



Células-tronco: fatos, ficção e futuro.

Nance Beyer Nardi

Departamento de Genética, UFRGS, nardi@ufrgs.br

O conceito básico de células-tronco

Nosso organismo pode ser visto como um conjunto de órgãos - coração, pulmões, fígado etc - que, interagindo entre si e com o meio ambiente, garantem o bom funcionamento do todo. Cada um destes 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 designado “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, apesar de que, mais recentemente, mesmo para estas foi observada a existência de renovação celular.

Vemos assim que, mesmo após 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 desse 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 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.

A célula-tronco embrionária

Verifica-se, algumas vezes, certa confusão na compre-

ensão do conceito de célula-tronco embrionária (CTE). Para compreender a identidade desta célula, é importante localizarmos o estágio de desenvolvimento em que ela ocorre.

A CTE é coletada do embrião em seus estágios bem iniciais de formação, cerca de 5 dias após sua formação, quando o embrião se encontra no estágio de blastocisto, formado por dois grupos principais de células. O mais externo é denominado trofoblasto e compõe-se de células que formarão a placenta e outros tecidos que irão nutrir o embrião propriamente dito. O segundo, denominado massa celular interna ou botão interno, composto por menos de 100 células, originará o embrião propriamente dito. Quando nos referimos à célula-tronco embrionária, estamos falando de uma dessas células do botão interno. As células do botão interno do blastocisto são muito semelhantes. Se separarmos qualquer uma delas e as colocarmos nas condições apropriadas, elas serão capazes de originar qualquer dos múltiplos tipos celulares de um organismo completo - epitélio, músculo, neurônio etc. Como uma dessas células é capaz de gerar qualquer um dos tipos de células que compõem o organismo adulto, elas são ditas pluripotentes.

A célula-tronco do adulto

O conceito de CT inicialmente apresentado referia-se principalmente à célula-tronco do adulto (CTA), que se encontra assim parcialmente definida. O termo mais adequado para essa categoria seria “célula-tronco não embrionária”, já que nela estão incluídas todas as células-tronco existentes após a fase de blastocisto.

As pesquisas desenvolvidas nos últimos poucos anos resultaram na descoberta de uma grande variedade de tipos de células-tronco do adulto. As células-tronco hematopoiéticas, que originam todos os tipos de células sanguíneas, são as CTAs conhecidas há mais tempo. Como a maioria dos outros tipos de CTAs, elas são raras, constituindo uma pequena fração (0,01 - 0,1%) do total de células; não apresentam características morfológicas que as diferenciem das demais células, e dividem-se em uma taxa muito baixa. Muitos outros tipos de células-tronco do adulto são conhecidos – epitelial, muscular, neuronal, mesenquimal etc – e se acredita que todos os tecidos têm seu próprio compartimento de células-tronco.

O papel fundamental dessas células é, como citado anteriormente, repor aquelas que morrem por morte celular programada, fenômeno principalmente visível em tecidos como a pele e o sangue. Uma outra função das células-tronco envolve a recuperação de lesões não fisiológicas, isto é, morte de células por acidentes ou agentes patogênicos.

A plasticidade das células-tronco refere-se à capacidade das mesmas de originar diferentes tipos de células maduras. Sabe-se hoje que a plasticidade das CTAs, que originalmente era considerada muito restrita, é bastante

considerável. Diferentes tipos de CTA apresentam diferentes graus de plasticidade, desde muito baixo (como as CT epiteliais) até muito altos (como as células-tronco mesenquimais). Os mecanismos responsáveis por essa plasticidade não são ainda bem determinados. Diferentes grupos de pesquisa têm encontrado diferentes resultados, dando origem assim a uma controvérsia ainda não resolvida. Enquanto alguns sugerem que CTAs podem realmente transdiferenciar-se (isto é, originar tipos celulares diferentes dos que constituem o órgão onde residem), outros afirmam que esses resultados são artefatos da metodologia empregada ou originam-se da fusão das células-tronco com células já diferenciadas presentes nos órgãos alvo.

