

pós-graduação em

Ciências Biológicas.



CÉLULAS-TRONCO E TERAPIAS GÊNICAS

PROF. CARLOS M.C. MARANDUBA

ufjf | CENTRO DE EDUCAÇÃO
A DISTÂNCIA



EDITORA
CEAD
UFJF

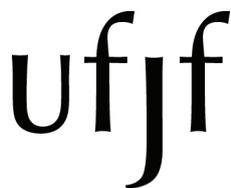


PROF. CARLOS M.C. MARANDUBA

CÉLULAS-TRONCO E TERAPIAS GÊNICAS



Juiz de Fora
2015



Reitor
Júlio Maria Fonseca Chebli
Vice-Reitor
Marcos Vinício Chein Feres



Diretora
Edna Ribeiro Hernandez Martin
Coordenadora Geral
Maria Lucia de Castro Polisseni
Coordenadora UAB
Liamara Scortegagna

Setor de Produção de Materiais Didáticos

Coordenadora
Liamara Scortegagna

Assessoria Administrativo Pedagógico
Denise Luz

Capa
Liliane da Rocha

Projeto Gráfico e Diagramação
Anderson Marques Pinto

Ortografia e Normas Técnicas
Aloísio Abib



CENTRO DE EDUCAÇÃO
A DISTÂNCIA 

Endereço: Campus Universitário - Bairro Martelos. Juiz de Fora – MG
Brasil. CEP: 36036-900 Telefones: (32) 2102-3488 / 3489
Twitter: @cead_ufjf
Facebook: www.facebook.com/ceadufjf
Email Geral: cead.recepcao@ead.ufjf.br

SUMÁRIO

DA MITOLOGIA À REALIDADE	5
Regeneração	7
Referências	9
A IMPORTÂNCIA DE ALGUNS CONCEITOS.....	10
Definições.....	12
CÉLULAS TRONCO EMBRIONÁRIAS.....	13
A lei da pesquisa com células-tronco.....	20
ÉTICA	24
CLONAGEM REPRODUTIVA E CLONAGEM TERAPÊUTICA.....	26
Clonagem reprodutiva.....	28
Clonagem terapêutica	31
Contornando o problema ético de destruição de embrião.....	33
CÉLULAS TRONCO PLURIPOTENTES INDUZIDAS.....	35
Referência.....	38
CÉLULAS TRONCO ADULTAS	39
Células-tronco mesenquimais	40
TERAPIA CELULAR.....	42
Administração das células-tronco mesenquimais	44

Atividade imunossupressora das células tronco mesenquimais	46
BIOENGENHARIA TECIDUAL	48
TERAPIA GÊNICA	52
Conceito	53
Tipos de carreadores	54
Alvos da terapia gênica	56
Quando o excesso é o problema	57
Ética na terapia gênica	58
Problemas ainda não resolvidos	58



DA MITOLOGIA À REALIDADE¹

O tema “regeneração” é um assunto que sempre intrigou a humanidade. A ideia de regeneração humana se faz presente desde a Idade Antiga, quando o poeta grego Hesíodo, em sua obra Teogonia, no século VIII a.C., relatou a história do titã Prometeu. Segundo o autor, Prometeu e seu irmão Epimeteu receberam dos deuses a tarefa de criar os homens e todos os outros animais, este encarregado da obra em si e aquele de supervisioná-la. Ao distribuir as características, Epimeteu atribuiu dons para cada espécie, tais como força, coragem, rapidez e sagacidade, além de asas, garras e carapaças, por exemplo, para diferentes animais. O homem, por sua vez, foi criado do barro, mas Epimeteu havia gastado todos os recursos nos outros animais e, sem saber o que fazer, recorreu a seu irmão. Prometeu então roubou o fogo dos deuses, escondido no Olimpo, entregando-o aos homens, o que terminou por assegurar a superioridade destes sobre os demais seres criados.

Até então, o fogo era exclusivo dos deuses. Quando Zeus, recebendo uma mensagem de Syson (deus da união), descobriu esse fato, ordenou a Hefesto que acorrentasse Prometeu no cume do monte Cáucaso, aonde diariamente uma águia viria para dilacerar seu fígado, o qual se regenerava à noite, devido à imortalidade do titã. Tal castigo deveria durar 30.000 anos, e somente a substituição de Prometeu por outro ser eterno poderia lhe restituir a liberdade. Anos mais tarde, o centauro Quirão foi atingido por uma flecha envenenada, disparada por Hércules. Tal ferimento não possuía cura, de modo que o centauro, também imortal, estava condenado a sofrer eternamente dores lancinantes. Assim, ele se deixou acorrentar no Cáucaso, substituindo Prometeu. Zeus então permitiu que Prometeu se tornasse mortal e percesse serenamente.

Esse célebre mito levanta alguns questionamentos:

- 1- Em que momento surgiu a ideia de regeneração?
- 2- Quais foram as motivações subjacentes que levaram Hesíodo a escrever tal história, sendo que na época a medicina não tinha o conhecimento e tecnologia existentes na atualidade?

Quando se considera as plantas, registros históricos apontam que os seres humanos utilizavam de suas propriedades regenerativas desde 10.000 a.C., domesticando certas espécies e selecionando os melhores materiais vegetais para propagação, o que, ao longo de milhares de anos, culminou no surgimento das variedades, também chamadas cultivares. Tal interesse pela regeneração nos seres vivos persistiu, havendo inúmeros estudos, particularmente a partir do século XVIII d.C., que procuraram relatar e entender a ocorrência desse fenômeno em diversos organismos.

Acreditava-se que só as plantas e alguns micro-organismos podiam se regenerar, até que, em 1744, Abraham Trembley, um naturalista suíço, constatou a capacidade regenerativa da hidra, um pólipó, durante seus experimentos para determinar se o organismo, na época desconhecido, era um animal ou uma planta. Durante suas observações, o pesquisador notou que o organismo apresentava um padrão de deslocamento peculiar, por meio de cambalhotas, sugerindo que o mesmo fosse um animal. Entretanto, ele decidiu cortar o pólipó ao meio, pensando que, se as partes se regenerassem, ele seria uma planta, em virtude de não se conhecer, naquela época, animais capazes de regenerar indivíduos completos. O naturalista observou

que cada metade do pólipo regenerou um organismo completo, contudo, tal resultado não foi suficiente para convencê-lo de que o espécime fosse vegetal, de modo que ele continuou acreditando no padrão de movimentação como um indicativo de que hidra fosse um animal, como de fato é.

Peter Simon Pallas, em 1766, registrou a mesma capacidade de regeneração em planárias. Alguns anos depois, Charles Bonnet e Lazzaro Spallanzani demonstraram que esse fenômeno é, em diferentes graus, recorrente em uma ampla variedade de metazoários, a exemplo de minhocas, girinos e salamandras. Tais experimentos, apesar de não serem os únicos, foram importantes, mostrando que tecidos adultos diferenciados podem passar por mudanças consideráveis, a ponto de desempenharem funções diversas daquelas iniciais, promovendo um interesse crescente de pesquisadores em estudar essa capacidade de alguns seres vivos.

REGENERAÇÃO

De acordo com o dicionário, a palavra *regeneração* (do latim, *regeneratione*) pode ser definida como “*Renovação, por meio natural, de um órgão que sofreu uma perda parcial, ou outro tipo de lesão*”.

Sugimoto e colaboradores mostram que existem três mecanismos básicos de regeneração: (1) através do desenvolvimento de células-tronco preexistentes, (2) pelo processo de desdiferenciação, que consiste em uma célula especializada reverter a um estágio menos diferenciado dentro de sua própria linhagem, ou (3) de transdiferenciação, no qual a célula vai um passo além, sendo capaz de mudar de linhagem.

Com relação às plantas, há diversos tipos de regeneração, que se manifestam de diferentes formas, por exemplo: (1) a regeneração de estruturas perdidas devido a um ferimento, (2) a geração *de novo* de um tecido ou estrutura que não estava presente antes do ferimento, e (3) a regeneração de uma planta completa a partir de uma única célula somática, fenômeno conhecido por embriogênese somática. Uma característica fundamental na regeneração diz respeito aos meristemas, tecidos proliferativos que contêm nichos de células-tronco, os quais são microambientes responsáveis pela manutenção da população de tais células, que por sua vez, são capazes de originar uma planta adulta completa. Além disso, a maioria das plantas possui outros meios de ativar ou desdiferenciar células adultas para retomar o crescimento meristemático, como é o caso das células do periciclo, que originam raízes laterais, meristemas axilares na base de folhas e meristemas laterais que contribuem para o crescimento secundário da planta. Durante a regeneração, frequentemente se verifica a existência de um estágio intermediário, o calo, que consiste em massas de células em crescimento que podem surgir tanto a partir de células meristemáticas relativamente indiferenciadas que estão se proliferando quanto de células diferenciadas do periciclo.

Em animais, a capacidade regenerativa varia consideravelmente entre diferentes espécies e, em um mesmo indivíduo, entre seus órgãos. Por exemplo, animais como hidra, estrelas-do-mar e planárias mantêm células em seu corpo que possibilitam tanto o crescimento quanto o reparo de danos. No pólipo, tais células-tronco são conhecidas como células

intersticiais, e nas planárias, como neoblastos. Anfíbios urodelos, como salamandras e tritões, apresentam considerável capacidade regenerativa. Estes últimos podem, por exemplo, regenerar completamente sua cauda, membros, maxilas e tecidos oculares, como a córnea e a retina. Já nos anfíbios anuros essa capacidade é limitada, dependendo, às vezes, do estágio de desenvolvimento. Quando se considera a regeneração de membros, *Xenopus laevis* pode regenerar completamente brotos de membros enquanto eles estão se desenvolvendo, contudo tal capacidade é perdida assim que o órgão está completamente formado.

Apesar das particularidades de cada reino, no que se refere aos mecanismos envolvidos nos processos regenerativos, os princípios são parecidos, e à semelhança das plantas, os animais também desenvolvem uma estrutura intermediária no processo regenerativo, o blastema, que é uma região de células progenitoras originadas pela desdiferenciação das células mesenquimais no local do ferimento, durante a regeneração. Uma comparação das principais formas de regeneração em animais e plantas pode ser observada na Figura 1.

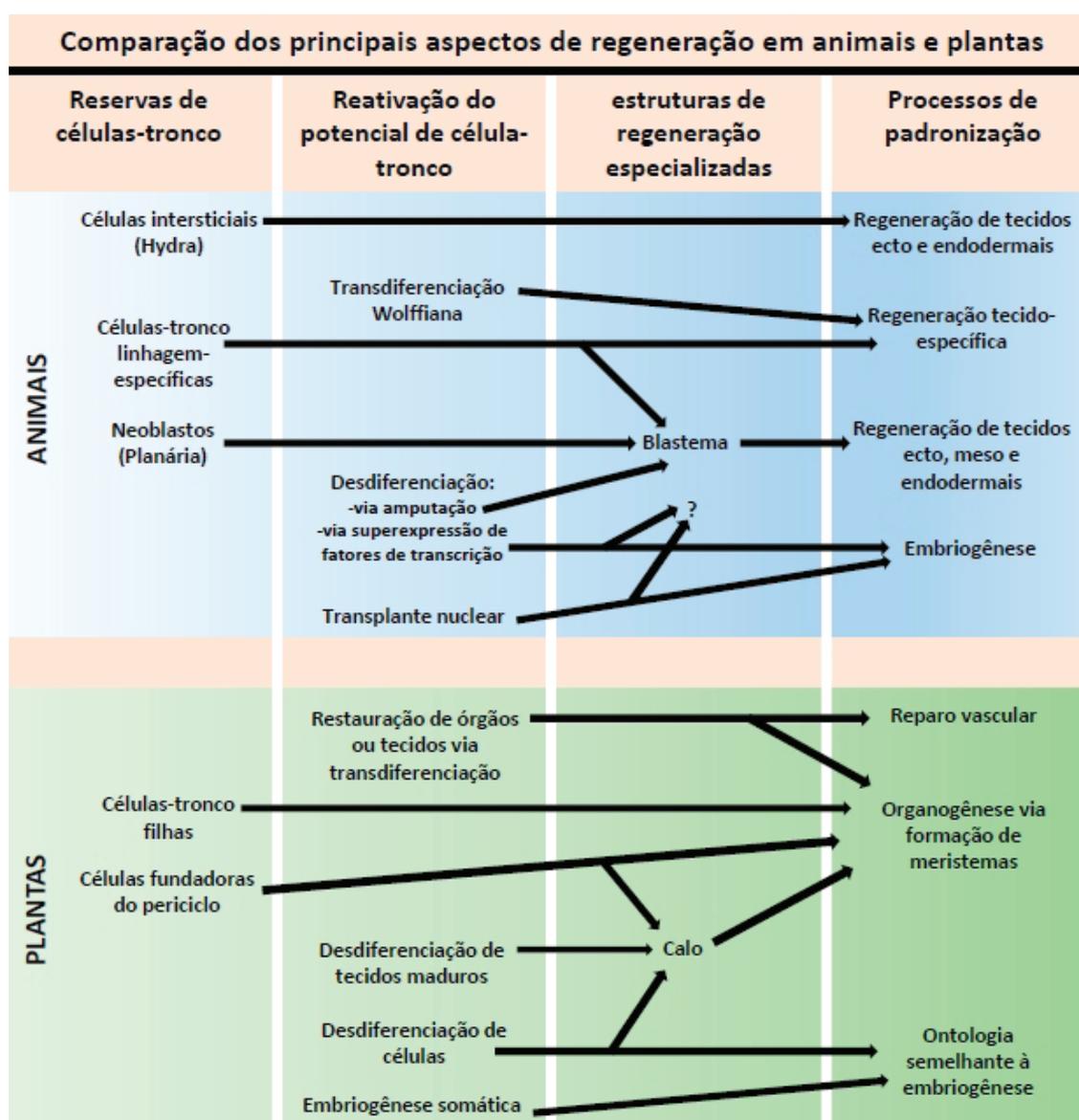


Figura 1. Descrição das origens celulares conhecidas, estruturas regenerativas e mecanismos de padronização durante a regeneração em animais e plantas. Fonte: Birnbaum e Sanchez Alvarado, 2008. Modificado por Júlio C.G. Graça.

