela Câmara dos Deputados, no dia 2 de março de 2005, o Brasil entra na seleta lista de países do mundo em que os cientistas podem realizar pesquisas com células-tronco embrionárias, e trabalhar para encontrar tratamentos para doenças genéticas, até hoje incuráveis, e para lesões físicas ainda irreversíveis. Em alguns casos, as células-tronco embrionárias são a única esperança.

Os cientistas apostam muito nessas células embrionárias, pois elas são as únicas capazes de produzir todos os 216 tecidos do nosso corpo. A esperança é a de que inúmeras doenças, entre elas as neuromusculares, o diabetes, o mal de Parkinson e as lesões de medula possam ser tratadas pela substituição ou correção de células ou tecidos defeituosos. A terapia celular com células-tronco representa também um grande avanço nas técnicas hoje existentes de transplante de órgãos. Se as pesquisas derem os resultados esperados, deverá ser possível, no futuro, fabricar tecidos e órgãos em quantidade suficiente para todos. Seria o fim das longas filas de transplante de órgãos. Do mesmo modo que trocamos peças do nosso carro, poderemos substituir ou corrigir a função de órgãos com defeitos. Mas, para chegar lá, ainda temos de pesquisar e estudar muito.

As pesquisas com células-tronco do adulto, por sua vez, já foram iniciadas em pacientes cardíacos e em outras doenças como esclerose múltipla, acidente vascular ou diabetes; a maior pesquisa do mundo com pacientes cardíacos está sendo realizada no Brasil com 1.200 pessoas. Mas essas células têm algumas limitações. Hoje, elas só podem ser transformadas em células de alguns dos tecidos do corpo. Em especial, os pesquisadores sabem como transformar as células-tronco do adulto em células dos órgãos ou tecidos de onde foram retiradas: por exemplo, em células da medula óssea, que produz os componentes básicos do sangue. A terapia com células-tronco do adulto tem dado bons resultados no tratamento de leucemia. Nele, células-tronco do adulto da medula óssea e, mais recentemente, do cordão umbilical e da placenta são transplantadas nos pacientes a partir de doadores compatíveis.

Outra técnica utilizada, ainda experimentalmente, é a de autotransplante, na qual as células-tronco são retiradas e reinjetadas no paciente para o tratamento de lesões cardíacas e na recuperação do tecido nervoso de pessoas que sofreram acidentes vasculares. Mas ninguém sabe ainda se o tratamento é eficiente - por enquanto, é uma tentativa terapêutica experimental. A má notícia é a de que o autotransplante não pode resolver o problema dos mais de 5 milhões de brasileiros portadores de doenças genéticas, pois o defeito está presente em todas as suas células. Para essas pessoas talvez seja necessário o uso de células-tronco obtidas de embriões.

## Perspectivas terapêuticas das células-tronco

### O conceito básico de células-tronco

Modificado do texto de Nance Beyer Nardi

Nosso organismo pode ser visto como um conjunto de órgãos - coração, pulmões, fígado etc. - que, interagindo entre si e com o meio ambiente, garante o bom funcionamento do todo. Cada um desses órgãos, por outro lado, é formado a partir da interação de vários tipos de células, que constituem assim a unidade funcional do organismo.

São reconhecidos mais de 200 tipos de células no corpo humano colaborando entre si para formar os tecidos. As células têm uma vida dinâmica no organismo, surgindo pela divisão de uma célula precursora, desenvolvendo-se e morrendo. Uma célula pode assim, em dado momento, seguir um entre três diferentes “destinos”, que dependem da resposta

que ela dá a estímulos que chegam do microambiente onde vive. Em primeiro lugar, a célula pode proliferar, isto é, dividir-se pelo processo de mitose, originando outras duas células. Ela pode também mudar de tamanho e forma, passando a realizar alguma função mais especializada, processo denominado diferenciação.

Finalmente, a célula pode morrer, num processo que é planejado pelo organismo e é chamado “morte celular programada”. A morte celular é um processo muito importante para a manutenção adequada do organismo e, praticamente, todas as células em espécies de vida mais longa, como o homem, são programadas para uma substituição periódica. Para a grande maioria das células, a morte acontece por um mecanismo fisiológico denominado apoptose, por um prazo que pode variar entre alguns dias e alguns meses após sua formação. Este processo é muito acentuado para alguns tipos de células como as sanguíneas (que são repostas aos milhões a cada hora) ou, como se torna mais visível para nós no verão, para as células que formam a pele. Outras células, como as que compõem o sistema nervoso, são consideradas permanentes, embora, mais recentemente, tenha sido observada a existência de renovação celular mesmo para elas.

Vemos assim que, mesmo depois de concluído o período de crescimento, quando o número de células necessariamente aumenta, o organismo deve continuar a produzir novas células. Para a maioria das células do organismo, a renovação ocorre a partir de células-tronco (CTs) que existem nos diferentes tecidos.

Chegamos assim ao conceito básico de célula-tronco, apesar de esse conceito - ao menos para as CTs presentes no organismo adulto - ainda não estar completamente definido. Geralmente, é aceito que elas são as únicas a apresentarem simultaneamente duas propriedades.

- Em primeiro lugar, elas são capazes de proliferar originando, por mitose, duas células filhas exatamente iguais entre si e iguais à célula original. Para todas as outras



Fig. 10.3 Fontes de células-tronco adultas. / Fonte: CEPA. Adaptado de apostila disponível no site do Centro de Estudos do Genoma Humano - IB/USP.

células do organismo, a proliferação é acompanhada de diferenciação, de modo que a mitose origina duas células já um pouco mais maduras que a original.

- Em segundo lugar, as CTs são capazes de, quando submetidas aos estímulos adequados, originar um ou mais tipos de células maduras.

Todos esses conceitos são muito recentes. As células-tronco, em si, foram inicialmente descritas em camundongos na década de 1970. Estudos em roedores progrediram, revelando a grande diversidade e plasticidade dessas células pluripotentes até que, em 1998, elas foram isoladas pela primeira vez no homem, pelos pesquisadores James Thomson (Universidade de Wisconsin) e John Gearhart (Universidade Johns Hopkins), nos EUA, e, a partir desses estudos, os conhecimentos a respeito do assunto têm crescido em velocidade extraordinária.

Para continuar a descrever as características das células-tronco e suas aplicações, é importante que se faça uma distinção. Até agora foram apresentadas as células presentes no organismo adulto, responsáveis pela manutenção dos tecidos. Existe, entretanto, uma outra categoria de CTs, que são aquelas presentes no embrião. As duas categorias de células-tronco - embrionárias e do adulto - exibem diferenças em características biológicas, na metodologia de obtenção e manutenção, no potencial de aplicação terapêutica, e nas implicações éticas e legais de sua manipulação.