Obtenção das células-tronco

A adequada coleta e o tratamento de CTs são importantes para que se faça uma análise das mesmas sob diferentes aspectos. As células podem ser colocadas em cultura *in vitro*, em placas ou frascos plásticos e com meio de cultivo adequado, para que sofram expansão ou para que se provoque diferenciação das mesmas em células maduras. Além disto, podem ser utilizadas em estudos *in vivo*, quando elas são injetadas em animais para a avaliação da distribuição e colonização de órgãos. Com frequência cada vez maior, elas estão sendo aplicadas em estudos clínicos, visando a regeneração de tecidos e órgãos em vários tipos de doenças. A coleta e o tratamento são procedimentos realizados de forma muito diferente, caso estejam em consideração as CTEs ou as CTAs.

A forma mais comumente utilizada para obtenção das CTEs é a sua coleta do próprio embrião, isto é, do botão interno do blastocisto, conforme detalhado anteriormente. O embrião é produzido *in vitro*, no processo empregado para a produção dos “bebês de proveta”. As células do botão interno são separadas entre si e colocadas em placas ou garrafas, com meio de cultura apropriado e passam a dividir-se continuamente originando grandes números que podem ser utilizados em diversos tipos de pesquisas. Dessa forma, originam-se linhagens de células-tronco embrionárias, que geralmente são compartilhadas entre os grupos de pesquisa interessados no assunto.

O embrião deve ser obrigatoriamente destruído para obtenção das células-tronco. O processo é legalmente permitido no Brasil, mas questões éticas estão envolvidas já que a ciência não pode provar se o blastocisto já deve ser considerado como tendo um “potencial de ser humano” suficiente para merecer proteção legal ou não. Um avanço importante que se espera no futuro é o estabelecimento de um método que permita a coleta das células do blastocisto sem destruí-lo.

A obtenção das células-tronco do adulto apresenta algumas dificuldades técnicas, já que elas são raras e não apresentam características que permitam sua fácil identificação. Entretanto, vários métodos foram estabelecidos,

envolvendo, por exemplo, o uso de anticorpos que identificam proteínas de membrana marcadoras dessas células, ou propriedades como as de aderência ao substrato. Há ainda uma terceira maneira de se obter células-tronco e, nesse caso, classificadas como embrionárias. É uma obtenção de células troncos que envolve a metodologia de transferência nuclear, até há pouco tempo denominada clonagem terapêutica. O método envolve também a formação do blastocisto, com a diferença de que, ao invés da fecundação de um óvulo por um espermatozoide, é realizada a transferência do núcleo de uma célula adulta, obtida do indivíduo em tratamento, para um óvulo anucleado. Uma vez formado o blastocisto, os procedimentos podem ser: a) se ele for implantado no útero de uma fêmea resultará na formação de um novo indivíduo, sendo o processo denominado clonagem reprodutiva (processo que originou a famosa ovelha Dolly e vários outros tipos de mamíferos); b) se for destruído para coleta de células-tronco, o processo é denominado transferência nuclear. As CTEs resultantes do processo apresentam as mesmas características daquelas obtidas a partir de embriões convencionais. A vantagem do processo é originar células-tronco embrionárias geneticamente idênticas às do indivíduo no qual elas serão utilizadas em procedimento terapêutico, o que elimina o problema da rejeição de um transplante que, de outro modo, tem as mesmas restrições exibidas por qualquer transplante de órgãos convencional.

O processo, descrito com tanta simplicidade, é, na verdade, metodologicamente muito complexo e apresenta ainda baixo grau de sucesso. O problema principal é que o material genético do núcleo de uma célula adulta já passou por processos que dificultam sua interação com o citoplasma do óvulo, e essa interação é necessária para possibilitar as primeiras divisões celulares e formação do embrião. No Brasil, o procedimento não é permitido por lei. As notícias divulgadas por pesquisadores sul-coreanos, há pouco mais de um ano, sobre a produção de embriões humanos pelo processo de clonagem, foram comprovadas como fraude. Até o momento, nenhum grupo pode produzir embriões humanos clonados.

