

Terapias Celulares

Autores: Rosalia Mendez-Otero (1, 2)

Camila Zaverucha-do-Valle (1,2)

Luiz E. A. Mello (3)

Antonio Carlos Campos de Carvalho (1,2)

Afiliações:

(1) Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho/UFRJ

(2) Programa de Terapias Celulares/UFRJ

(3) Departamento de Fisiologia, Universidade Federal de São Paulo

1. Células tronco

Os estudos experimentais com células tronco iniciaram-se após a exposição de populações civis a doses letais de radiação em 1945. Para reproduzir a síndrome, começaram a ser feitos experimentos com camundongos irradiados e, em 1956, alguns grupos mostraram que o transplante de medula óssea protegia esses animais contra os efeitos da radiação.

Em 1961, Till e McCulloch demonstraram a existência de células precursoras da medula óssea capazes de gerar colônias hematopoiéticas de múltiplas linhagens no baço. A partir daí, foram descobertas as células tronco hematopoiéticas (HSC, do inglês *hematopoietic stem cells*), que dão origem a todas as células do sangue e do sistema imunitário. Em 1986, essas células foram isoladas com a utilização de anticorpos monoclonais contra antígenos de superfície (Muller-Sieburg e cols. 1986). Estes marcadores foram encontrados em algumas, mas não em todas as HSCs e, através da combinação de marcadores positivos e negativos, foram separadas as células com atividade de precursores.

As células tronco são células capazes de auto-renovação e diferenciação em múltiplas linhagens. Em vertebrados, o zigoto é a célula tronco totipotente,

capaz de gerar todas as células do organismo, além das células que sustentam o desenvolvimento do embrião no útero.

Quatro ou cinco dias após a fecundação, forma-se o blastocisto, composto pelo trofoblasto e pelas células da massa interna. A partir da massa interna são obtidas as chamadas células tronco embrionárias (ES, do inglês *embryonic stem cells*), de caráter pluripotente, capazes de gerar células dos três folhetos embrionários – endoderma, mesoderma e ectoderma – quando implantadas em um embrião para formar um animal quimérico.

As células embrionárias, quando mantidas em cultura na presença de um tapete de fibroblastos ou do fator inibidor de leucemia (LIF, do inglês *leukemia inhibitory factor*), podem gerar linhagens celulares, dividindo-se indefinidamente *in vitro*. Quando fatores tróficos são retirados do meio de cultura, estas células em altas densidades, formam os chamados corpos embrióides em suspensão, contendo células indiferenciadas e diferenciadas.

A primeira linhagem de células tronco embrionárias humanas só foi desenvolvida em 1998 pelo pesquisador americano James Thomson. Estas células se mantinham indiferenciadas em cultura na presença dos fatores tróficos (auto-renovação) e formavam teratomas (tumores com células de todos os folhetos embrionários) quando injetadas sob a pele de animais imunodeficientes (camundongos nude) o que demonstrava a sua pluripotencialidade. Além disto estes pesquisadores mostraram que estas células não apresentavam alterações cromossômicas mesmo quando mantidas por muito tempo em cultura e expressavam vários marcadores *in vitro* (Thomson e cols. 1998).

Células tronco pluripotentes podem ser obtidas, também, a partir de células germinativas (EG, do inglês *embryonic germ cell*) e a partir de teratocarcinomas (células EC, do inglês *embryonic carcinoma cell*). As células germinativas embrionárias podem ser isoladas através das células germinativas primordiais de gônadas de fetos de 5 a 10 semanas e também não apresentam alterações cromossômicas. Diferenciam-se das células ES por se manterem por menos

tempo em cultura, mas são de interesse em possíveis terapias celulares porque apresentam menor potencial teratocarcinogênico.

As células de carcinomas embrionários (EC) são células tronco provenientes de teratocarcinomas. Estes tumores formam-se a partir de uma forma maligna de célula germinativa primordial e, em humanos, geralmente ocorrem em testículos de homens jovens.

As células de carcinomas embrionários proliferam extensivamente *in vitro*, mantendo-se indiferenciadas mesmo em altas densidades e, ao contrário das células ES e das células EG, apresentam alterações cromossômicas. As células de carcinomas embrionários têm potencial de diferenciação menor que o das células ES tanto *in vitro* quanto *in vivo* (Andrews, 1998), mas, apesar disso, já vêm sendo utilizadas em testes clínicos nos Estados Unidos.

Durante o desenvolvimento dos vertebrados, as camadas germinativas embrionárias do ectoderma, do mesoderma e do endoderma participam da formação dos tecidos e da organogênese. Acredita-se, então, que essa formação seja orientada por células tronco específicas de cada tecido.

Estas células, multipotentes, existem durante a vida embrionária e podem gerar vários tipos celulares do tecido com o qual estão comprometidas. Além disso, em alguns tecidos, essas células permanecem no organismo adulto, onde participam da regeneração e do reparo tecidual. Desta forma, a função primordial das células tronco adultas parece ser a de manter a homeostase do tecido, substituindo células que morrem no decorrer da vida de um indivíduo (Holtzer, 1978).