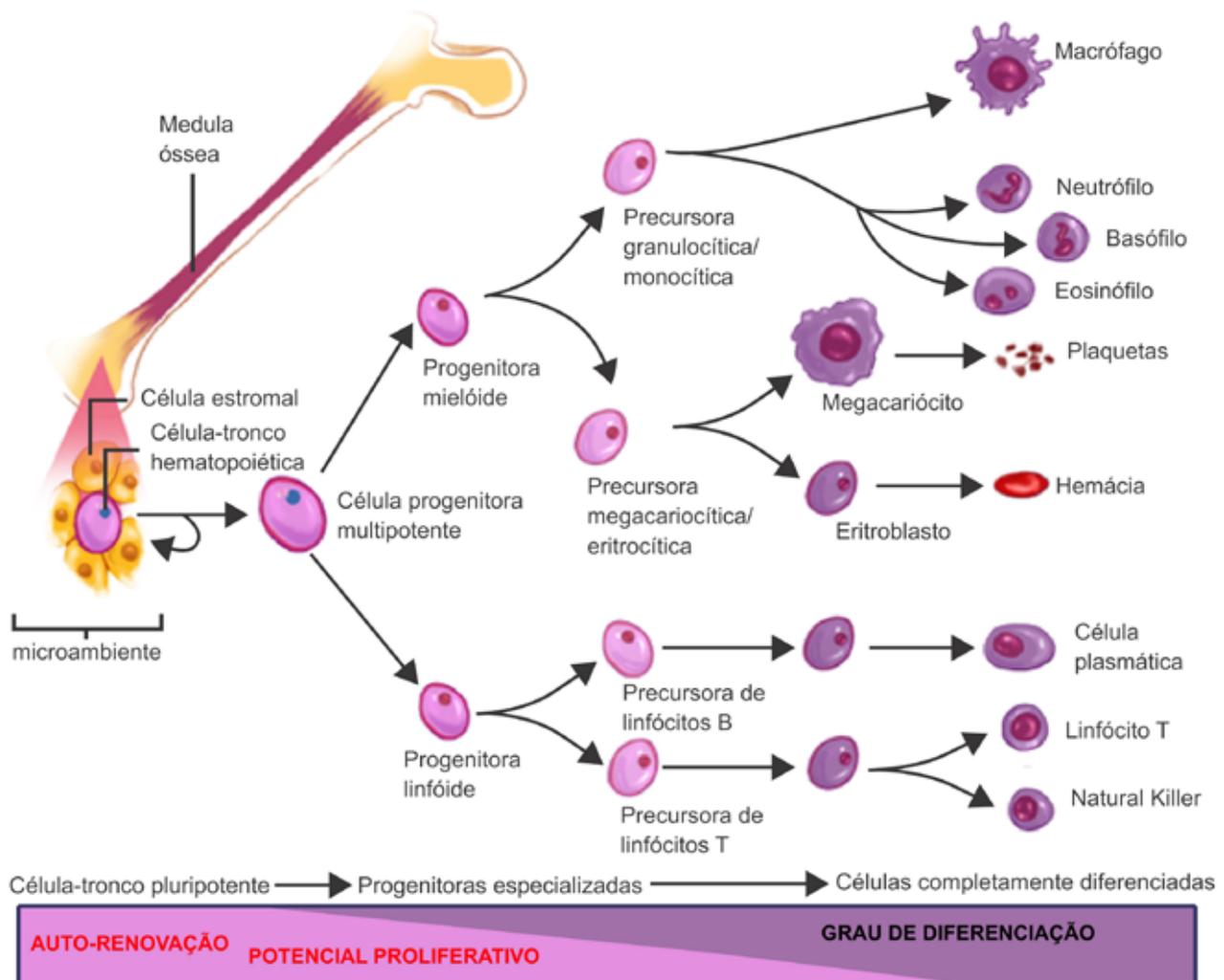


Fig. 10.4 Diferenciação celular / Fonte: CEPA, adaptado da apostila Células-tronco, disponível no site do Centro de Estudos do Genoma Humano - IB/USP.

## Células-tronco: progressos científicos

Baseado no texto de Zatz M, e Passos-Buento MR, encontrado no site do [Centro de Estudos do Genoma Humano](#).

Os cientistas apostam muito nas células-tronco. Espera-se que inúmeras doenças, entre elas as neuromusculares, o diabetes, o mal de Parkinson e as lesões de medula possam ser tratadas pela substituição ou correção de células ou tecidos defeituosos. A terapia celular com células-tronco representa também um grande avanço nas técnicas hoje existentes de transplante de órgãos. Se as pesquisas derem os resultados esperados, deverá ser possível, no futuro, fabricar tecidos e órgãos em quantidade suficiente para todos. Seria o fim das longas filas de transplante de órgãos. Do mesmo modo que trocamos peças do nosso carro poderemos substituir ou corrigir a função de órgãos com defeitos.



Assista ao [vídeo sobre células tronco](#).

Há vários entraves de ordem técnica, que precisam ser vencidos para que as células-tronco possam passar a ser empregadas rotineiramente em terapia celular.

Um dos principais objetivos das pesquisas com células-tronco embrionárias humanas é identificar como as células indiferenciadas se tornam diferenciadas. Os cientistas sabem que ligar ou desligar determinados genes é um processo crucial. Algumas das mais sérias condições médicas, como câncer e defeitos congênitos, são causadas por anormalidades na divisão celular anormal e na diferenciação. Uma melhor compreensão do controle genético e molecular desses processos pode dar informações sobre como tais doenças ocorrem e sugerir novas estratégias para terapia. Os cientistas ainda não compreendem completamente os sinais que ligam ou desligam genes na diferenciação das células-tronco.

Uma aplicação potencial das células-tronco é a geração de órgãos e tecidos para substituir tecidos lesados e que atualmente só é possível a partir de doação de órgãos de pessoas com morte cerebral. Para realizar as promessas de uso, os cientistas devem ser capazes de reproduzir, manipular e diferenciar as células em número suficiente para os transplantes. A seguinte lista de passos precisa ser obtida:

- proliferar extensivamente e gerar quantidades suficientes de tecido,
- diferenciar as células no tipo celular desejado,
- garantir a sobrevivência das células no corpo do transplantado após o transplante,
- garantir a integração das células transplantadas no tecido do receptor,
- garantir o correto funcionamento das células durante o período de vida do transplantado,
- evitar qualquer tipo de dano no transplantado, inclusive a rejeição.

Antes que um novo procedimento de terapia comece a ser utilizado no tratamento de doentes, são necessários os seguintes requisitos:

- uma ideia que possa ser testada com base em experimentos científicos – no caso da terapia celular, a ideia é usar células-tronco para reparar ou substituir tecidos ou órgãos danificados.
- pesquisas e testes em laboratório – geralmente, os experimentos preliminares são feitos em placas de cultura com células humanas e de outros animais. Essa etapa inclui o desenvolvimento de diferentes linhagens de células-tronco em laboratório, a verificação da eficácia que cada tipo celular apresenta no reparo de diversos tecidos, etc.
- estabelecimento de um modelo experimental que simule o modo de utilização em seres humanos - modelos de terapia mais refinados são testados em modelos animais. Os resultados devem ser reproduzíveis e a segurança de sua aplicação deve ser provada.