REFERÊNCIAS

Graça, J. C. G. Reprogramação celular: o estado da arte. 2014. 37 p.: il. Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas, 2014.



A IMPORTÂNCIA DE ALGUNS CONCEITOS

Quando se fala em células-tronco, misturam-se o fascínio do controle sobre a natureza, a esperança e as dúvidas. O **fascínio** se faz justamente pela possibilidade que elas vêm mostrando quanto à possibilidade de regenerar tecidos. Isso abriu um novo ramo na medicina o qual vem sendo denominado como “Medicina Regenerativa”. A **esperança** e as **dúvidas**, coexistem, pois apesar de todos os esforços dos cientistas, será preciso testar o comportamento dessas células em laboratório para obtenção do sucesso terapêutico.

Muitos resultados já foram obtidos em animais de pequeno porte, mas a maior parte dos testes ainda não pode ser estendida para a espécie humana, já que os mecanismos de diferenciação das células-tronco ainda não foram totalmente esclarecidos e há relatos de formação de teratomas (tumores). A compreensão do comportamento das células humanas pode oferecer informações preciosas, capazes de impedir a degeneração natural do organismo e os efeitos da doença, e para entender melhor o papel dessas células e sua contribuição para a saúde humana, faz-se necessário estabelecer conceitos básicos em relação ao tema. E para tanto, com base nos conhecimentos obtidos por você através das mídias (revistas, jornais e telejornais), trabalhe em grupo e defina:

- 01) O que são Células Tronco?
- 02) Quais os tipos de Células Tronco?
- 03) Quais os potenciais que essas células apresentam?

O corpo de um organismo multicelular é constituído por diferentes tipos de células **especializadas**, todas capazes de realizar diversas funções. As células com determinado tipo de especialização organizam-se em grupos, constituindo os tecidos. Alguns tecidos são formados por células que possuem a mesma estrutura; outros são formados por células que têm diferentes formas e funções, mas que juntas colaboram na realização de uma função geral maior. No quadro a seguir apresentamos alguns exemplos.

Quadro 1 - Tipos celulares e suas respectivas funções

Células especializadas	Funções
Células musculares	Movimentação
Células exócrinas do pâncreas	Síntese e secreção de enzimas
Células glandulares mucosas	Síntese e secreção de substâncias mucosas
Algumas células das glândulas adrenais, dos testículos e do ovário	Síntese e secreção de esteroides
Células epiteliais de revestimento do intestino	Absorção de nutrientes

Com base na compreensão do conceito de células especializadas, podemos passar então para as definições de células tronco.

DEFINIÇÕES

As Células Tronco são células não especializadas, não diferenciadas ou não comprometidas com nenhuma linhagem celular específica. Assim sendo, podemos entender que essas células estão em um estado de **indiferenciação**, sendo que, quando requisitadas pelo nosso organismo, migram para o local que necessita de reparo tecidual.

Outra característica que as Células Tronco apresentam é quanto à capacidade de renovação no estado indiferenciado. As células tronco se proliferam dentro de nosso organismo e se mantêm no estado não comprometido como uma certa “reserva”. Uma criança em fase de desenvolvimento apresenta um reservatório de células tronco maior do que pessoas mais idosas, e há pesquisadores que defendam a tese de que a diminuição desse reservatório em cada órgão possa resultar em falência de órgãos em pessoas com mais idade.

Quanto à divisão celular, as células tronco apresentam divisão assimétrica, pois uma parte dessas células repõe o estoque de células no estado indiferenciado e outra parte se diferencia para uma dada linhagem celular ou tecido específico.

As células tronco podem ser classificadas ainda quanto à origem, podendo ser embrionárias ou adultas.

Quanto ao potencial, as células tronco podem ser classificadas como Totipotentes, Pluripotentes e Multipotentes.

A primeira célula formada pela fusão do espermatozoide e do óvulo é denominada de Zigoto. O Zigoto é uma única célula que tem toda informação genética para formação de um indivíduo completo. Assim sendo, essa célula **Totipotente** é capaz de diferenciar-se originando todos os 216 tecidos que formam o corpo humano, incluindo a placenta e anexos embrionários. As células totipotentes são encontradas nos embriões nas primeiras fases de divisão, isto é, quando o embrião tem até de 16 a 32 células, que corresponde a três ou quatro dias de vida. As células **Pluripotentes** são capazes de diferenciar-se em quase todos os tecidos humanos, excluindo a placenta e anexos embrionários, ou seja, a partir de 32 - 64 células, aproximadamente a partir do 5º dia de vida, fase considerada como blastocisto. As células internas do blastocisto são pluripotentes enquanto as células da membrana externa destinam-se à produção da placenta e das membranas embrionárias. Já as células **Multipotentes** referem-se às Células Tronco Adultas, que apresentam um potencial mais restrito quanto à capacidade de originar diferentes tecidos em nosso organismo.

Nos capítulos a seguir serão abordados os tipos de células tronco, embrionárias e adultas.



CÉLULAS TRONCO EMBRIONÁRIAS

- Na segunda semana de fecundação, o zigoto é implantado no útero (nidação), e sofre várias divisões mitóticas até a oitava semana, sendo então denominado como embrião e, a partir dessa semana, feto.
- Em embriologia, o zigoto começa a dividir-se para formar uma esfera com 64 células, ou blastômeros. O zigoto com 12 a 16 blastômeros já pode ser chamado de mórula. A mórula é composta de células totipotentes, podendo evoluir para qualquer tipo de célula.

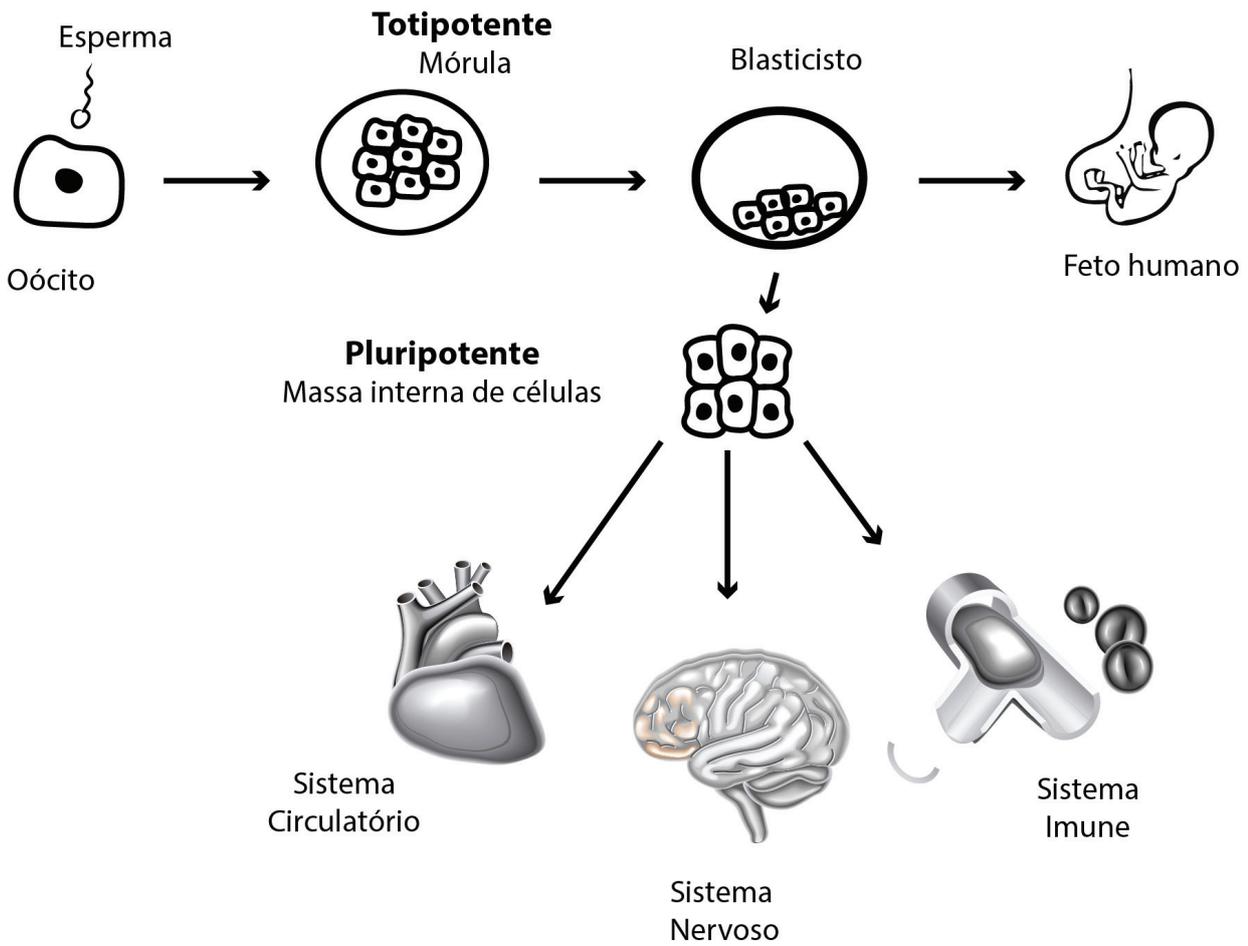
Em 1981, dois pesquisadores da Universidade de Cambridge, Martin John Evans e Matthew Kaufman², conseguiram cultivar pela primeira vez células tronco embrionárias a partir da massa celular interna de blastocistos de camundongos. Posteriormente, eles colocaram essas células no útero de camundongos fêmeas para que pudessem dar à luz filhotes (quimeras). Essa façanha foi alcançada também por Gail R. Martin, independentemente, no mesmo ano.

Em função da padronização de protocolos para cultivos de células embrionárias, esses estudos preliminares foram fundamentais para que anos mais tarde pesquisadores pudessem ser capazes de estabelecer linhagens de células tronco embrionárias a partir de outras espécies, tais como o hamster, suínos, bisão, macaco Rhesus, marmota, galinha, boi, humano, cão e gato. Também foi relatada a obtenção de células tronco embrionárias pluripotentes derivadas de embriões clonados e gerados por Fertilização *in vitro* (FIV) e/ou por partenogênese.