Manutenção e expansão in vitro das células-tronco

Após a coleta das células-tronco embrionárias (a partir do blastocisto) ou de adultos (a partir do órgão e com o sistema de isolamento apropriados), o material destinado à pesquisa deve ser cultivado em frascos ou placas. Para sua manutenção e expansão in vitro, células animais necessitam de um meio de cultivo adequado, que geralmente contém múltiplos componentes tais, como: aminoácidos, sais minerais e outras substâncias como glicose e bicarbonato de sódio. Frequentemente, é adicionado ao material pesquisado soro fetal bovino, que contém outros nutrientes. Suspensas nesse meio, as células são colocadas em placas ou frascos plásticos apro-

priados para o cultivo e mantidas em estufas a 37°C, em uma atmosfera com 5% de CO₂ para evitar alterações no pH do meio, que tende a se tornar alcalino devido à atividade metabólica das células. Como as células aumentam em número, uma ou duas vezes por semana, necessitam ser transferidas (“repicadas”) para novas placas ou frascos com meio fresco.

As células-tronco embrionárias têm uma capacidade aparentemente ilimitada de expansão quando cultivadas em condições adequadas. Após isoladas a partir do blastocisto, passam a proliferar intensamente, gerando grande número de novas células; podem ser congeladas, descongeladas mantendo suas características originais e transportadas entre laboratórios, até mesmo entre laboratórios de diferentes países. A maior parte dos grupos que trabalham com as CTEs não desenvolvem suas próprias linhagens, mas recebem amostras dos pesquisadores que as produziram e estabelecem as culturas em seus próprios laboratórios.

A manutenção e expansão das células-tronco de adultos seguem os mesmos princípios básicos, mas algumas diferenças importantes são observadas. A principal delas refere-se ao fato de que, na maioria dos casos, o cultivo não é permanente. As CTAs tendem a se diferenciar em linhagens específicas, que dependem do tipo de célula-tronco, ou a morrer depois de alguns repiques. Alguns tipos de CTAs, como as células-tronco mesenquimais de camundongos, podem ser mantidas durante longo tempo; as bases biológicas dessas diferenças não são ainda bem conhecidas. Na verdade, expandir células-tronco adultas in vitro constitui o objetivo de muitos projetos de pesquisa. Para células-tronco hematopoéticas derivadas do sangue de cordão umbilical, por exemplo, o procedimento seria muito útil, já que o número relativamente pequeno de CTHs presentes em cada unidade de sangue coletada impede seu transplante para adultos. Como não é conveniente misturar duas ou mais unidades de sangue de cordão umbilical, geralmente o transplante pode ser feito apenas em crianças. Não existem ainda, entretanto, procedimentos perfeitamente estabelecidos para a expansão sem a diferenciação das células-tronco hematopoéticas.

Diferenciação das células-tronco in vitro ou em sistemas experimentais in vivo

Manter e expandir as células-tronco é um aspecto importante deste tipo de pesquisa, mas a possibilidade de manipular sua diferenciação nos tipos de células e tecidos de interesse é também fundamental. Em alguns casos isso pode ser importante para averiguar se as células em cultura continuam a manter a plasticidade, isto é, o potencial para originar vários tipos de células maduras. Em outros casos, pode interessar, particularmente, para formar essas células in vitro para um tratamento específico. Assim, conforme anteriormente citado, a maior parte dos

projetos de pesquisa com CTEs objetivam estabelecer as condições de cultivo que permitem sua diferenciação em células musculares, neuronais, epiteliais etc. Uma parte considerável das pesquisas com células tronco dedica-se a definir as condições que induzem diferentes tipos a darem origem a células maduras de diferentes linhagens.