As células-tronco podem ser classificadas de acordo com a sua capacidade de originar outros tipos celulares (Figura 10.5):

- **Células-tronco totipotentes:** Têm o potencial de formar todos os tecidos bem como um novo indivíduo se inseridas em útero
- **Células-tronco pluripotentes:** Estão na parte interna do blastocisto. Têm o potencial de formar todos os tecidos do corpo humano, mas não mais um novo indivíduo, se inseridas em útero.
- **Células-tronco multipotentes:** Têm o potencial de formar vários tecidos; por exemplo, as células-tronco mesenquimais.
- **Células-tronco oligopotentes:** Têm o potencial de formar poucos tecidos; por exemplo, as células-tronco hematopoéticas.
- **Células-tronco unipotentes:** Têm o potencial de formar um único tecido.

## Comparação entre células-tronco embrionárias e de adulto

### A. CARACTERÍSTICAS COMUNS A CÉLULAS-TRONCO EMBRIONÁRIAS E DE ADULTO

- Possuem capacidade de autorrenovação e de dar origem a células especializadas.
- Os cientistas usam técnicas similares para marcar e monitorar a expressão de certos genes a fim de identificá-las.
- São capazes de proliferar e de se especializar quando transplantadas para animais cujo sistema imunológico foi suprimido.

### B. DIFERENÇAS ENTRE CÉLULAS-TRONCO EMBRIONÁRIAS E DE ADULTO

- A principal diferença está na origem: os cientistas acreditam que as embrionárias existam apenas nos embriões e que as adultas estão presentes em diversos tipos de tecidos do corpo humano.
- As embrionárias são pluripotentes, ou seja, podem dar origem a tecidos provenientes dos três folhetos germinativos (ectoderma, mesoderma e endoderme). Ainda não se sabe se as adultas possuem a mesma capacidade.

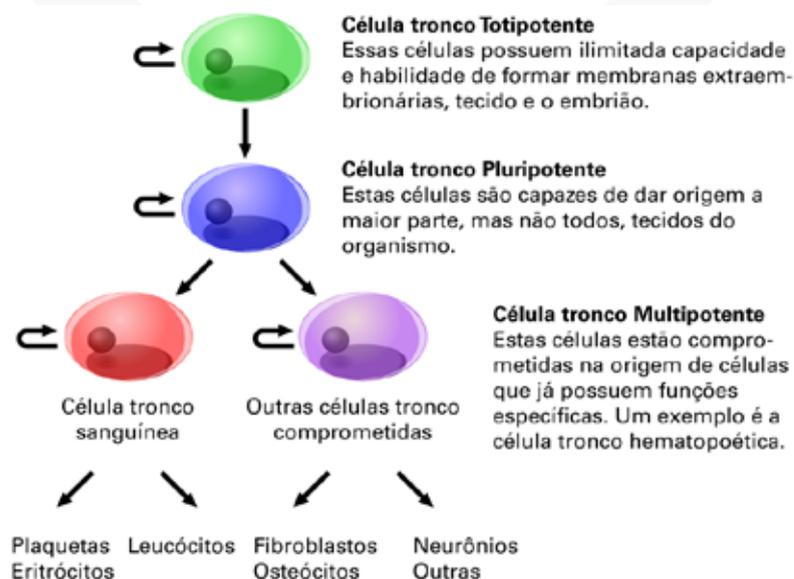


Fig. 10.5 Tipos de células-tronco / Fonte: CEPA, adaptado de apostila disponível no site do Centro de Estudos do Genoma Humano - IB/USP.

- Em laboratório, as embrionárias podem se multiplicar por muitas gerações sem que haja diferenciação; já as adultas sofrem diferenciação.
- As embrionárias, quando injetadas em cobaia cujo sistema imunológico foi suprimido, geram teratomas (mistura de diferentes tipos celulares). O mesmo resultado não é observado com as adultas.

### C. ALGUMAS PERGUNTAS QUE AINDA PRECISAM SER RESPONDIDAS A RESPEITO DE CÉLULAS-TRONCO

- Existe uma célula-tronco universal? Ou seja, existe uma célula-tronco que possa gerar células de quaisquer órgãos ou tecidos?
- Quais são as origens das células-tronco no adulto? Elas são “sobras” de células-tronco embrionárias ou elas surgem de alguma outra forma? E se a última alternativa for a verdadeira - como parece ser - exatamente como elas surgem e como elas permanecem em um estado indiferenciado enquanto todas as células ao seu redor se encontram diferenciadas?
- Quantos tipos de células-tronco adultas existem e em quais tecidos?
- As células-tronco adultas podem proliferar em meio de cultura até que seja obtida a quantidade necessária para transplante?
- Quais as evidências de que células especializadas geradas a partir de transplantes de células-tronco possam substituir células de tecidos lesados ou danificados?
- Quais são os fatores responsáveis pela migração das células-tronco até os tecidos danificados?

### Células-tronco: progressos científicos e o futuro das pesquisas

- Quais são os controles intrínsecos que fazem uma célula-tronco se diferenciar em determinado tipo celular em vez de outro?
- Quais os mecanismos que permitem às células-tronco embrionárias proliferar *in vitro* sem que haja diferenciação?
- Qual o estágio de diferenciação da célula-tronco e o melhor para o transplante? O mesmo estágio é o melhor para qualquer tipo de transplante ou varia de caso para caso?
- Qual o melhor estágio de diferenciação de uma célula-tronco para testar drogas e toxinas?

### D. PERGUNTAS-CHAVE SOBRE CÉLULAS-TRONCO DO ADULTO E CÉLULAS-TRONCO EMBRIONÁRIAS

Há várias questões importantes sobre as células-tronco que permanecem sem resposta. Algumas delas estão listadas abaixo:

- Quantos tipos de células-tronco do adulto existem e em quais tecidos elas existem?
- Quais são as fontes de células-tronco do adulto no corpo? Serão elas células-tronco “remanescentes” das células-tronco embrionárias, ou elas são originadas de outro modo. Por que elas permanecem num estado indiferenciado quando as células ao seu redor foram diferenciadas?
- As células-tronco do adulto exibem plasticidade normalmente, ou elas se transdiferenciam apenas quando manipuladas pelos cientistas? Quais são os sinais que regulam a proliferação e a diferenciação das células-tronco que exibem plasticidade?
- É possível manipular células-tronco do adulto para aumentar sua proliferação de modo que produza células suficientes para um transplante?
- Existe um tipo de célula-tronco de adulto que tenha a capacidade de gerar as células de todos os tecidos e órgãos?
- Quais os fatores que estimulam as células-tronco a migrar para locais lesionados ou danificados?

## Emprego de células-tronco

Atualmente, as pesquisas sobre o emprego de células-tronco em terapias ou tratamento de doenças humanas encontram-se em três estágios de desenvolvimento.



Assista ao vídeo sobre os estágios de desenvolvimento do emprego de células tronco em terapias ou tratamento de doenças humanas.