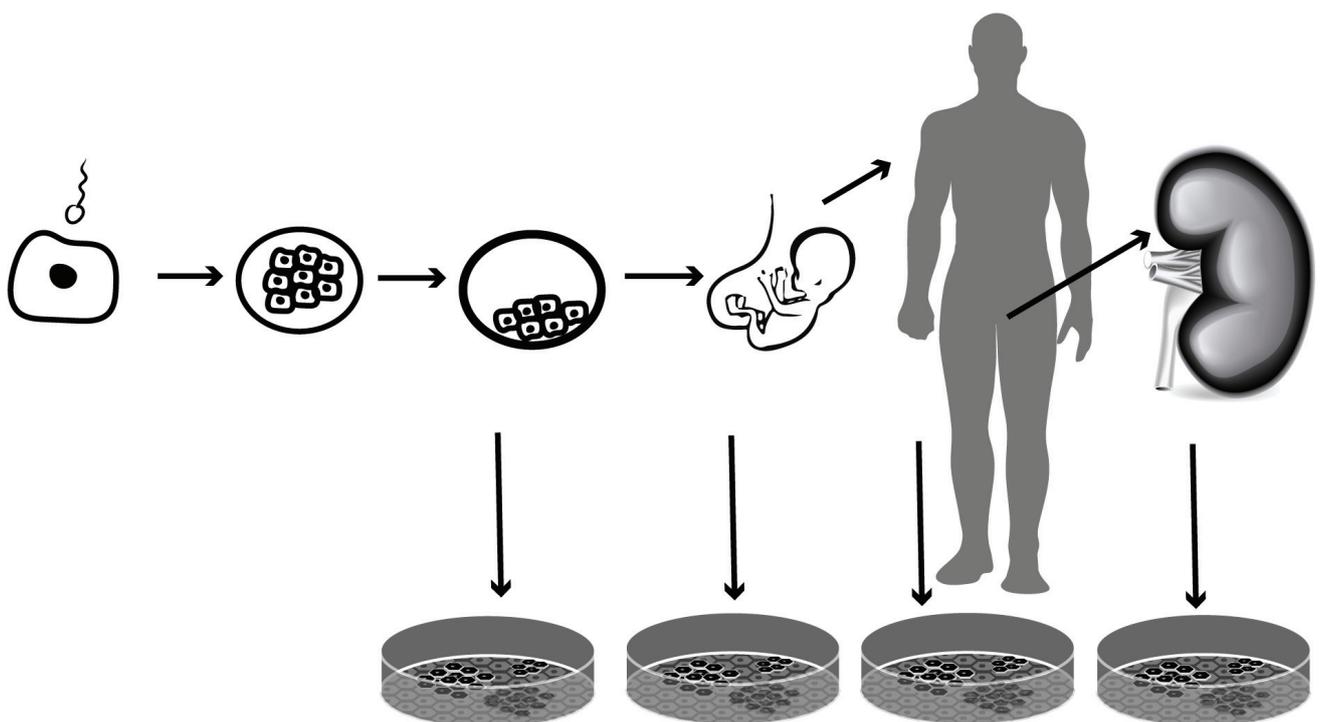
O domínio do cultivo de células tronco embrionárias permitiu manipulações genéticas específicas na linhagem germinativa de camundongos e a criação de animais transgênicos para serem usados como modelos experimentais para doenças humanas, visando entender mecanismos celulares associados a doenças e modelos para estudo de tratamentos. Em 1986³, Evans e seus colaboradores usaram vetores retrovirais para introduzir sequências de DNA exógeno em uma linhagem de células-tronco embrionárias e mostraram que essas células modificadas contribuíam amplamente para a formação de linhagens de células germinativas e somáticas em camundongos quiméricos, permitindo assim a transmissão da nova característica às futuras gerações de camundongos. Em comparação com os métodos atuais de manipulação do genoma do camundongo, essa abordagem apresenta vantagens, pois as técnicas genéticas de células somáticas podem ser usadas para modificar e para selecionar as células com potencial de linhagem germinativa, permitindo a derivação de linhagens transgênicas com alterações genéticas pré-determinadas e de interesse.

2 Martin GR. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 1981 Dec;78(12):7634-8.

3 Robertson E, Bradley, A., Kuehn, M., Evans, M. (1986). "Germ-line transmission of genes introduced into cultured pluripotential cells by retroviral vector". *Nature* **323** (6087): 445–448



Unipotente



Como mencionado anteriormente, o primeiro relato de pesquisa com células tronco de origem humana foi em 1998 pela equipe do Prof. James A. Thomson⁴, da Universidade de Wisconsin/EUA. Naquele mesmo ano, a equipe do Prof. John D. Gearhart⁵, da Universidade Johns Hopkins, realizou pesquisas com células tronco fetais humanas.

Terapias com células-tronco embrionárias têm sido propostas para a substituição do tecido após uma lesão ou doença. As patologias que poderiam potencialmente ser tratadas por células pluripotentes incluem doenças genéticas relacionadas ao sistema imune e hematológico, cânceres, diabetes juvenil, Doença de Parkinson, cegueira e lesões da medula espinhal. Outros potenciais usos das células-tronco embrionárias englobam a investigação do desenvolvimento humano em seu início e o estudo de doenças genéticas como sistemas *in vitro* para testes de toxicologia.

Visando assegurar que um possível transplante com estas células-tronco não ofereça riscos ao paciente, há a exigência de uma série de testes.

CURIOSIDADE

De acordo com a **Sociedade Brasileira de Profissionais em Pesquisa Clínica**, as fases de um estudo clínico são divididas em dois momentos:

1. Estudos Não Clínicos
2. Estudos Clínicos

FASE NÃO CLÍNICA

Antes de começar a testar novos tratamentos em seres humanos, os cientistas testam as substâncias em laboratórios e em animais de experimentação. Esta é a chamada fase não clínica.

O objetivo principal desta fase é verificar como uma substância se comporta em um organismo. Para que isso ocorra são seguidas normas de proteção aos animais de experimentação e não raras vezes os projetos são cancelados por não se mostrarem satisfatórios.

FASE CLÍNICA

A fase clínica é a fase de testes em seres humanos. É composta por quatro fases sucessivas e somente depois de concluídas todas as fases, o medicamento poderá ser liberado para comercialização e disponibilizado para uso da população. As sucessivas fases dentro da fase clínica são:

Fase I

Um estudo de **fase I** testa o medicamento pela primeira vez. O objetivo principal é avaliar a **segurança** do produto investigado. Nesta fase a medicação é testada em pequenos grupos (de 10 a 30 pessoas, geralmente)

4 Thomson JA et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. Science. 1998 Nov 6;282(5391):1145-7.

5 Michael J. Shambloott, Joyce Axelman, Shunping Wang, Elizabeth M. Bugg, John W. Littlefield, Peter J. Donovan, Paul D. Blumenthal, George R. Huggins, John D. Gearhart. Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 1998 November 10; 95(23): 13726–13731.

de voluntários sadios. Pode haver exceções se estivermos avaliando medicamentos para câncer ou para AIDS.

Se tudo ocorrer de acordo com o esperado, ou seja, se o produto se mostrar seguro, podemos passar para a Fase II.

Fase II

O número de pacientes que participam desta fase é maior (de 70 a 100). Aqui, o objetivo é avaliar a **eficácia** da medicação, isto é, se ela funciona para tratar determinada doença, e também obter informações mais detalhadas sobre a segurança (toxicidade). Somente se os resultados forem bons é que o medicamento será estudado sob a forma de um estudo clínico na fase III.

Fase III

Nesta fase, o novo tratamento é **comparado** com o tratamento padrão existente. O número de pacientes aumenta para 100 a 1.000. Geralmente, os estudos desta fase são randomizados, isto é, os pacientes são divididos em dois grupos: o grupo controle (recebe o tratamento padrão) e o grupo investigacional (recebe a nova medicação). A divisão entre os grupos é feita por meio de um sorteio. Assim, os pacientes que entram em estudos fase III têm chances iguais de cair em um ou outro grupo de estudo.

Algumas vezes, os estudos fase III são realizados para verificar se a combinação de dois medicamentos é melhor do que a utilização de um medicamento somente. Por exemplo, se, para tratar uma determinada infecção, a combinação do antibiótico X (novo) com o antibiótico Y (tratamento atual) é melhor do que somente o uso do antibiótico Y.

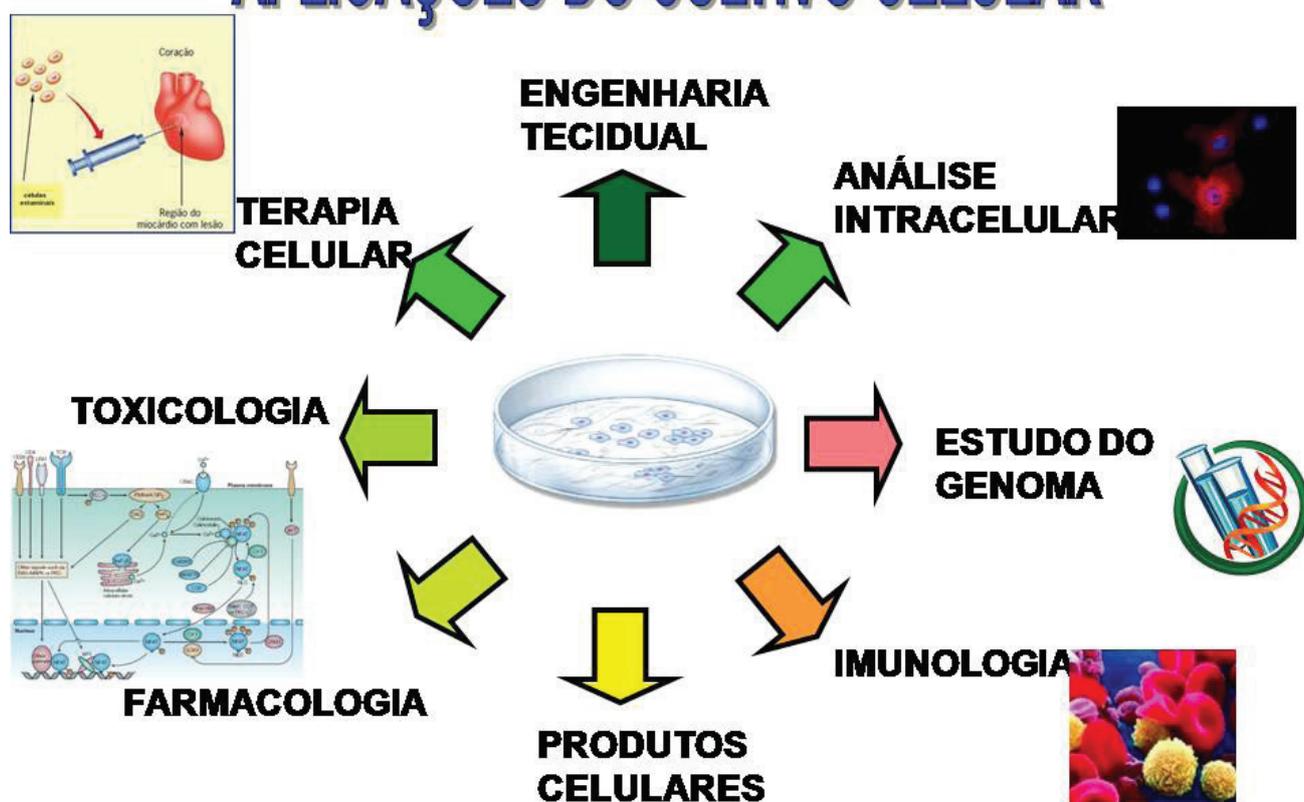
Fase IV

Estes estudos são realizados para se confirmar que os resultados obtidos na fase anterior (fase III) são aplicáveis em uma grande parte da população doente. Nesta fase, o medicamento já foi aprovado para ser comercializado. A vantagem dos estudos fase IV é que eles permitem **acompanhar os efeitos dos medicamentos em longo prazo**.

Disponível em http://www.sbppc.org.br/portal/index.php?option=com_content&task=view&id=14&Itemid=37; Acessado em 18/01/2015.

O que visa determinar se as células são seguras, é denominado Teste clínico de fase I.

APLICAÇÕES DO CULTIVO CELULAR



Teste clínico de fase I⁶

Em 23 de janeiro de 2009, a agência reguladora de alimentos do Departamento de Saúde e Serviços Humanos dos Estados Unidos, a Administração de Alimentos e Medicamentos (do inglês, *Food and Drug Administration* - FDA), autorizou pela primeira vez no mundo, o transplante de células tronco embrionárias.

O início do teste clínico de fase I visou ao transplante de oligodendrócitos, um tipo de célula do cérebro e da medula espinhal, derivados de células embrionárias humanas em pacientes com lesões cerebrais e da medula espinhal. O estudo foi realizado por Hans Keirstead⁷ e seus colegas da Universidade da Califórnia, e pela empresa Geron situada na Califórnia, Estados Unidos.