Basicamente, essas condições envolvem a adição de vários tipos de substâncias ao meio de cultivo. Assim, a produção de células hematopoiéticas a partir das CTHs depende da adição de fatores de crescimento e diferenciação (CSF, colony stimulating factor) já bem definidos: G-CSF para granulócitos, M-CSF para megacariócitos etc. A eritropoietina é o fator que estimula a formação de eritrócitos. Para células-tronco mesenquimais ou MAPCs, que apresentam grande plasticidade, fatores como beta-glicerofosfato ou dexametasona induzem a diferenciação em osteoblastos; insulina, em adipócitos; 5-azacitina, em mioblastos, e assim por diante.

Como não se pode ter certeza sobre a fidelidade das informações fornecidas pelos sistemas de cultivo *in vitro*, é importante que elas sejam complementadas por estudos *in vivo*. Para tal, as células-tronco podem ser administradas a animais como camundongos. Algumas ferramentas biológicas importantes são empregadas nestes estudos:

(a) Camundongos transgênicos. Linhagens de camundongos endocruzados (a mais comumente empregada nestes estudos é a C57Bl/6) foram modificadas com a introdução de genes “repórter”, através de métodos de transferência gênica. Esses genes codificam proteínas facilmente reconhecíveis nas células que os expressam. Um dos mais utilizados codifica uma proteína verde fluorescente (GFP, green fluorescent protein), que torna as células - e o animal como um todo - fluorescentes quando submetidos à luz ultra-violeta. Outro gene codifica a enzima beta-galactosidase de origem bacteriana que, ao reagir com seu substrato (X-gal), origina uma cor azul na célula. Camundongos com esse gene são chamados Rosa26. Células-tronco originadas desses animais são assim identificadas pela fluorescência ou pela reação enzimática, respectivamente. Elas podem ser administradas, em números variáveis e por diferentes vias, a camundongos que têm a mesma base genética (C57Bl/6), mas que não expressam o gene repórter. Esses animais receptores podem ser normais ou podem representar algum modelo de doença. Análises posteriores informam se as células transplantadas - facilmente identificáveis pela fluorescência ou cor (ou ainda com anticorpos específicos) - estão presentes no receptor e originaram células diferenciadas;

(b) Camundongos imunodeficientes. Animais portadores de mutações gênicas, que os tornam completamente imunodeficientes, podem ser utilizados para o transplante de células-tronco de outras espécies, como o homem, servindo assim como “tubos de ensaio vivos” que permitem estudar a distribuição e biologia das células em condi-

ções menos artificiais que o cultivo *in vitro*.

Princípios básicos da terapia com células-tronco

A terapia celular pode ser definida como um conjunto de métodos que visam a reparação de tecidos ou de órgãos danificados, com substituição das células não funcionais por células normais. Conforme anteriormente descrito, uma das funções naturais das células-tronco é justamente a de reparar lesões que ocorrem no organismo. Acredita-se que pequenas lesões nos tecidos ocorram frequentemente devido, por exemplo, ao corte do suprimento sanguíneo causado por acidente vascular, ou a mecanismos inflamatórios. Essas lesões são reparadas por células-tronco sem que apareçam sintomas clínicos. Quando as lesões são mais extensas, entretanto, as CTs não são capazes de corrigi-las e a doença se estabelece. Nesses casos, a terapia celular visa a amplificação do mecanismo natural de correção, concentrando as células-tronco no local da lesão para que possam agir mais eficientemente.