### I. TERAPIA COM CÉLULAS-TRONCO DO ADULTO

Principais etapas para o desenvolvimento de terapias de transplante de células-tronco humanas

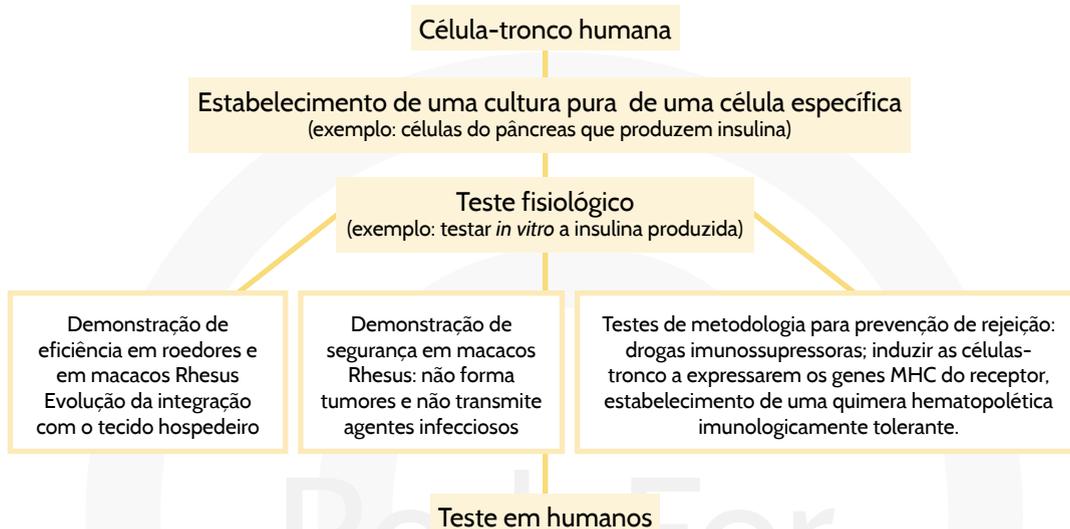


Fig. 10.6 Desenvolvimento de terapias com células-tronco / Fonte: CEPA, adaptado de Strachan

#### a) já estabelecidas em humanos para doenças que afetam o sangue

Atualmente, o transplante de medula é a terapia celular mais bem conhecida, e vem sendo empregada com sucesso em casos de terapia de doenças graves que afetam o sangue, como anemia aplásica grave (doença em que não há formação das células sanguíneas), algumas doenças hereditárias (talassemias) e vários tipos de leucemias (leucemia mieloide aguda, leucemia mieloide crônica, leucemia linfóide aguda). O diagnóstico da doença exige, entre outros exames, a avaliação histológica, citogenética e molecular de células da medula óssea do paciente, que são aspiradas geralmente do osso ilíaco ou do esterno (ou da tíbia, em crianças). Antes do transplante, os pacientes devem ser tratados com altas doses de quimioterápicos e radiação para eliminar as células da medula óssea doente. Esse procedimento é delicado, pois faz com que o número de células sanguíneas seja drasticamente reduzido. O tecido sadio de um doador é então introduzido através de uma veia do receptor e as células migram para a medula óssea. Se o transplante tiver sucesso, em um mês a função da medula será restabelecida. Mesmo assim, o paciente deve receber acompanhamento médico durante um período mínimo de um ano após o transplante, para detecção e tratamento de possíveis complicações.

No caso de transplantes de células-tronco autogênicas não há barreiras imunológicas, uma vez que as próprias células do indivíduo são reintroduzidas. Para viabilizar esse procedimento, é necessário que o indivíduo, apesar de doente, tenha um número suficiente de células-tronco sadias. Essa forma de transplante é utilizada, principalmente, em alguns casos de câncer.

São duas as principais preocupações nos transplantes autogênicos: a obtenção de um número suficiente de células sadias e a eliminação completa das células cancerosas

presentes no organismo do doente. Várias técnicas estão sendo desenvolvidas para essa finalidade, inclusive o uso de drogas especificamente testadas para agir sobre células cancerosas sem efeito sobre as células saudáveis. Os transplantes autogênicos geralmente são bem sucedidos, sendo o principal risco a recorrência.

No transplante alogênico (o doador de células é outra pessoa), o principal risco para o paciente é a ocorrência de rejeição ao tecido transplantado. Quando células são retiradas de um doador e transplantadas em um receptor não gêmeo, vários desses antígenos HLA são diferentes. O sistema imunológico do receptor considera essas células como estranhas e tenta matá-las, e as células do doador também tentam eliminar as células do receptor. É aí que se dá o processo de rejeição. Antes que o transplante ocorra, os tecidos do receptor e do doador em potencial devem ser analisados para verificar a compatibilidade, ou seja, o grau de semelhança, dos antígenos HLA. Como não é fácil, porém, encontrar um doador compatível, muitas vezes são realizados transplantes em que é parcial a compatibilidade HLA entre o doador e o receptor. O grau de disparidade entre os antígenos da superfície celular do doador e do receptor vai determinar a intensidade das reações de rejeição, que podem ser minimizadas com medicamentos. O uso de células-tronco do sangue de cordão umbilical em transplantes é mais vantajoso do que o de medula óssea, por vários motivos: elas se implantam mais eficientemente, são mais tolerantes à incompatibilidade entre receptor e doador, têm disponibilidade imediata e há possibilidade de realização do transplante sem que o doador seja submetido a qualquer tipo de procedimento cirúrgico.

A facilidade de coleta e da análise prévia de antígenos HLA estimulou a criação de Bancos de Sangue de Cordão Umbilical no Brasil, também coordenados pelo Redome. Esses bancos seguem normas rígidas para coleta, processamento e armazenamento dos tecidos de cordão umbilical, definidas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), e a coleta só é realizada se a pessoa estiver ciente da gratuidade da doação e autorizar o possível descarte do material após o prazo seguro para sua utilização.

### b) em fase de experimentação em humanos

Outra fonte de pesquisas interessante é o tratamento de infartos do miocárdio. Nestes casos, há a morte de parte do tecido cardíaco e as células remanescentes não são capazes de reconstituir o tecido morto.

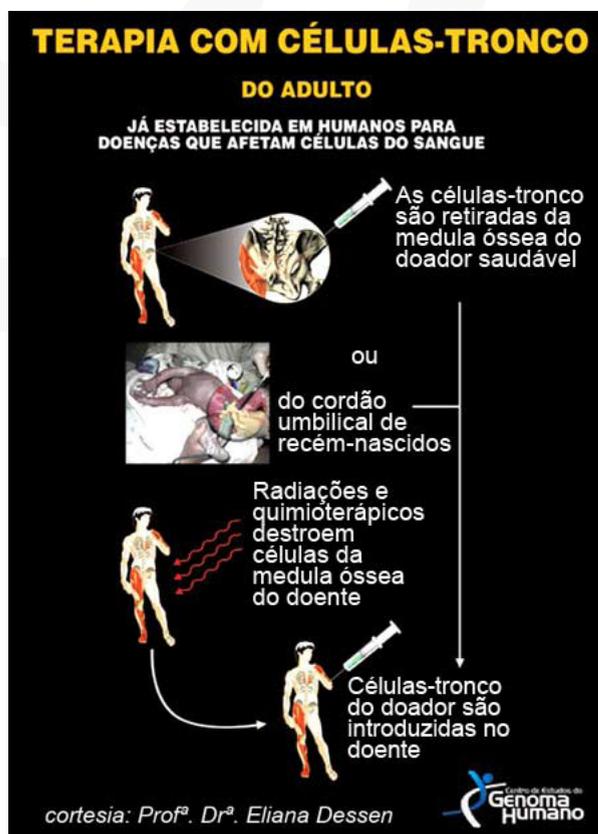


Fig. 10.7 Terapia com células-tronco do adulto - já estabelecida em humanos para doenças que afetam células do sangue / Fonte: adaptado de apostila disponível no site do Centro de Estudos do Genoma Humano - IB/USP

Experimentos indicam que as células-tronco hematopoéticas introduzidas são capazes de migrar para áreas doentes e de originar novas células de músculo cardíaco e de vasos sanguíneos.