De acordo com dados da literatura científica, um experimento anterior havia mostrado melhora na recuperação locomotora em ratos com lesão da medula espinhal após sete dias do transplante de oligodendrócitos derivados de células-tronco embrionárias humanas. Na

6 Teste de fase 1 não tem por objetivo curar o paciente, mas determinar se as células são seguras.

7 Keirstead HS et al. Human embryonic stem cell-derived oligodendrocyte progenitor cell transplants remyelinate and restore locomotion after spinal cord injury. *J Neurosci*. 2005 May 11;25(19):4694-705.

fase I da pesquisa clínica, os pesquisadores enfatizaram que não esperavam que as injeções curassem completamente o paciente e restaurassem toda a sua mobilidade. Com base nos resultados dos ensaios em roedores, os investigadores observaram a restauração da bainha de mielina. Essa fase clínica teve como objetivo testar a segurança do procedimento para que se pudesse chegar a futuros estudos que envolvam pessoas com deficiências mais graves. Um dos receios entre os pesquisadores é de que as células-tronco utilizadas nos transplantes acabem gerando tumores, por isso pacientes que aceitaram participar desse ensaio clínico foram monitorados nos anos seguintes.



A LEI DA PESQUISA
COM CÉLULAS-TRONCO

No Brasil, a pesquisa com células-tronco embrionárias foi disciplinada pela Lei n.º 11.105, de 24 de março de 2005, conhecida como Lei de Biossegurança. O artigo 5º da lei permite, com restrições, a manipulação de embriões humanos, produzidos por fertilização *in vitro*, para coleta de células-tronco. Posteriormente, essa lei foi regulamentada pelo Decreto n.º 5.591, de 22 de novembro de 2005, que definiu como “embriões inviáveis” aqueles com alterações genéticas comprovadas que impedem o desenvolvimento por ausência de clivagem. Isso significa que a lei brasileira autorizou a pesquisa, preferencialmente, em embriões que não serão utilizados para fins reprodutivos após os procedimentos diagnósticos⁸.

Segue um quadro comparativo das regulamentações governamentais entre países sobre a pesquisa com células-tronco embrionárias (Tabela 1).

Tabela 1 – Países que possuíam normatização (legal ou infralegal) sobre o tema em 2009.

Regulamentações	Países
· Autorizam a pesquisa com células-tronco embrionárias por marco legal	- Brasil, Dinamarca, Espanha, Finlândia, França, Reino Unido e Suécia
· Permitem que a pesquisa seja conduzida sem que tenha havido um debate legislativo conclusivo, havendo um reconhecimento dos pareceres da comissão nacional consultiva de bioética ou do ministério da saúde de cada país.	- Índia e China
· Autorizam a pesquisa com linhagens embrionárias existentes e embriões já congelados, enquanto o debate legislativo se desenvolve localmente	- Irã
· Seu marco legal nacional se restringe às questões relacionadas ao financiamento dos estudos	- Estados Unidos
· Regulações singulares, marco legal restritivo quanto ao uso de células-tronco embrionárias de origem alemã e a possibilidade de importação de linhagens ⁹	- Alemanha

8 DINIZ, Debora; AVELINO, Daniel. Cenário internacional da pesquisa em células-tronco embrionárias. **Rev. Saúde Pública**, São Paulo, v. 43, n. 3, June 2009. Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-89102009000300019&lng=en&nrm=iso>. access on 24 Jan. 2015. Epub Apr 17, 2009.

9 Existe um consenso de que a história do nazismo dificulta o debate democrático e razoável na Alemanha, por isso a proibição de uso de material biológico nativo; porém, dada a legitimidade do princípio da liberdade de pesquisa, foi permitida a garantia do direito à investigação científica com linhagens importadas. Isso gerou mal estar entre vários países, culminando em várias discussões internacionais no campo da bioética.

Regulamentações	Países
<ul style="list-style-type: none"> · Proíbem a pesquisa com células-tronco embrionárias humanas¹⁰ 	<ul style="list-style-type: none"> - Itália, Áustria, Lituânia e Irlanda
<ul style="list-style-type: none"> · Comitê Consultivo de Bioética propôs a abertura das pesquisas com embriões humanos em 2001, amparado em dois argumentos centrais para a tradição judaica: primeiro, o status moral de um embrião congelado é comparável ao de gametas, portanto, não há qualquer ameaça à dignidade humana em sua manipulação para fins científicos; e segundo, vê-se grande valor nas tentativas científicas de cura e tratamento para doenças, por isso a posição marcadamente favorável às pesquisas genéticas no país, inclusive em relação à clonagem terapêutica 	<ul style="list-style-type: none"> - Israel
<ul style="list-style-type: none"> · Outros países que permitem pesquisas com células tronco 	<ul style="list-style-type: none"> - Canadá, Austrália, Suíça, Coreia, México, Rússia, Japão, Noruega, - Reino dos Países Baixos, Irlanda do Norte, República da África do Sul, Cingapura, Portugal

Como exposto na literatura científica, experimentos com animais mostraram um potencial terapêutico inigualável para as células-tronco embrionárias humanas, pois, essas células foram capazes de aliviar, diminuir e/ou curar sintomas de diversas patologias, dentre as quais o mal de Parkinson e a lesão de medula espinhal. O mesmo resultado não foi alcançado por células tronco adultas oriundas da medula óssea, do cordão umbilical e/ou do tecido adiposo.

A “LEI DE BIOSSEGURANÇA”, em síntese, permite a realização de pesquisa e terapia com células-tronco embrionárias humanas, tendo em vista a grande importância científica e estratégica para a saúde pública nacional, assinalando assim para o mundo o que chamamos de primeiro passo para o avanço da ciência brasileira neste setor¹¹.

Os cientistas e pesquisadores brasileiros hoje têm amparo legal para desenvolver suas pesquisas, cabendo a eles contribuir para dar o retorno que a sociedade quer e espera em nome da vida.

10 A singularidade da lei italiana no cenário internacional se deve à presença marcante da Igreja Católica nas decisões do Estado. Da mesma forma, nos demais países a proibição teve um viés meramente religioso, em função da força da Igreja junto aos congressistas.

11 Disponível em <<http://www.academialetrasbrasil.org.br/fcoaguiarceluastronco.doc>>; Acessado em 24/01/2015.

O Supremo Tribunal Federal julgou constitucional o artigo 5º da Lei 11.105/2005 (Lei de Biossegurança) que *dispõe o artigo 5 da Lei nº 11.105/2005:*

“Art. 5º É permitida, para fins de pesquisa e terapia, a utilização de células-tronco embrionárias obtidas de embriões humanos produzidos por fertilização in vitro e não utilizados no respectivo procedimento, atendidas as seguintes condições:

I – sejam embriões inviáveis; ou

II – sejam embriões congelados há 3 (três) anos ou mais, na data da publicação desta Lei, ou que, já congelados na data da publicação desta Lei, depois de completarem 3 (três) anos, contados a partir da data de congelamento.

§1º Em qualquer caso, é necessário o consentimento dos genitores.

§ 2º Instituições de pesquisa e serviços de saúde que realizem pesquisa ou terapia com células-tronco embrionárias humanas deverão submeter seus projetos à apreciação e aprovação dos respectivos comitês de ética em pesquisa.

§ 3º É vedada a comercialização do material biológico a que se refere este artigo e sua prática implica o crime tipificado no art. 15 da Lei no 9.434, de 4 de fevereiro de 1997”.



ÉTICA¹²

12 Disponível em < http://www.portalbioetica.com.br/adm/artigos/celulastronco_sergio.pdf>; Acessado em 24/01/2015.

Avanços nas pesquisas com células-tronco embrionárias têm proporcionado grande entusiasmo aos pesquisadores quanto à perspectiva de sucesso no tratamento de algumas enfermidades e simultaneamente vem promovendo acirrados debates éticos, tudo em função da forma de obtenção das células tronco embrionárias para uso terapêutico.

Geralmente, as pesquisas nessa área sugerem selecionar células provenientes de pré-embriões (blastocistos) com idade entre 5 a 7 dias de desenvolvimento. Sejam os embriões fonte de material de aborto ou pré-embriões, inicia-se sempre a discussão ética sobre o estatuto moral do embrião. Indaga-se: qual o grau de respeito que se deve ter para com ele?

Há quem julgue que o embrião é defensável por ser geneticamente único e irreprodutível, pertencente à espécie *Homo sapiens*, ser dotado de potencialidade de vida, estar em constante desenvolvimento, sendo capaz portanto, de atingir o estágio somático e cognitivo de uma pessoa em sua plenitude. De forma contrária, há quem defenda que o pré-embrião é somente um conjunto de células, sem qualquer semelhança com uma pessoa e, além do mais, destituído de autoconsciência.

Eticamente, é consenso geral que abortar um embrião, com a finalidade única e exclusiva de se obter células-tronco embrionárias com o propósito terapêutico é injustificável. Entretanto, levando-se em consideração que grande número de pré-embriões crio-preservados são descartados após algum tempo de armazenagem ou que podem permanecer estocados nos bancos, sem que os pais biológicos reclamem por eles, por períodos superiores a três anos, por que não utilizá-los em pesquisas? Não seria um gesto semelhante à doação de um órgão para transplante? O art. 5º da Lei de Biossegurança reza isso, e pesquisas nessa área requerem o consentimento dos genitores, sendo que as instituições de pesquisa e de serviços de saúde que realizem pesquisa ou terapia com células-tronco embrionárias humanas, devem submeter seus projetos à apreciação e aprovação dos respectivos comitês de ética em pesquisa.

Novos dilemas éticos envolvidos na utilização dessa tecnologia poderiam ser levantados, a exemplo da possível destinação de células-tronco obtidas por transferência do núcleo de células somáticas do próprio receptor, ao gerar um blastocisto clonado. Seriam embriões produzidos pela junção de óvulos não fertilizados por espermatozoides, o que, teoricamente, reduz a possibilidade de rejeição, uma vez que o material genético a ser transferido presente no núcleo da célula do embrião doador pertence ao próprio receptor. Por fim, ressaltam-se ainda os aspectos que envolvem a confidencialidade, a privacidade e o patenteamento. Cada um desses tópicos ensejaria uma ampla discussão no campo da moral.



CLONAGEM REPRODUTIVA E CLONAGEM TERAPÊUTICA

Curiosidade

O Professor Ian Wilmut, do Instituto Roslin da Escócia, realizou em 1996, uma substituição do núcleo de um óvulo pelo núcleo de uma célula mamária proveniente de uma ovelha adulta. Assim nasceu a ovelha Dolly, em 5 de Julho de 1996, o primeiro mamífero clonado por transferência de células somáticas. O núcleo utilizado no processo de clonagem foi oriundo de uma célula da glândula mamária da ovelha Belinda – uma ovelha de 6 anos de idade, da raça Finn Dorset. Uma outra ovelha, Fuffy, da raça Scottish Blackface, foi a doadora do óvulo utilizado para receber o núcleo. Finalmente uma terceira ovelha, Lassie, da raça Scottish Blackface, foi quem gestou a ovelha Dolly. Para evitar-se que pudessem ser misturadas às características dessas três fêmeas, elas eram de raças com características fenotípicas diferentes entre si. Não foi um processo fácil: Dolly só nasceu depois de 276 tentativas que fracassaram. Além disso, dentre as 277 células “da mãe de Dolly” que foram inseridas em um óvulo sem núcleo, 90% não alcançaram nem o estágio de blastocisto. As tentativas posteriores de clonar outros mamíferos tais como camundongos, porcos, bezerros, um cavalo e um veado, também têm mostrado uma eficiência muito baixa e uma proporção muito grande de abortos e de embriões malformados. Penta, a primeira bezerra brasileira clonada a partir de uma célula somática adulta morreu em 2002, 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 isto foram utilizados 188 óvulos que geraram 87 embriões e apenas um animal vivo. Na realidade, experiências recentes, com diferentes tipos de animais, têm mostrado que a reprogramação dos genes, para o estágio embrionário, que originou Dolly, é extremamente difícil. Em 13 de abril de 1998 Dolly gerou um filhote, a ovelha Bonnie, em um cruzamento habitual com um carneiro Montês da raça Welch (David). Essa situação permitiu verificar que Dolly era fértil e capaz de se reproduzir. Em 1999 ela gerou mais três filhotes em uma única gestação, mas houve problemas e eles morreram. Em 2002 surgiu outra questão importante, que foi o diagnóstico de uma forma rara de artrite em Dolly (doença não habitual em ovelha de cinco anos), seria esse, pois um sinal de envelhecimento precoce? Qual seria a idade de Dolly? Uma infecção pulmonar não controlada comum em animais velhos mantidos em confinamentos, fez com que os pesquisadores optassem em 14 de janeiro de 2002, por submeter Dolly a uma eutanásia, para evitar o seu sofrimento.