O processo mais utilizado envolve um transplante autólogo, com coleta das células-tronco seguida ou não de sua expansão *in vitro*, e administração ao paciente de forma sistêmica (injeção endovenosa) ou diretamente no órgão a ser tratado. As células-tronco mais amplamente utilizadas são as células mononucleares da medula óssea, onde estão incluídas as CTHs, as células-tronco mesenquimais, precursores endoteliais e talvez outros tipos de células-tronco ainda não identificadas. No processo, a medula óssea é coletada (em geral por punção da crista ilíaca), a fração mononuclear é isolada por centrifugação em Ficoll-Hypaque e administrada ao paciente. Uma fonte alternativa, cujo emprego está se difundindo, é o lipoaspirado, a partir da qual é isolada uma fração que contém as “células-tronco adiposo-derivadas”, que pertencem à família das células-tronco mesenquimais e tem se mostrado muito eficiente em vários tipos de terapias. Apesar de ter sua eficiência comprovada em vários tipos de doenças, os mecanismos responsáveis pelo sucesso da terapia com CT ainda são muito pobremente compreendidos. Para que as células possam atuar no local da lesão, o primeiro passo é seu estabelecimento no local - isto é, as CTs devem fazer o “homing” no sítio adequado, e não se dispersarem pelo organismo ou ficarem retidas em outros órgãos. Em segundo lugar, elas devem ser estimuladas a exercerem suas funções de reparo. Novamente, a questão do microambiente adquire importância fundamental. São conhecidos hoje vários tipos de fatores solúveis, liberados por células presentes no sítio da lesão, que atraem e estimulam as células-tronco. Esse conhecimento tem sido base, inclusive, para propostas de terapia gênica associada à terapia celular: as células-tronco recebem genes que induzem a produção aumentada de receptores para esses fatores solúveis, aumentando assim sua capacidade de aquerenciamento e atuação no local.

O mecanismo responsável pelo reparo propriamente dito também não é completamente compreendido em muitos dos casos. Dúvidas muito básicas ainda persistem - por exemplo, são as células-tronco transplantadas que originam as células maduras que irão reparar a lesão, ou o que as células transplantadas fazem na verdade é criar um microambiente que recruta células-tronco do próprio tecido, que então reparam a lesão?

Quando se considera a questão da terapia com células-tronco, uma questão que se impõe é: qual o melhor tipo a ser empregado, as células-tronco embrionárias ou as de adulto? Apesar das CTEs apresentarem a grande vantagem da plasticidade, já que são, em princípio, capazes de originar qualquer um dos mais de duzentos tipos de células presentes no organismo, por motivos de segurança não podem ainda ser utilizadas em pacientes.

A terapia com células-tronco foi iniciada com os transplantes de medula óssea para o tratamento de doenças hematológicas (como leucemias e anemias) e, ainda hoje, é o procedimento mais bem sucedido. Um grande número de grupos tem investigado a possibilidade de utilizar células-tronco para o tratamento de doenças não hematológicas. Essas pesquisas são feitas em estudo pré-clínico (com modelos animais) e clínicos (em seres humanos). As doenças são muito variadas, incluindo problemas cardíacos, musculares, ósseos, epiteliais, hepáticos, neuronais etc. Os resultados ainda não são suficientes para dizer definitivamente se a terapia com células-tronco é ou não eficiente para a maioria dessas doenças. Um dos maiores mitos atuais sobre as células-tronco, muito incentivado pela mídia, envolve seu “super-poder” de cura. O que sabemos como fato, hoje, é que as CTs apresentam grande potencial de reparo para muitos tipos de tecidos e órgãos. O que esperamos que o futuro nos traga, através de pesquisas sérias e controladas, é a concretização das esperanças desse potencial.

Referências:

1. Não existe tradução adequada para o termo homing. A autora tem proposto o verbo aquerenciar, que no RS significa “acostumar a determinado lugar que não o de seu pouso habitual ou de seu nascimento” (Novo Aurélio).

Bibliografia

Caplan AI. Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine. *J Cell Physiol.* 213(2):341-7. 2007

Covas, Dimas Tadeu e Zago, Marco Antonio orgs. . Células-tronco: A nova fronteira da medicina. Editora Atheneu 2006.

Metcalf D. Concise Review: Hematopoietic Stem Cells and Tissue Stem Cells: Current Concepts and Unanswered Questions. *Stem Cells.* 2007 Aug 9; [Epub ahead of print].

Morales, Marcelo M. org. Terapias Avançadas . Células-

tronco, terapia gênica e nanotecnologia aplicada a saúde. Editora Atheneu 2007.

Página do NIH <http://stemcells.nih.gov/>