O Instituto do Coração (Incor) de São Paulo é um dos hospitais entre poucos outros no país, nos quais estão sendo realizadas aplicações de células-tronco em pacientes com insuficiência cardíaca, causada por doença de Chagas, hipertensão ou de origem desconhecida. Duas técnicas diferentes têm sido utilizadas: a aplicação de células-tronco isoladas da medula óssea e a utilização de um hormônio que estimula a liberação das células-tronco da medula óssea do próprio paciente para a circulação sanguínea – dali as células migram para as áreas lesadas.

As células-tronco também têm sido utilizadas em pesquisas para tratamento de doenças autoimunes, tais como a artrite reumatóide e o lúpus eritematoso sistêmico. Uma equipe do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, da USP (HCFMRP-USP), empregou células-tronco de medula óssea, retiradas do próprio paciente e submetidas à quimioterapia, para transplante.

A quimioterapia destrói as células defeituosas do sistema imune. Os resultados foram animadores e estão sendo agora comparados com os resultados obtidos com a terapia convencional, que não envolve células-tronco. Apesar do entusiasmo dos cientistas e da sociedade com os resultados positivos da terapia celular, é importante lembrar que ainda são necessárias muitas pesquisas (compostas de diversas etapas até o estabelecimento de um novo procedimento médico), financiamentos e discussões no campo político, ético e legal. Este é o cenário ideal para o desenvolvimento dessa nova forma de terapia.

A equipe do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz, da Fiocruz Bahia, realizou em 2003 o primeiro transplante de células de medula óssea em pacientes com insuficiência cardíaca causada pela doença de Chagas, procedimento até então inédito no mundo.

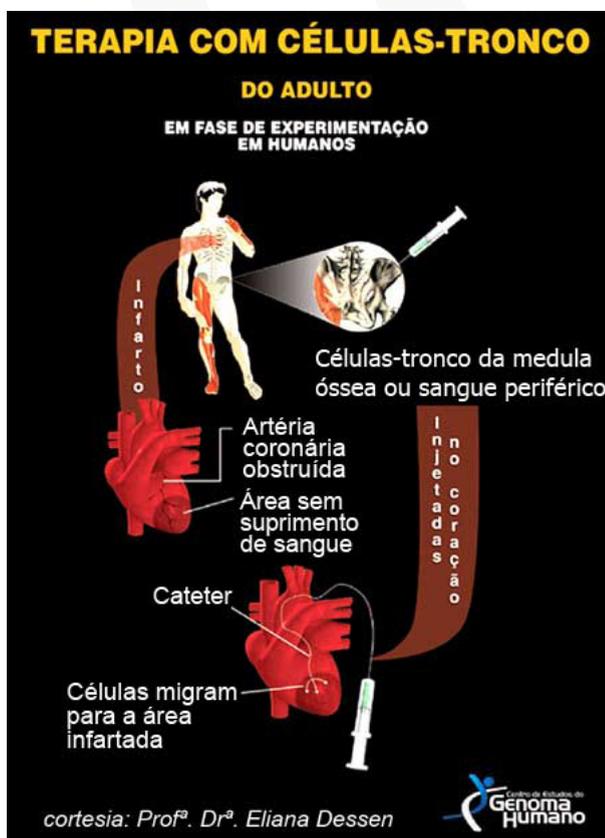


Fig. 10.8 Terapia com células-tronco do adulto – em fase de experimentação em humanos / Fonte: adaptado de apostila disponível no site do Centro de Estudos do Genoma Humano – IB/USP

## II. Terapia com células-tronco embrionárias em fase de experimentação em animais

### CÉLULAS IPS- *INDUCED PLURIPOTENT STEM-CELLS*

Em 2007, dois grupos independentes de pesquisadores liderados por Shinya Yamanaka, da Universidade de Kioto no Japão, e James Thomson, nos Estados Unidos, mostraram que seria possível reprogramar células adultas - fibroblastos retirados da pele - e fazê-las voltar ao estágio de células-tronco embrionárias através da ativação de alguns genes. Essas células reprogramadas foram chamadas de IPS- do inglês *induced pluripotent stem-cells*. A técnica que foi iniciada em camundongos foi, posteriormente, replicada com células humanas e hoje ela já é rotina em vários laboratórios ao redor do mundo. A grande vantagem dessa estratégia é a de que ela não requer óvulos humanos, que além de difíceis de serem obtidos, estão associados a problemas éticos, tais como o comércio de óvulos. Essa tecnologia que substitui a clonagem terapêutica tem uma aplicação extraordinária em doenças genéticas. Não sabemos ainda se as células IPS poderão ser usadas em terapia celular, mas para pesquisas elas têm um potencial fantástico. A partir da célula de um paciente com uma doença genética, é possível derivar várias linhagens celulares, permitindo estudos que seriam praticamente impossíveis no ser humano. Por exemplo, por que um defeito em um determinado gene afeta um tecido e não outro? Como o gene defeituoso se expressa nos diferentes tecidos? Por que pessoas com a mesma mutação podem ter quadros clínicos tão diferentes? Além disso, as linhagens celulares derivada de células IPS permitem testar diferentes estratégias para corrigir uma mutação genética através de terapia gênica ou agentes farmacológicos.

A descoberta das células IPS foi defendida por muitos como uma alternativa ao uso das CTE. Tomara que isso seja verdade. Entretanto, em 2010, os cientistas ainda estão convencidos de que temos muito ainda a aprender com essas células. Por outro lado, também não podemos acreditar que as células-tronco vão curar todas as doenças humanas. As pesquisas que estão sendo realizadas agora serão fundamentais para responder a questões sobre o potencial das células-tronco adultas em comparação com as embrionárias e as IPS, que doenças poderão ser tratadas e quais são os benefícios e riscos da terapia celular.