Texto extraído de:

Dalva Alves das Neves (2010) Clonagem Reprodutiva. NASCER E CRESCER Revista do Hospital de Crianças Maria Pia. ano 2010, vol XIX, n.º 1

Disponível em <<http://repositorio.chporto.pt/bitstream/10400.16/670/1/v19n1artPAB.pdf>>;
Acessado em 22/11/2014.

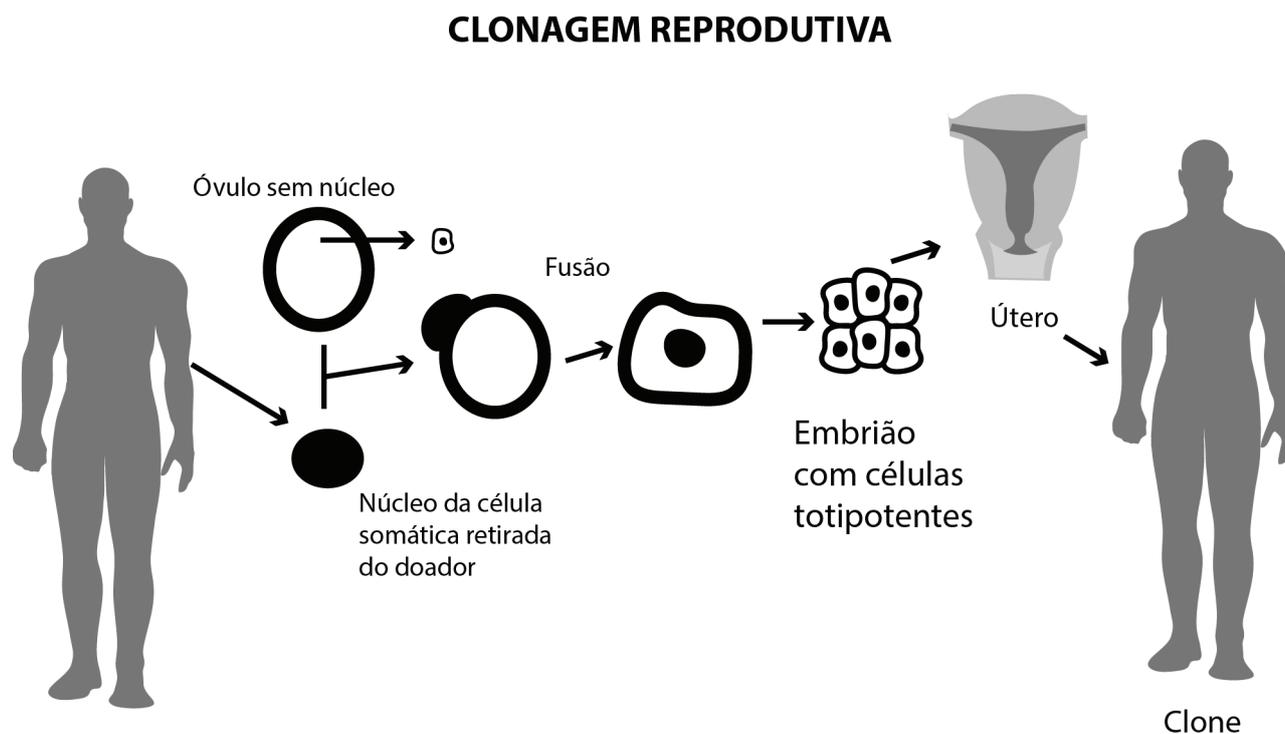
A palavra clone surgiu na língua inglesa no início do século XX, para identificar indivíduos idênticos geneticamente. Ela se origina palavra grega *Khon*, que quer dizer broto de um vegetal.

De acordo com a Lei de Biossegurança (art.3º, VIII, da Lei 11.105/2005), a clonagem é definida como “o processo de reprodução assexuada, produzida artificialmente, baseada em um único patrimônio genético, com ou sem utilização de técnicas de engenharia genética”.

A clonagem para fins reprodutivos, por sua vez, tem finalidade de obtenção de um indivíduo (art.3º, IX, da Lei 11.105/2005). Assim sendo, é necessário distinguir entre clonagem reprodutiva e clonagem não reprodutiva (ou clonagem terapêutica).

A clonagem pode se dar por: (a) divisão embrionária, em que há obtenção de dois ou mais embriões a partir da excisão de um embrião original ou de blastômeros dele isolados. Os produtos resultantes são clônics entre si, diferindo de seus progenitores; (b) transferência de núcleos de uma célula somática (diploide) a um óvulo ou zigoto enucleado (sem o núcleo haploide)¹³. Esse zigoto dará origem a um embrião *in vitro*, que poderá ser congelado ou descartado para gerar células embrionárias em cultivo, apresentando potencial de formar um indivíduo, se reimplantado no útero de uma mulher.

CLONAGEM REPRODUTIVA



Discutir clonagem reprodutiva é gerar vários questionamentos favoráveis e desfavoráveis em níveis sociais, éticos, religiosos e biológicos (Tabela 2).

13 Disponível em <http://www.conpedi.org.br/manaus/arquivos/anais/bh/denise_hammerschmidt.pdf>; Acessado em 24/01/2015.

Tabela 2 – Diferentes questionamentos referentes à Clonagem Reprodutiva

Pontos Favoráveis	Pontos desfavoráveis
<ul style="list-style-type: none"> · Direito à liberdade de reprodução, o que contornaria problemas de infertilidade; · Possibilidade de evitar riscos de transmitir ao descendente uma doença hereditária grave; 	<ul style="list-style-type: none"> · O direito de todo ser humano de ser concebido por processos naturais de sua espécie; · Perigo de causar no indivíduo importantes alterações genéticas; · Risco de aumentar a fragilidade imunológica da espécie humana ao suprimir a recombinação genética; · Violação à dignidade humana na criação de indivíduos mediante clonagem; · Questionável conteúdo ético da experimentação destinada a criar seres humanos; · Numerosos problemas que a clonagem gera na área da filiação humana, entre muitas outras; · Risco da destruição da identidade genética do ser humano, de se herdar um material genético intacto.

A definição de **identidade genética** está relacionada com o genoma de cada indivíduo e com as bases biológicas de sua identidade. A individualização de um novo ser requer **unicidade**, a exemplo de gêmeos monozigóticos produzidos pela divisão de um embrião original, que é o único caso possível da identidade genética entre os indivíduos humanos, além da clonagem por transferência dos núcleos (clonagem reprodutiva), e **unicidade**, realidade positiva, que se distingue de toda outra, isto é, a de ser um só.

De 21 de outubro a 12 de novembro de 1997 a Declaração Universal sobre o Genoma Humano e os Direitos Humanos foi apresentada para adoção na 29ª sessão da Conferência Geral da Unesco. Em seus Artigos 1 e 2 rezam sobre a Dignidade Humana e o Genoma Humano.

Artigo 1 - O genoma humano constitui a base da unidade fundamental de todos os membros da família humana bem como de sua inerente dignidade e diversidade. Num sentido simbólico, é o patrimônio da humanidade.

Artigo 2 –

a) A todo indivíduo é devido respeito à sua dignidade e aos seus direitos, independentemente de suas características genéticas.

b) Esta dignidade torna imperativa a não redução dos indivíduos às suas características genéticas e ao respeito à sua singularidade e diversidade..

Disponível em <<http://unesdoc.unesco.org/images/0012/001229/122990por.pdf>>; Acessado em 24/01/2015.

No dia 16 de Outubro de 2004, no decurso da sua 32ª sessão, a Conferência Geral da UNESCO aprovou por unanimidade e aclamação a **Declaração Internacional sobre os Dados Genéticos Humanos**. Em seu Artigo 3º, versa sobre a Identidade da pessoa nos seguintes termos:

...Cada indivíduo tem uma constituição genética característica. No entanto, não se pode reduzir a identidade de uma pessoa a características genéticas, uma vez que ela é constituída pela intervenção de complexos factores educativos, ambientais e pessoais, bem como de relações afectivas, sociais, espirituais e culturais com outros indivíduos, e implica um elemento de liberdade.

Disponível em < http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/declaracao_inter_dados_genericos.pdf>; Acessado em 24/01/2015.

A clonagem reprodutiva encontra-se **proibida expressamente** na Declaração Universal sobre o Genoma Humano e os Direitos Humanos da UNESCO (art.11); no protocolo adicional do Convênio sobre Direitos Humanos e Biomedicina (art.1º); na Constituição europeia em seu artigo II -63.2; e na Declaração das Nações Unidas sobre Clonagem Humana 59/280, de 8 de março de 2005, bem como em outros documentos.

PARA REFLETIR

[...] O professor e pesquisador Fermin Roland Schramm alinha-se com os que defendem a existência de uma distinção objetiva existente entre dois tipos de identidade: a identidade genética (ou biológica) e a identidade pessoal (ou antropológica). A primeira é resultante do fato de o indivíduo ser um organismo biológico, estudado pelas ciências biológicas. A segunda é resultante do fato de o indivíduo ser racional e autônomo, ter consciência própria, ou seja, ser uma pessoa estudada pelas ciências humanas e pela filosofia. E conclui:

“Assim, um clone perfeito pode ser idêntico a seu ‘genitor’ em termos biológicos (pois compartilha o mesmo DNA), mas não do ponto de vista ‘pessoal’. A Segunda condição exigiria uma sinergia altamente improvável de inúmeras condições idênticas: o mesmo tipo de experiências, o mesmo tipo de ambiente e uma coincidência no espaço-tempo com o ‘outro’, algo impossível tanto do ponto de vista físico quanto do lógico. [...] Usando a linguagem da lógica moderna, diz-se que dois indivíduos (o ‘clonável’ e o ‘clonado’) podem ter a mesma *identidade genérica*, definida pelas características comuns à mesma classe de ‘objetos’ *Homo sapiens sapiens*, mas nunca terão a mesma ‘identidade específica’, ou ‘*iPSC*idade’, um conceito filosófico, antropológico e psicológico.

Portanto, um clone de Chopin, não será necessariamente um novo Chopin, pois “ao clonar características genéticas, clona-se a biologia do indivíduo, não sua personalidade. Esta certamente será influenciada pela biologia, mas não pode ser reduzida a ela. Assim, esse conjunto de identidade formado pelo eu mais suas circunstâncias, [...] constitui a ‘pessoa’, necessariamente distinta do organismo biológico pertencente à espécie *Homo sapiens sapiens*”[...]

Texto de **Edna** Raquel R. S. Hogemann, Disponível em <<http://br.monografias.com/trabalhos/oprin/oprin.shtml>>; Acessado em 24/01/2015.