As células tronco adultas são células indiferenciadas presentes em um tecido diferenciado. Estas células são capazes de auto-renovação durante toda a vida do organismo e já foram identificadas, além da medula óssea, na córnea, na retina, no fígado, na pele, no trato gastrointestinal, no pâncreas, no músculo esquelético, no coração e no cérebro (Fuchs e Segre, 2000; Watt, 1998; Reynolds e Weiss, 1992). As células tronco adultas em geral dão origem, por

divisão assimétrica, a uma outra célula tronco adulta e a uma célula progenitora que, por sua vez, dará origem a uma célula madura diferenciada.

As células tronco adultas são bastante raras e estima-se, por exemplo, que 1 em 10000 células da medula óssea seja uma célula tronco hematopoiética (Weissman, 2000). As células tronco adultas estão dispersas em vários tecidos do animal e atuam diferentemente de acordo com o ambiente em que estão localizadas. Enquanto as células tronco hematopoiéticas dividem-se constantemente, originando células da linhagem hematopoiética, as células tronco do intestino delgado encontram-se em estado quiescente (Domen e Weissman, 1999; Slack, 2000).

Como as células tronco adultas são raras, elas são difíceis de se identificar, isolar e purificar. Além disso, elas em geral não são capazes de proliferar em um estado indiferenciado por longos períodos de tempo *in vitro*, o que dificulta sua utilização. Apesar disso, as células tronco adultas são importantes ferramentas para terapias celulares, podendo ser utilizadas para regenerar órgãos e tecidos

2. Terapias Celulares

Com o aumento da expectativa de vida das populações de uma forma geral estima-se que também aumente o número de indivíduos afetados por doenças crônico-degenerativas. Estas doenças representam um enorme custo social além de um considerável gasto nos sistemas de saúde. As terapias celulares tem sido consideradas como uma possível alternativa para oferecer cura e/ou interrupção da progressão de algumas dessas doenças para as quais a medicina atual não oferece recursos terapêuticos.

Estima-se que o mercado para produtos e serviços que envolvam terapias celulares seria de cerca de US\$ 24,6 bilhões em 2005 e que possa chegar a US\$ 68,9 bilhões em 2010. Nos EUA, onde a legislação permite patentear linhagens celulares e tecnologias que envolvam o uso de células tronco, já foram concedidas mais de 2.000 patentes relevantes para uso em doenças e há mais de 100 companhias que detem patentes relacionadas ao uso de terapias

celulares em humanos. Se algumas destas linhagens patenteadas se tornar uma terapia nos veremos na situação de ter que pagar para utilizar estas células. Por outro lado, no Brasil a legislação não permite patentear estas células o que significa que qualquer terapia aqui gerada seria gratuita para os pacientes.

Como já foi visto, há muitas diferenças entre os diferentes tipos de células tronco e a seguir discutiremos brevemente as perspectivas do uso dos diferentes tipos celulares para fins terapêuticos.

2.1. Terapias com Células Tronco Embrionárias

No momento, não há ainda protocolos clínicos que utilizem células tronco embrionárias para fins terapêuticos. Várias razões podem ser levantadas para explicar este fato. Uma destas questões, e talvez a mais difícil de ser resolvida, é a questão de segurança destas células. Estudos em modelos animais mostraram que frequentemente estas células quando transplantadas para um determinado órgão formavam teratomas ou teratocarcinomas devido a sua pluripotencialidade. É portanto necessário, antes de se partir para protocolos clínicos, ter segurança de que estas células uma vez injetadas em um determinado tecido darão origem apenas as células daquele tecido. Isto só poderá ser resolvido com mais estudos sobre a biologia celular e molecular destas células. Vários fatores contribuíram para que o conhecimento sobre a biologia celular e molecular das células tronco embrionárias seja ainda escasso. O primeiro fator, pode ser o fato de que a primeira linhagem de células tronco embrionárias humanas só foi isolada em 1998. Mas talvez o que mais tenha contribuído para a pouca investigação que tem sido feita com estas células (e portanto para o pouco conhecimento científico que temos sobre elas) são as questões éticas e legais que envolvem o uso destas células para pesquisa.

Como as linhagens são obtidas geralmente a partir de blastocistos doados uma série de questões éticas tem sido levantadas e discutidas. A questão ética resulta na legislação e a legislação determina o financiamento em

relação a estas pesquisas que por sua vez resulta no avanço ou não do conhecimento científico.

Diferentes países adotaram diferentes legislações em relação à possibilidade de criar ou não novas linhagens, testar novas tecnologias (como transferência nuclear) ou patentear ou não estas células. As pesquisas sobre as células embrionárias e o seu potencial uso terapêutico avançam então de forma heterogênea dependendo da legislação daquele país (ou daquele estado, como é o caso do Estado da Califórnia, que tem uma legislação diferente do restante dos EUA) e da quantidade de investimento aplicado para esta finalidade. No Brasil, somente no final de 2005 foi aprovada e regulamentada a lei de Biosegurança que regulamenta o uso de células embrionárias humanas em pesquisa e portanto o conhecimento sobre estas células no nosso país é escasso.