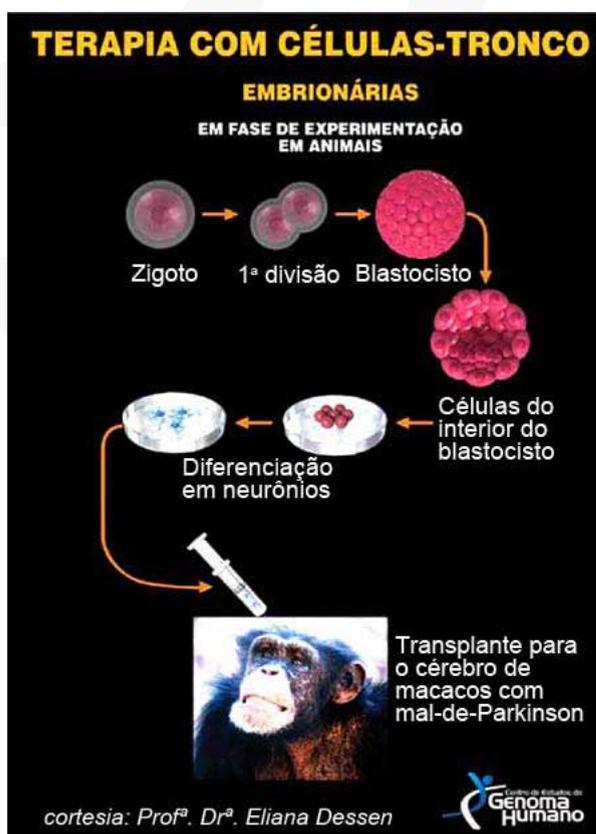


Fig. 10.9 Terapia com células-tronco embrionárias - em fase de experimentação em animais / Fonte: Adaptado de apostila disponível no site do Centro de Estudos do Genoma Humano - IB/USP

### REPROGRAMANDO CÉLULAS PARA A PLURIPOTÊNCIA: CÉLULAS PLURIPOTENTES INDUZIDAS (iPS)

Eliana Dessen - Apostila da disciplina Biologia Molecular para Licenciatura - BIO 0441

A primeira derivação de células-tronco embrionárias humanas ocorreu logo após a publicação da primeira clonagem de mamíferos. Embora animais clonados vivos sejam relativamente raros, blastocistos obtidos por transferência de núcleo somático podem ser usados para gerar células-tronco embrionárias em camundongos (Figura 1). Excitamento e controvérsia acompanharam a possibilidade de replicar esse resultado com células humanas: excitamento por causa das perspectivas de uso de células-tronco em terapia personalizada e também pela possibilidade de gerar células-tronco, obtidas de pessoas com doenças genéticas, o que permitiria estudar os mecanismos dessas doenças *in vitro*; controvérsia por causa da possível conexão com a clonagem reprodutiva humana, os problemas éticos sobre a doação de óvulos, e a deliberada criação e destruição de embriões humanos. Entretanto, embora células-tronco embrionárias de primatas tenham sido obtidas pela técnica da transferência somática de núcleo, nenhum sucesso com células humanas foi relatado até o momento. Mesmo em camundongo, o número de ovócitos necessários para gerar células-tronco pela técnica de transferência de núcleo somático é muito grande. Em humanos, a dificuldade de obtenção de ovócitos em grande número tem sido um impedimento para qualquer progresso real nessa área.

Todo esse quadro mudou em 2006, quando Takahashi e Yamanaka publicaram o primeiro artigo, mostrando que era possível transformar fibroblastos da cauda de camundongos em células que apresentavam muitas das propriedades das células-tronco embrionárias desse organismo, por meio da inserção e expressão, mediada por retrovírus, de quatro

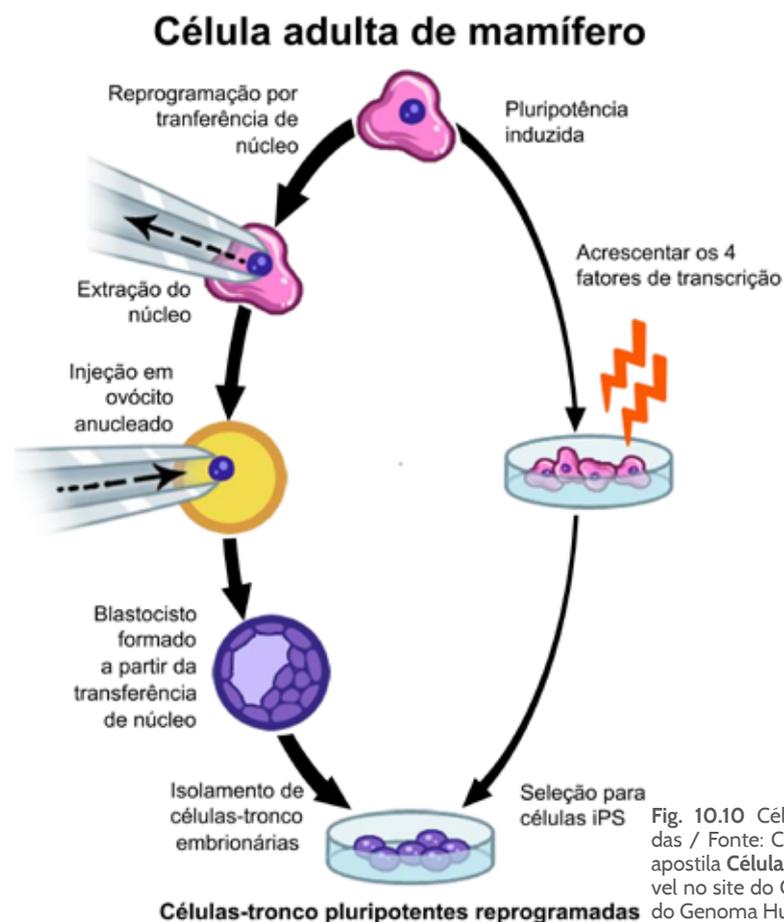


Fig. 10.10 Células reprogramadas / Fonte: CEPA, adaptado da apostila Células-tronco, disponível no site do Centro de Estudos do Genoma Humano - IB/USP.

genes que codificam fatores de transcrição: Oct4, Sox2, cMyc e Klf4 (Figura 10.7). Essas células reprogramadas foram denominadas iPS, células pluripotentes induzidas.

A primeira geração de células iPS era semelhante, e não idêntica às células-tronco embrionárias. Entretanto, em pesquisas posteriores, foram obtidas células iPS com padrão de expressão gênica e padrão epigenético mais semelhantes às células-tronco embrionárias.

### ESTÁGIOS INTERMEDIÁRIOS DE REPROGRAMAÇÃO

A reprogramação induzida de fibroblastos pela adição de fatores de transcrição é um processo gradual, que leva cerca de 2 semanas. Durante esse período, ocorre proliferação celular em cultura, os genes marcadores de fibroblastos são silenciados, enquanto os genes endógenos de pluripotência são progressivamente ativados, ao mesmo tempo em que ocorre o silenciamento dos transgenes inseridos pelo retrovírus. Entretanto, nem todas as células transformadas atingem o estágio final de reprogramação e permanecem num estágio intermediário entre a pluripotência e a célula diferenciada, ou seja, de reprogramação parcial.

Nas células parcialmente reprogramadas, os transgenes retrovirais, que são geralmente usados, não estão silenciados e os genes endógenos característicos de pluripotência mostram um padrão incompleto de desmetilação de seus promotores, estando, portanto, inativos ou com baixos níveis de transcrição.