Referências adicionais:

http://www.conpedi.org.br/manaus/arquivos/anais/bh/denise_hammerschmidt.pdf

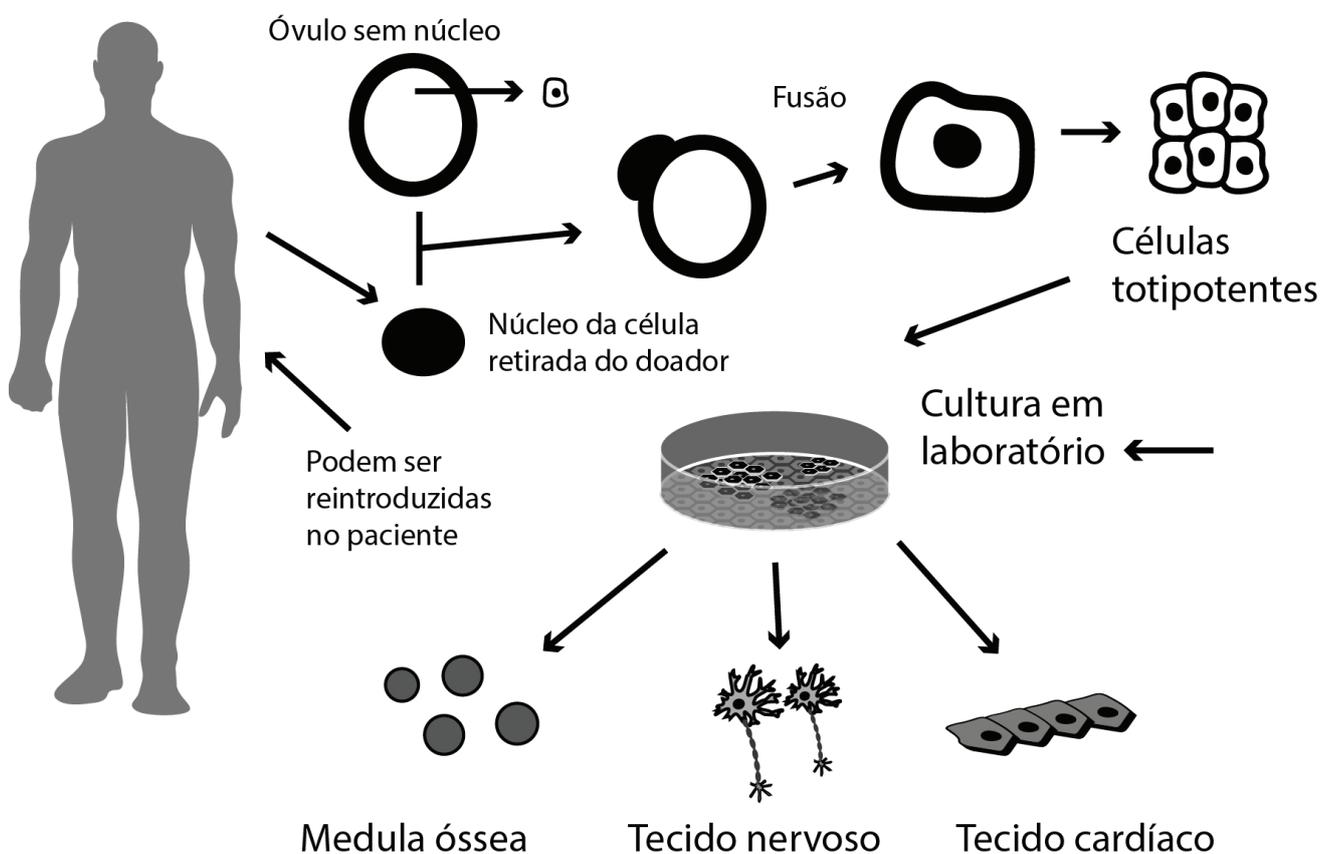
<http://repositorio.chporto.pt/bitstream/10400.16/670/1/v19n1artPAB.pdf>

<http://www.scielo.br/pdf/ea/v18n51/a16v1851.pdf>

CLONAGEM TERAPÊUTICA

De acordo com a Lei 11.105/2005, a clonagem terapêutica é mencionada como sendo “a clonagem com a finalidade de produção de células-tronco embrionárias para utilização terapêutica (art.3º, XI)”, visando à investigação básica ou clínica na reparação de tecidos ou órgãos danificados. Nesse caso, o núcleo somático do paciente seria transferido para um óvulo enucleado¹⁴. O embrião clonado seria cultivado *in vitro* até o estágio de blastócito, quando seria dissociado para a obtenção de células tronco embrionárias na figura.

CLONAGEM TERAPÊUTICA ou TRANSFERÊNCIA DE NÚCLEO



14 Disponível em http://www.conpedi.org.br/manaus/arquivos/anais/bh/denise_hammerschmidt.pdf; Acessado em 24/01/2015.

É importante ressaltar que uma das grandes possibilidades da clonagem terapêutica é ser fonte de tecidos para transplantes. Um grande obstáculo para os transplantes de tecidos e órgãos é a histocompatibilidade entre doador e receptor, e uma solução para evitar a questão da rejeição do órgão seria a geração de células-tronco embrionárias geneticamente idênticas ao paciente por meio de transferência nuclear¹⁵.

A Lei de Biossegurança (11.105/2005) permite, para fins de pesquisa e terapia, a utilização de células-tronco embrionárias obtidas de humanos produzidos por fertilização *in vitro* e não utilizados no respectivo procedimento (art.5º), atendidas as seguintes condições:

[...]

- I- sejam embriões inviáveis; ou
- II- embriões congelados há três anos ou mais, na data da publicação desta Lei; e (c) já congelados na data da publicação desta Lei, depois de completarem três anos, contados a partir da data de congelamento. [...] O texto integral da Lei está disponível em <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2004-2006/2005/lei/l11105.htm>. Acesso em 15/04/2015.

Em ambos os casos discriminados acima, é preciso o consentimento dos genitores.

O Decreto n.5591/2005 que regulamenta os dispositivos da Lei 11.105/2005 dispõe que será considerado embrião congelado disponível aquele que foi congelado até o dia 28 de março de 2005 (3º, XIV), fixando dessa maneira, o prazo legal, para utilização dos embriões humanos criopreservados.

Além disso, sabe-se que as células-tronco embrionárias são dissociadas na fase do blastócito de um embrião humano clonado. Portanto, a obtenção de células-tronco embrionárias envolve obrigatoriamente a destruição do embrião humano. Desse modo, apesar da não criminalização da clonagem terapêutica, constata-se que sua aplicação estaria condicionada ao disposto no artigo 5º da Lei 11.105/2005, que somente permite a utilização de células-tronco-embrionárias humanas excedentes das técnicas de fertilização *in vitro* e não utilizadas no respectivo procedimento.

De acordo com essa perspectiva - e em uma interpretação sistemática- teleológica¹⁶, o legislador, ao preceituar que a clonagem terapêutica tem por finalidade a produção de células-tronco embrionárias para utilização terapêutica, condiciona o uso da clonagem terapêutica aos limites de permissibilidade dispostos no artigo 5º da Lei 11.105/2005. Na hipótese de descumprimento, o agente responderá pelo delito disposto no artigo 24 da Lei de Biossegurança ("utilizar embriões humanos em desacordo com o que dispõe o art. 5º, e não pelo delito de clonagem, estabelecido no art. 26 da mesma lei).

15 ZATS, Mayana. Clonagem e Células-tronco. Estudos Avançados, v.18, n.51, p. 247-248, mai./ago. 2004.

16 Teleológico é um adjetivo que em filosofia, refere-se a argumento, conhecimento ou explicação que relaciona um fato a sua causa final.

Vale a pena assistir:

A Ilha

Sinopse do filme - O filme conta a história de Lincoln Six-Echo, um morador de uma colônia humana muito bem controlada, em meados do século XXI. A Ilha é o único lugar do planeta livre da contaminação que os isolou naquela colônia. Porém, Lincoln descobre que todo o esquema que conhece é uma mentira. Percebendo que sua vida corre perigo, ele e sua colega Jordan Two-Delta fogem da colônia e passam a ser perseguidos.

Título original: *The Island*, Distribuidor **WARNER BROS**, Ano de produção 2004.

Atividade em sala sobre o filme

O professor pode criar um debate com os alunos acerca de questões relacionadas com a clonagem e a ética.

Questões que podem ser abordadas:

- 1- Gasta-se uma soma vultuosa de dinheiro nas pesquisas de clonagem. Que vantagens podem vir dessa técnica?
- 2- Que problemas as pessoas veem na clonagem, principalmente dos seres humanos?
- 3- Que setores de nossa sociedade se mobilizariam para aceitar ou repudiar a clonagem? Quais seriam seus argumentos?
- 4- Assim como apresentado no filme, é justificável a clonagem de um ser humano com a finalidade de utilizar partes do corpo de um clone para salvar uma outra vida?

Após o debate, pedir aos alunos que escrevam uma análise do filme e das questões debatidas em um texto dissertativo individual, mostrando sua posição frente à clonagem.

CONTORNANDO O PROBLEMA ÉTICO DE DESTRUIÇÃO DE EMBRIÃO

Visando contornar o problema do *descarte* de embriões para obtenção de células tronco embrionárias, foi anunciada em 2007 a criação de células tronco pluripotentes induzidas (do inglês, *induced pluripotent stem cells - iPSCs*) a partir de células somáticas de indivíduo adulto, as quais foram reprogramadas para se tornar pluripotentes^{17,18}. A princípio, essa tecnologia

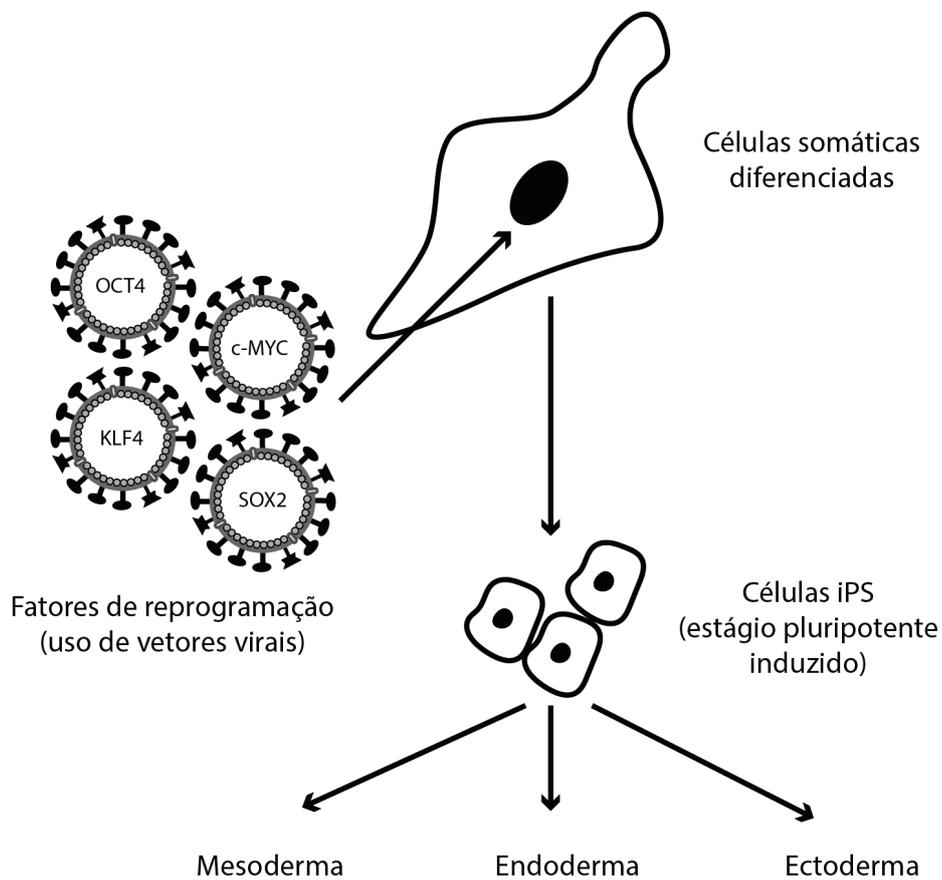
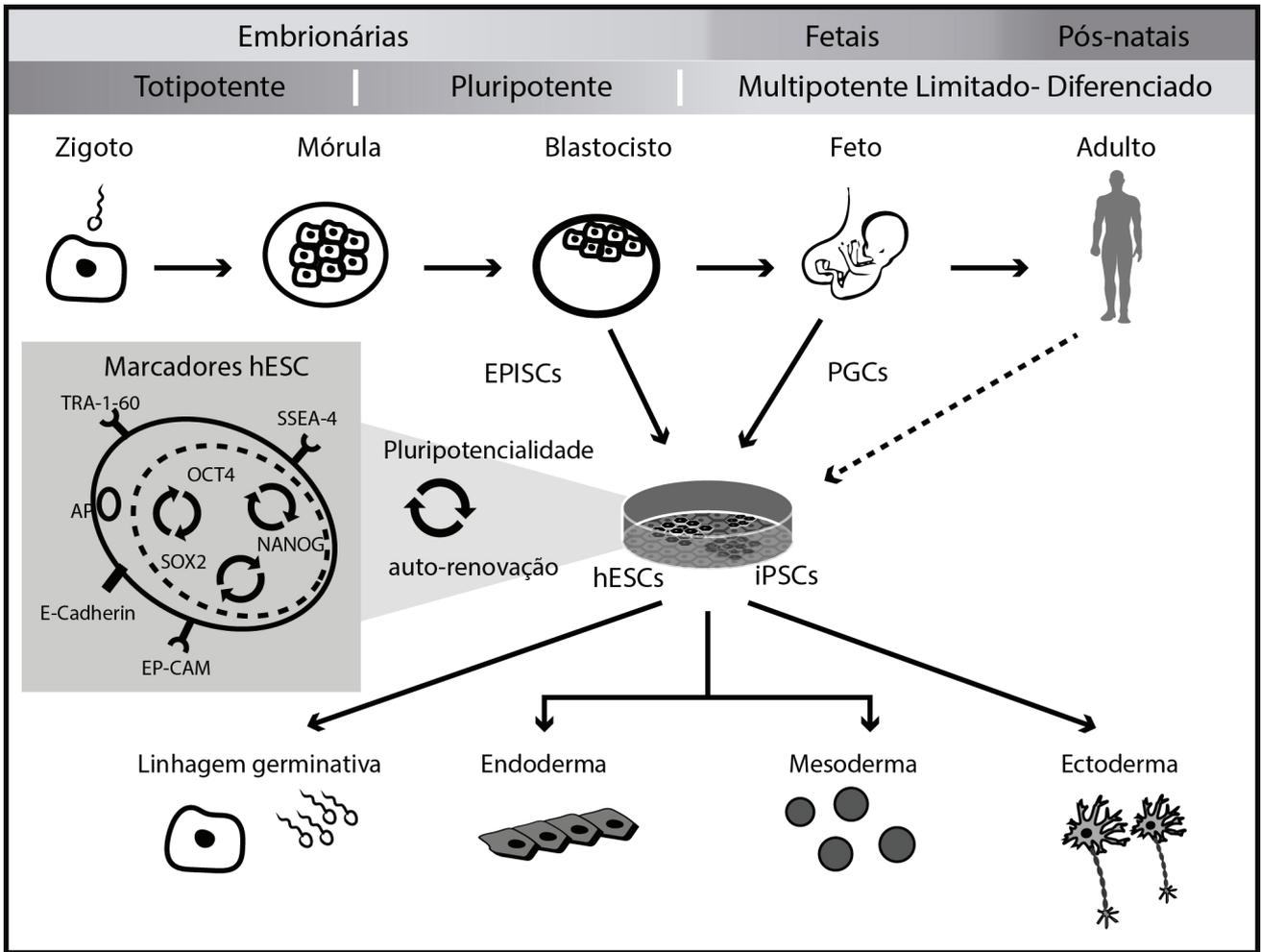
17 Takahashi et al. (2007). Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131, 861–872.