2. 2. Terapias Celulares com Células Tronco Adultas

Terapias celulares com células tronco de medula óssea fazem parte da prática médica há mais de 30 anos e são utilizadas para tratar pacientes com doenças hematológicas e do sistema imune.

Mais recentemente as células tronco de medula óssea tem sido utilizadas para terapias celulares de outros sistemas ou órgãos como veremos em vários capítulos a seguir.

A medula óssea possui duas populações de células tronco que co-existem de maneira funcionalmente interdependente: as células tronco hematopoiéticas e as células tronco de estroma de medula óssea e são estas que vem sendo utilizadas em diversas terapias celulares.

Atualmente, a grande controvérsia sobre o uso de células tronco adultas em terapias celulares diz respeito à capacidade de transdiferenciação destas células nas células especializadas do órgão que se quer regenerar. A partir de 1998 diversos trabalhos sugeriram que células tronco adultas, principalmente aquelas derivadas da medula óssea, teriam capacidade de transdiferenciação em

qualquer tipo celular de um organismo adulto, se colocadas em um (micro) ambiente adequado. A hipótese da transdiferenciação foi amplamente difundida, até que trabalhos pioneiros em regeneração hepática, em 2002, demonstraram que o que parecia ser transdiferenciação de uma célula hematopoiética era, em verdade, resultado de um processo de fusão desta célula com um hepatócito. A partir de então assistimos a um extenso número de publicações demonstrando, principalmente através de técnicas moleculares, que não ocorre transdiferenciação de células tronco adultas *in vivo*. Embora nestas publicações o mecanismo de transdiferenciação fosse contestado, nos poucos trabalhos em que se realizaram simultaneamente testes funcionais, demonstrou-se recuperação parcial da função nos órgãos afetados após a terapia com células tronco adultas.

Em resumo, podemos concluir que embora as células tronco adultas não possam regenerar diretamente as células de um órgão lesado (assumindo que estas células tronco não sejam retiradas do próprio órgão lesado, caso em que esta capacidade seria preservada), elas recuperam parcialmente a função dos órgãos lesados por mecanismos ainda não totalmente compreendidos, mas que provavelmente envolvem a secreção de vários fatores (citocinas, fatores de crescimento, fatores anti-apoptóticos, etc) pelas células injetadas. Este efeito parácrino tem sido cada vez mais valorizado, até mesmo porque as células injetadas parecem ter uma sobrevivência no órgão lesado que nunca ultrapassa algumas poucas semanas. Neste caso, o sonho da verdadeira regeneração tecidual, que perseguimos desde a lenda de Prometeus, ficará restrito ao uso das células tronco retiradas do próprio órgão lesado – na maioria dos casos uma estratégia altamente inadequada para qualquer terapia que se imagine – e para as células tronco embrionárias, as verdadeiras células pluripotentes. No entanto este sonho só se realizará quando e se conseguirmos vencer todos os problemas associados ao controle da proliferação e diferenciação celulares das versáteis mais perigosas células tronco embrionárias o que só poderá ocorrer se as pesquisas com estas células puderem ser feitas no nosso país.

Bibliografia:

Andrews, P.W. (1998) Teratocarcinomas and human embryology: pluripotent human EC cell lines. *APMIS*, 106: 158-167.

Domen, J. ,Weissman, I.L. (1999) Self-renewal, differentiation or death: regulation and manipulation of hematopoietic stem cell fate. *Molecular Medicine Today*, 5: 201-208.

Fuchs, E. ,Segre, J.A. (2000) Stem cells: a new lease on life. *Cell*, 100: 143-155.

Holtzer, H. (1978) Cell lineages, stem cells and the "quantal" cell cycle concept. In: *Stem cells and tissue homeostasis*. (ed. by B.I. Lord, C.S. Potten & R.J. Cole), pp. 1-28. Cambridge University Press, Cambridge.

Muller-Sieburg, C.E., Whitlock, C.A. ,Weissman, I.L. (1986) Isolation of two early B lymphocyte progenitors from mouse marrow: a committed pre-pre-B cell and a clonogenic Thy-1-lo hematopoietic stem cell. *Cell*, 44: 653-662.

National Institutes of Health. (2001). **STEM CELLS: SCIENTIFIC PROGRESS AND FUTURE RESEARCH DIRECTIONS**. Retirado do National Institutes of Health na World Wide Web:

<http://stemcells.nih.gov/StaticResources/info/scireport/PDFs/frontmatter.pdf>

Reynolds, B. ,Weiss, S. (1992) Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science*, 255: 1707-1710.

Slack, J.M. (2000) Stem cells in epithelial tissues. *Science*, 287: 1431-1433.

Thomson, J.A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S.S., Waknitz, M.A., Swiergiel, J.J., Marshall, V.S., Jones, J.M. (1998) Embryonic stem cells lines derived from human blastocysts. *Science*, 282: 1145-1147.

Watt, F.M. (1998) Epidermal stem cells: markers, patterning and the control of stem cell fate. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 353: 831-837.

Weissman, I.L. (2000) Stem cells: units of development, units of regeneration, and units of evolution. *Cell*, 100: 157-168