### AValiação DE CÉLULAS IPS

Os pesquisadores ainda não chegaram a um acordo com relação a como avaliar se uma linhagem de células é ou não iPS. O teste mais rigoroso envolve a inserção das células reprogramadas em um embrião de camundongo, implantá-lo numa mãe de aluguel, deixar o camundongo quimérico se desenvolver até o estado adulto, aguardar para ver se o indivíduo produz gametas e se são capazes de produzir descendentes saudáveis. A habilidade de produzir um novo embrião mostra que os parâmetros biológicos das células iniciais foram reprogramados. Tais testes são eticamente inaceitáveis em humanos, de modo que o ensaio-padrão, emprestado das células-tronco embrionárias, envolve a injeção de células humanas em camundongos imunodeprimidos e a espera de seis a oito semanas para verificar se as células formam um teratoma. Teratomas de ocorrência natural podem crescer na forma de vários tecidos diferenciados, inclusive cabelo e osso, mas, para as células transplantadas ganharem o selo iPS, os pesquisadores precisam ver uma massa de células indiferenciadas representando todas as principais classes de tecidos. É comum que células, que parecem totalmente reprogramadas em termos de morfologia e de marcadores de superfície, não formem teratomas.

### EMPREGO DE CÉLULAS IPS

O potencial de aplicações das células iPS é enorme, mas a tecnologia está ainda na sua infância. Para perceber todas as possibilidades de aplicação das iPs, é essencial melhorar as metodologias, para geração de células iPS e para avaliar precisamente cada clone e cada subclone quanto à sua eficiência e segurança. As possibilidades de aplicação das células iPs são praticamente as mesmas das células-tronco embrionárias – inclusive o potencial para terapia celular, triagem de drogas e modelo para estudo de doenças – sem a maioria dos problemas éticos apresentados. Grupos ligados a direitos humanos rapidamente sugeriram que células iPS humanas tornaram desnecessárias as pesquisas com células-tronco embrionárias humanas, uma asserção que foi prontamente contestada por Yamanaka, que apontou que células-tronco embrionárias humanas ainda são necessárias

para serem usadas como padrão para se medir o progresso no desenvolvimento da tecnologia de desenvolvimento de células iPS.

Aplicadas ao tratamento de doenças humanas, as células iPS são potencialmente mais úteis que as células-tronco embrionárias. Elas podem ser retiradas de um paciente, manipuladas de modo que produza células terapêuticas e, então, ser retornadas para o mesmo indivíduo sem o risco de rejeição. Além disso, células iPS que não conseguem formar teratomas, mas que podem gerar hepatócitos, por exemplo, devem ser melhores para pesquisas relacionadas ao tratamento de doenças do fígado e mais seguras para o uso clínico. Yamanaka acredita que células iPS estarão sendo usadas para triagem de drogas e testes de toxicidade dentro de 3 a 4 anos. As tentativas clínicas devem ocorrer em 10 anos.

Quatro diferentes grupos de pesquisa geraram células iPS a partir de células de pacientes com doenças neurodegenerativas – esclerose amiotrófica lateral, atrofia musculoespinhal, doença de Parkinson – e de uma variedade de doenças genéticas de herança complexa ou mendeliana. Em camundongo, os pesquisadores já chegaram ao próximo passo, gerando células sanguíneas e nervosas e usando-as para tratar camundongos com anemia falciforme e mal de Parkinson. Células iPS de pacientes com doenças genéticas representam um suprimento sem limites de células para o estudo dessas doenças.

Em camundongos, as quimeras adultas obtidas a partir de células iPS mostram competência para a transmissão da linhagem germinativa; entretanto, as quimeras e seus descendentes frequentemente desenvolvem tumor, os quais, em alguns casos devem ser causados pela reativação do oncogene cMyc. É possível gerar células iPS sem a inserção retroviral de cMyc, porém com baixa eficiência. Além disso, a integração retroviral dos outros fatores de transcrição pode ativar ou inativar genes da célula hospedeira.

O estudo de células iPS é uma oportunidade para esclarecer as funções dos fatores de transcrição, fatores de remodelamento da cromatina e de miRNAs que atuam na pluripotência.

## Glossário

*Adaptado da apostila USP vai à sua escola - parte 4.*

**Bioética:** O estudo dos problemas éticos suscitados pelas pesquisas biológicas e pelas suas aplicações por pesquisadores, médicos etc.

**Blastocisto:** embrião, em fase de pré-implantação no útero, com cerca de 150 células produzidas por divisão celular após a fertilização. O blastocisto é uma esfera formada por uma camada externa de células (o trofoblasto), uma cavidade (a blastocele) que contém em seu interior um conjunto de células denominado massa interna de células.

**Célula-tronco:** célula capaz de se dividir por períodos indefinidos sem dar origem a células especializadas. **Nota sobre a nomenclatura células-tronco:** (*A nova fronteira da Medicina. Organizador: Marco Antonio Zago e Dimas Tadeu Covas. Ed. Atheneu*) Apesar de estranha à língua portuguesa, a denominação “célula-tronco” se impôs nos últimos anos na imprensa e nos meios científicos nacionais. O termo constitui uma tradução literal do inglês “stem cell”. As línguas latinas têm expressões que descrevem melhor sua função primordial: célula madre (castelhano), cellula staminale (italiano) e cellule souche (francês). Em Portugal, há uma forte tendência para utilizar as expressões célula-mãe ou célula estaminal, que estariam mais de acordo com a índole de nossa língua.

**Célula-tronco do adulto:** célula indiferenciada encontrada em tecidos que pode se renovar (com certas limitações) e se diferenciar em todas as células especializadas do tecido do qual foi originada. Célula-tronco do adulto é também denominada célula-tronco adulta, ou tecidual.

**Células-tronco de cordão umbilical:** células-tronco coletadas do cordão umbilical imediatamente após o nascimento podem produzir todos os tipos de células sanguíneas. As células-tronco de cordão umbilical são normalmente usadas para tratar pacientes com câncer ou outras doenças do sangue, após sofrerem quimioterapia para destruir sua própria medula óssea.

**Célula-tronco embrionária:** célula indiferenciada encontrada no embrião, que tem o potencial para se diferenciar numa ampla variedade de células especializadas.

**Célula-tronco hematopoiética:** célula-tronco que origina todas as células do sangue: hemácias, glóbulos brancos (todos os tipos) e plaquetas.

**Célula pluripotente:** célula capaz de gerar os três tipos de células germinativas (ectoderme, mesoderme e endoderme), ou seja, tem o potencial para se desenvolver nos mais de 200 tipos celulares conhecidos do corpo humano.

**Célula-progenitora:** derivada da célula-tronco e que dará origem a células diferenciadas.

**Célula totipotente:** capaz de dar origem aos tecidos que formarão o embrião. Ex.: zigoto.

**Célula-tronco unipotente:** capaz de dar origem a uma única linhagem de células diferenciadas.

**Clonagem reprodutiva:** o objetivo da clonagem reprodutiva é a criação de um animal idêntico ao doador do núcleo da célula somática. O embrião é implantado no útero e se desenvolve em um ser vivo. O primeiro animal a ser criado por clonagem reprodutiva foi a ovelha Dolly, nascida no Instituto Roslin, na Escócia, em 1996.