18 Yu et al. (2007). Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* 318, 1917–1920.

pode eliminar a necessidade de destruição de células embrionárias. A seguir será abordado o conteúdo sobre as células *iPSCs* contudo, não deve ser esquecido que, ainda que seja possível obter células embrionárias sem destruir o embrião pela técnica de *iPSCs*, muitos embriões ainda continuarão sendo descartados pela fertilização *in vitro*.



CÉLULAS TRONCO PLURIPOTENTES INDUZIDAS



As células-tronco de pluripotência induzida são células obtidas a partir da expressão de fatores de transcrição¹⁹ relacionados à pluripotência em células tronco embrionárias, permitindo que uma célula somática tenha seu estado diferenciado revertido a um estado semelhante ao embrionário.

A reprogramação *in vitro* de células somáticas, para a geração de *iPSC* não somente contornaria os problemas éticos associados ao uso de células embrionárias, mas também minimizaria potencialmente os riscos de rejeição imunológica pós-transplante.

A descoberta da tecnologia das células *iPSC* foi fundamentada na hipótese de que a reprogramação nuclear é um processo conduzido por fatores solúveis que estão presentes no ovócito e que desempenham papéis críticos na manutenção do estado pluripotente das células tronco embrionárias.

Inicialmente, a geração de *iPSC* foi possível pela combinação de quatro genes relacionados à pluripotência, *OCT4* (ou *POU5F1*), *SOX2*, *KLF4* e *C-MYC* (*OSKM*), sendo que esse se tornou o método mais comum aplicado na reprogramação *in vitro* de células somáticas. Embora essa combinação original de fatores de transcrição seja a mais utilizada, células *iPSC* podem ser obtidas utilizando-se diferentes combinações desses mesmos fatores de transcrição, ou ainda substituindo *KLF4* e *C-MYC* por *NANOG* e *LIN28*.

Com relação as suas características, Takahashi e colaboradores demonstraram que essas células adquirem propriedades similares às das células tronco embrionárias com relação à morfologia, proliferação, expressão de alguns dos genes marcadores de células tronco embrionárias e formação de tumores contendo uma variedade de tecidos originários dos três folhetos embrionários após o transplante subcutâneo destas células em camundongos *NOD/SCID*, que têm sistema imunológico gravemente comprometido, mas não totalmente inoperante. Esse resultado foi confirmado e expandido em uma série de trabalhos, utilizando diversos tipos celulares animais e humanos, que estabeleceram que as células *iPSC* são, em nível molecular e funcional, similares às células tronco embrionárias.

Em humanos, a reprogramação tem sido realizada a partir de células de pacientes com várias doenças neurodegenerativas como esclerose lateral amiotrófica (ELA)²⁰, atrofia muscular espinhal (AME)²¹, e doença de Parkinson²², além de várias doenças genéticas de herança complexa ou Mendeliana. Vários grupos demonstraram que tipos celulares relacionados

-
- 19 Os fatores de transcrição são responsáveis pelo posicionamento correto da RNA-polimerase no promotor. Eles ajudam na separação das fitas de DNA para permitir o início da transcrição, e liberam a RNA-polimerase do promotor quando a transcrição se inicia. A expressão dos genes relacionados com a pluripotência reprograma as células somáticas para um estado mais progenitor/embrionário.
- 20 Dimos et al. 2008. Induced pluripotent stem cells generated from patients with ALS can be differentiated into motor neurons. *Science*, **321**(5893): p. 1218-21.
- 21 Ebert et al. 2009. Induced pluripotent stem cells from a spinal muscular atrophy patient. *Nature*, **457**: p. 277-80.
- 22 Soldner et al. 2009. Parkinson's disease patient-derived induced pluripotent stem cells free of viral reprogramming factors. *Cell*, **136**(5): p. 964-977.

com uma doença são diferenciados a partir de células *iPSC* e são capazes de reproduzir fielmente os fenótipos das doenças. A descoberta das *iPSC* abriu uma nova possibilidade para o desenvolvimento de modelos de doença *in vitro* em humanos para a investigação da fisiopatologia e no auxílio ao desenvolvimento de drogas, sendo que esse, em curto prazo, é um dos aspectos mais importantes dessa tecnologia.

Com um crescimento acelerado, a área da pluripotência induzida reconheceu a necessidade de protocolos eficientes e reprodutíveis, que permitissem a geração de células *iPSC* clinicamente seguras. Eficiência, reprodutibilidade e segurança são determinados principalmente pelos métodos utilizados para introduzir os fatores de transcrição nas células somáticas de interesse e pela extensão das modificações genômicas necessárias para a geração dessas células.

REFERÊNCIA

Texto extraído de: REIS, Luiza Cunha Junqueira. Geração de células de pluripotência induzida (*iPSC*) humanas utilizando vetores lentivirais e determinação do perfil de integração lentiviral. 2012. Dissertação (Mestrado em Biociências Aplicadas à Farmácia) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/60/60135/tde-26022013-092913/>>. Acesso em: 23/11/2014.



CÉLULAS TRONCO
ADULTAS

Na fase adulta, as células tronco persistem nos tecidos e têm as funções de reparo de lesões e de regeneração tecidual nos indivíduos. Certa população de células tronco é mantida nos tecidos, porque muitas células adultas quando atingem sua diferenciação terminal (aquisição de suas características finais), perdem a capacidade de divisão mitótica, morrem e necessitam ser substituídas. Essas populações de células-tronco que persistem ao longo da vida do indivíduo são denominadas células tronco adultas. As células-tronco adultas apresentam potencial de diferenciação um pouco mais restrito que as células tronco embrionárias.

As células-tronco adultas estão presentes em praticamente todos os tipos de tecidos, no entanto, seu número em relação aos outros tipos celulares é baixa, o que torna essas células difíceis de identificar, isolar e purificar. Essas células já foram isoladas de muitos tecidos e órgãos, tais como: tecido da polpa dentária, tecido adiposo de lipoaspiração, sangue do cordão umbilical, sangue menstrual, medula óssea, fígado, tecido do cordão umbilical, etc.

Devido a sua função de manutenção de tecidos adultos e de resposta a lesões do organismo, atribui-se às células-tronco adultas um grande potencial terapêutico no tratamento das mais variadas injúrias, como diabetes, doenças autoimunes, na hematologia, na oftalmologia e na regeneração de lesões provocadas por acidentes. Devido a esse potencial, tais células têm se tornado alvo de inúmeras pesquisas nos últimos anos, muitas das quais obtiveram resultados promissores. Ao contrário das células tronco embrionárias, as células tronco adultas não formam teratomas e nem tumores, o que as torna mais seguras para uma terapia celular.

Visando à terapia celular, existe um muito grande interesse no uso de células tronco denominadas mesenquimais.

CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS

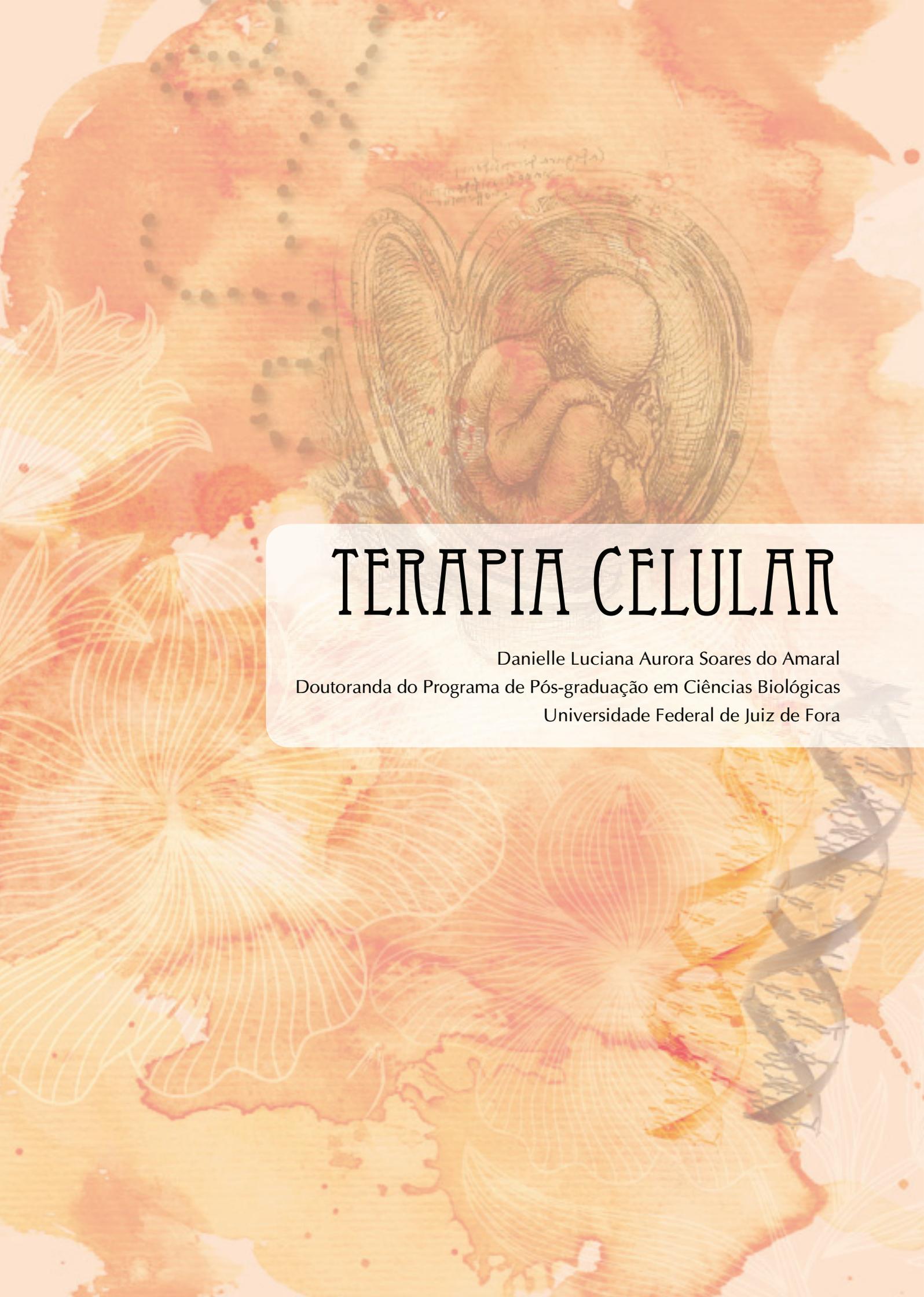
No sangue humano é possível isolar duas populações de células tronco: uma que dá origem a todas as células que compõe o sistema hematopoético, que são as células tronco hematopoéticas; e outra que foi denominada como mesenquimal, a qual é capaz de se diferenciar em muitos tipos celulares, a saber, osteoblastos, condroblastos, adipócitos, neurônios, etc. Dado a seu potencial na terapia celular e visando a uma padronização dessas células, a Sociedade Internacional de Terapia Celular (*International Society for Cellular Therapy*)²³ propôs três critérios básicos para que células possam ser definidas como sendo células-tronco mesenquimais. Elas devem ser:

- 1- plástica-aderentes caso mantidas em condições básicas de cultura;
- 2- positivas para os marcadores CD105, CD73 e CD90 e negativas para CD45, CD34, CD14 e CD11b, e;

23 Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8(4):315-7

- 3- capazes de se diferenciar em fibroblastos, osteoblastos, adipócitos e condroblastos quando expostas *in vitro* a agentes indutores químicos.