**Clonagem terapêutica:** a meta da clonagem terapêutica é a criação de células perfeitamente compatíveis com as do paciente no qual elas serão injetadas. Nessa técnica, os cientistas combinam o núcleo de uma célula somática do paciente com uma célula-ovo, da qual o núcleo foi retirado. Essa nova célula, ao se dividir, origina células-tronco embrionárias, que são coletadas e usadas para gerar tecidos que são compatíveis com o organismo do paciente, isto é, o tecido formado não causará rejeição quando transplantado.

**Clone:** geração de cópias idênticas de uma molécula, célula ou organismo.

**Cultura de células:** crescimento de células *in vitro* em um meio artificial para experimentos em laboratório.

**Diferenciação celular:** é o processo através do qual uma célula não especializada se torna especializada.

**Ectoderma:** folheto embrionário mais externo, formado por células derivadas da camada interna do blastocisto, origina o sistema nervoso, órgãos do sentido, pele e estruturas relacionadas.

**Embrião:** em humanos, o organismo em desenvolvimento a partir da fertilização até o final da oitava semana de gestação, quando então passa a ser chamado de feto.

**Endoderma:** folheto embrionário com posição mais interna, formado por células derivadas da camada interna do blastocisto, origina os pulmões e outras estruturas respiratórias, e os órgãos do aparelho digestório.

**Ética:** Estudo dos juízos de apreciação referentes à conduta humana suscetível de qualificação do ponto de vista do bem e do mal, seja relativamente a determinada sociedade seja de modo absoluto.

**Feed layer:** Células usadas em cocultura para manter as células-tronco embrionárias. Para o cultivo de células-tronco embrionárias, são incluídos na cultura fibroblastos de embrião de camundongo ou humanos, que foram tratados de modo a impedir sua divisão.

**Fertilização *in vitro*:** técnica que une ovócito e espermatozoide em laboratório.

**Gene:** unidade funcional de herança, que corresponde a um segmento de DNA nos cromossomos. O gene é uma unidade de transcrição.

***In vitro*:** denominação em latim para “dentro de vidro”, ou em “tubo de ensaio” em experimentos de laboratório, um meio artificial, fora do organismo.

**Marcadores de superfície:** proteínas presentes na superfície externa da célula e que são únicas para determinados tipos celulares. Elas podem ser detectadas por meio de anticorpos e outros métodos de detecção.

**Massa interna de células:** grupo de células dentro do blastocisto. Essas células dão origem ao embrião e finalmente ao feto. A partir dessas células são geradas as linhagens de células-tronco embrionárias.

**Meio de cultura:** líquido que cobre as células numa placa de cultura e que contém nutrientes para alimentar as células. O meio pode também incluir outros fatores adicionados para produzir mudanças nas células.

**Mesoderma:** folheto embrionário com posição mediana, formado por células derivadas da camada interna do blastocisto, origina os ossos, músculos, tecido conectivo, rins e estruturas relacionadas.

**Microambiente:** moléculas e compostos, tais como nutrientes e fatores de crescimento no fluido que rodeia a célula, num organismo ou no laboratório, e que têm um importante papel na determinação das características da célula.

**Passagem:** um ciclo de crescimento celular e proliferação em cultura.

**Plasticidade:** é a capacidade de uma célula-tronco adulta de um tecido gerar uma célula(s) especializada(s) de um outro tecido. Por exemplo, já foi demonstrado *in vitro* que células-tronco hematopoiéticas são capazes de gerar neurônios. Sinais – fatores internos e externos que controlam as mudanças na estrutura e função das células

**Terapia celular ou medicina regenerativa:** tratamento no qual as células-tronco são induzidas em tipos celulares específicos, necessários para reparar tecidos danificados ou substituir células que foram destruídas.

**Teratoma:** os cientistas comprovam se eles conseguiram obter uma linhagem de células-tronco embrionárias, injetando essas células em camundongo com o sistema imune reprimido. Uma vez que elas não podem ser destruídas pelo sistema imune do camundongo, elas sobrevivem e formam um tumor benigno, com muitas camadas, denominado teratoma. Mesmo que a formação de tumores não seja normalmente desejada, nesse teste, os teratomas servem para verificar a capacidade das células-tronco de originar todos os tecidos celulares. Isso porque os teratomas contêm todos os tipos celulares derivados das três camadas germinativas do embrião.

**Trofoblasto:** tecido extraembrionário, responsável pela implantação, desenvolvimento em placenta, e controle das trocas de oxigênio e metabólitos entre a mãe e o embrião.

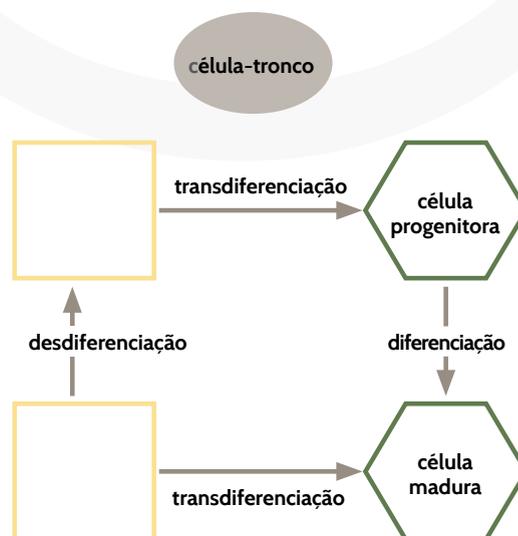


Fig. 10.11 Diferenciação. Fonte: CEPA, adaptado de apostila disponível no site do Centro de Estudos do Genoma Humano – IB/USP.

## Referências Bibliográficas

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Biologia molecular da célula**. 4ª Edição. Editora: Artmed®.

STRACHAN T. & READ P. A. **Genética Molecular Humana**. 2ª Ed. Editora: Artmed®.

TURNPENNY P. & ELLARD S. **Emery Genética Médica**. 13ª Ed. Editora: Elsevier

WATSON J. D.; MYERS R. M.; WITKOWSKI C. A. A. ; JAN A. **Dna Recombinante - Genes e Genomas**. 3ª Ed. Editora: Artmed®.

WILLIAM S. KLUG, MICHAEL R. CUMMINGS, CHARLOTTE A. SPENCER e MICHAEL A. PALLADINO. **Conceitos De Genética**. 9ª Ed. Editora: Artmed®.



### Atividades

#### Questionário

Retome a figura 10.1.

1. Qual a diferença principal entre a clonagem reprodutiva (B) da terapêutica (C)?
2. Se, no esquema B, a célula diferenciada for de um camundongo preto macho e o ovócito for de um camundongo branco fêmea, qual será o fenótipo do camundongo clonado?
3. Se as células sanguíneas produzidas no esquema C forem implantadas no mesmo indivíduo que doou a célula diferenciada, esse indivíduo pode desenvolver uma rejeição a essas células sanguíneas? Por quê?