Essas células estão sendo testadas em terapias de medicina regenerativa e seu potencial para formar osso, cartilagem e tecido adiposo, tanto *in vivo* quanto *in vitro*, tem sido bem documentado. Porém, sua plasticidade não se limita a derivações mesenquimais. Relatos têm sugerido que as células tronco mesenquimais podem se diferenciar em neurônios, mioblastos, e cardiomiócitos. Vários estudos têm mostrado que células com características precursoras mesenquimais podem também ser isoladas a partir da medula óssea de muitos mamíferos tais como: roedores, felinos, canídeos e suínos.



TERAPIA CELULAR

Danielle Luciana Aurora Soares do Amaral
Doutoranda do Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas
Universidade Federal de Juiz de Fora

Agora que o cenário sobre células tronco foi apresentado e os conceitos em relação a elas foram construídos, vamos passar a abordar a Terapia Celular.

De acordo com o Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Terapia Celular (INCTC)²⁴, a terapia celular, por definição mínima, compreende a utilização de células com objetivos terapêuticos. Essas células podem ser usadas das mais diferentes maneiras: injetadas endovenosamente para exercerem ações sistêmicas ou atingirem órgãos e tecidos protegidos, como a medula óssea ou o sistema nervoso central; usadas localmente ou injetadas diretamente no tecido ou órgão comprometido com o objetivo de promover algum efeito benéfico regenerativo ou protetor.

As células usadas para fins da terapia celular podem variar amplamente com relação ao seu estado de maturação e diferenciação. Podem ser utilizadas células maduras do sangue periférico como eritrócitos, leucócitos e plaquetas como acontece, por exemplo, nas transfusões sanguíneas, ou ainda linfócitos ou células dendríticas sensibilizadas *in vitro* nas chamadas vacinas celulares; como também podem ser utilizadas células tronco ou células progenitoras com o objetivo de promover o reparo ou mesmo a total substituição de um tecido ou órgão lesado. Neste último caso temos o exemplo, consolidado por mais de 40 anos de experiência, dos transplantes de células-tronco hematopoéticas derivadas da medula óssea, do sangue periférico ou do sangue do cordão umbilical e que são capazes de reconstituir todo o sistema hematopoético.

Uma das principais questões a ser abordada é a **dose de célula** a ser transplantada em um paciente, o que proporcionaria um tratamento bem sucedido. Assim como ocorre com os medicamentos, deve haver uma correlação entre o número de células e o peso corporal do paciente. De acordo com a literatura, não existe um consenso entre os pesquisadores sobre a dose de células necessária.

Atualmente, as células mais utilizadas nesse tipo de terapia são células tronco hematopoiéticas presentes no sangue do cordão umbilical e da medula óssea e, em alguns casos, no sangue periférico. O sangue do cordão umbilical humano tem sido reconhecido como uma fonte rica de células progenitoras hematopoiéticas primitivas e comprometidas. Além disso, a disponibilidade geral e a facilidade de aquisição fazem com que o cordão umbilical seja uma fonte alternativa muito atraente de células hematopoiéticas transplantáveis. Estudos sugerem que, em função do número de células progenitoras presentes no sangue do cordão umbilical, essas células só podem ser transplantadas com restrições em crianças e em alguns adultos, pesando até 40 kg de peso corporal²⁵.

24 Disponível em <<http://lgmb.fmrp.usp.br/inctc/>>; Acessado em 18/01/2015.

25 Fernando de Sá Silva, Paula Nascimento Almeida, João Vitor Paes Rettore, et al., "Toward Personalized Cell Therapies by Using Stem Cells: Seven Relevant Topics for Safety and Success in Stem Cell Therapy," *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, vol. 2012, Article ID 758102, 12 pages, 2012. doi:10.1155/2012/758102

ADMINISTRAÇÃO DAS CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS

Existem várias dúvidas em relação à administração das células tronco, tais como o momento da injeção das células, o número de células injetadas e o sítio de injeção²⁶. Shenk e colaboradores demonstraram que grande número de células injetadas precocemente após um evento isquêmico resulta em melhores índices de fixação. As células tronco mesenquimais demonstraram se fixar melhor ao miocárdio quando injetadas no primeiro dia após o infarto agudo do miocárdio, comparativamente à injeção no 14º dia, sugerindo que essas células agem especificamente em resposta à isquemia²⁷.

O meio de administração das células-tronco mesenquimais também pode influenciar o caminho (ou endereçamento ou *Homing*) que essas células percorrem até atingir o órgão-alvo, sejam injetadas por via subcutânea, intraperitoneal, intravenosa, etc. Para entendermos melhor por que muitas pesquisas investigam o comportamento de enxertia das células tronco em diferentes vias de inoculação, abordaremos no **Quadro 2** sobre a inoculação de medicamentos e drogas para se ter uma ideia das vantagens e desvantagens de cada via.

Quadro 2 – Vias de inoculação e suas características

Vias de inoculação	Observações
Intravenosa	<ul style="list-style-type: none">• Menos invasiva;• Soluções não irritantes com pH neutro;• Administração: Diretamente na circulação sanguínea;• Pico de concentração plasmática: Poucos minutos após a administração;• Rápida distribuição no organismo
Intraperitoneal	<ul style="list-style-type: none">• Administração de grandes volumes de substâncias na forma líquida;• Absorção em tecidos e órgãos da cavidade peritoneal;• Desvantagem: parte da droga é absorvida pela circulação portal causando alteração na dosagem administrada.

26 Fonte: SOUZA, Cristiano Freitas de et al. Células-tronco mesenquimais: células ideais para a regeneração cardíaca?. **Rev. Bras. Cardiol. Invasiva**, São Paulo, v. 18, n. 3, 2010. Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2179-83972010000300019&lng=en&nrm=iso>. access on 19 Jan. 2015. <http://dx.doi.org/10.1590/S2179-83972010000300019>.

27 Schenk S, Mal N, Finan A, Zhang M, Kiedrowski M, Popovic Z, et al. Monocyte chemotactic protein-3 is a myocardial MSC homing factor. *Stem Cells*. 2007;25(1):245-51.

Intramuscular	<ul style="list-style-type: none"> Pequenos volumes, para preparações que formem precipitado ou apresentem irritação aos tecidos Libera a droga na corrente sanguínea aos poucos
Subcutânea	<ul style="list-style-type: none"> Utilizada para absorção mais lenta que na via intramuscular; Produtos implantados: absorção lenta e gradual; Locais de administração: <ul style="list-style-type: none"> - Região dorso lateral do pescoço - Ombro - Flancos
Intradérmica	<ul style="list-style-type: none"> Administração de pequenas quantidades de droga entre as camadas da pele; A eficiência de absorção aumenta de acordo com o veículo de preparação: <ul style="list-style-type: none"> - Óleo - Emulsão de óleo em água - Solventes orgânicos Desvantagem: variação de permeabilidade da epiderme entre as espécies
Intracraniana	<ul style="list-style-type: none"> Inserção de drogas diretamente no cérebro

Não existe uma tradução para o português da palavra em inglês *Homing*²⁸, mas essa palavra pode ser entendida como a distribuição ou o endereçamento das células tronco dentro do organismo. Embora esse processo ainda não esteja totalmente esclarecido, muito se tem investigado a respeito da mobilização de células tronco mesenquimais nativas e do *homing* das células tronco mesenquimais exógenas infundidas por diversas vias em resposta a um insulto isquêmico/inflamatório.

Diversos estudos demonstraram a capacidade de as células-tronco mesenquimais migrarem e se dirigirem para determinados órgãos e tecidos e enxertarem os mesmos. Allers e colaboradores²⁹ avaliaram a distribuição de células-tronco mesenquimais humanas após infusão venosa em ratos adultos não condicionados previamente. Nesse estudo, foi demonstrado que as células-tronco mesenquimais eram capazes de enxertar a medula óssea, o baço e os tecidos mesenquimais desses animais. Devine e colaboradores³⁰ avaliaram também a distribuição das células tronco mesenquimais em outros órgãos após infusão venosa em babuínos. Seus resultados com células tronco mesenquimais **alogênicas** assim como com as **autólogas** foram

28 Karp JM, Leng Teo GS. Mesenchymal stem cell homing: the devil is in the details. *Cell Stem Cell*. 2009;4(3):206-16.

29 Allers C, Sierralta WD, Neubauer S, Rivera F, Minguell JJ, Conget PA. Dynamic of distribution of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells after transplantation into adult unconditioned mice. *Transplantation*. 2004;78(4):503-8.

30 Devine SM, Cobbs C, Jennings M, Bartholomew A, Hoffman R. Mesenchymal stem cells distribute to a wide range of tissues following systemic infusion into nonhuman primates. *Blood*. 2003;101(8):2999-3001.

obtidos enxertando diversos tecidos, com nível de fixação variando entre 0,1% e 2,7%. Tais dados corroboram a ideia de que as células tronco mesenquimais participam da reposição celular em uma variedade de tecidos, preferencialmente em tecidos que sofreram injúria.

TIPOS DE ENXERTOS

Na medicina, um **enxerto** é um procedimento cirúrgico para transplantar células e/ou tecidos sem nutrição sanguínea.

O **enxerto autólogo** é, ainda, a referência (padrão ouro ou *gold standard*) devido a vantagens biológicas, por possuir alto poder integrado e preencher adequadamente os requisitos referentes à estrutura de arcabouço, essencial para a regeneração tecidual. As células tronco do próprio indivíduo / paciente podem ser obtidas de vários locais do corpo e, como são do próprio indivíduo, não apresentam rejeição. Porém, uma série de inconvenientes, como um maior período de convalescença, morbidade e susceptibilidade a infecções no sítio doador e a reabsorção progressiva e constante do enxerto, estimulou a busca de novos materiais para substituir esse tipo de enxerto.

O **enxerto alógeno** é obtido de outro indivíduo da mesma espécie, tendo como desvantagem a possibilidade de rejeição das células do doador por parte do organismo do receptor, além da possibilidade de transmissão de doenças, como por exemplo a AIDS ao receptor.

No **enxerto xenógeno**, o doador é de espécie diferente da do receptor. Esse tipo de enxerto é de fácil aquisição, baixo custo e com processamento mecânico e químico adequados, apresenta resultados promissores.

ATIVIDADE IMUNOSSUPRESSORA DAS CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS³¹

As células-tronco mesenquimais possuem a capacidade de se acumular ao redor de processos inflamatórios e tumorais quando administradas *in vivo*. Por esse motivo, essas células podem ser utilizadas em situações clínicas como terapia regenerativa, tratamento da doença do enxerto contra hospedeiro e terapia gênica para o câncer.

Atualmente sabe-se que as células-tronco mesenquimais podem imunomodular tipos celulares tanto do sistema imune inato como do sistema imune adaptativo, tais como células dendríticas, células *Natural Killer*, neutrófilos, linfócitos T e B, e células T regulatórias.

31 SOUZA, Cristiano Freitas de et al. Células-tronco mesenquimais: células ideais para a regeneração cardíaca?. **Rev. Bras. Cardiol. Invasiva**, São Paulo, v. 18, n. 3, 2010. Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2179-83972010000300019&lng=en&nrm=iso>. access on 22 Jan. 2015. <http://dx.doi.org/10.1590/S2179-83972010000300019>.

Na presença de células-tronco mesenquimais, as células dendríticas maduras diminuem a expressão de moléculas de superfície, tais como MCH II, CD11c, CD83 e moléculas coestimulatórias, além da diminuição da secreção de IL-12. A diminuição da expressão dessas moléculas e da secreção dessa citocina prejudica a apresentação antigênica por essa célula.

A inibição de células T por células-tronco mesenquimais leva à diminuição da produção de INF- γ tanto *in vitro* como *in vivo* e ao aumento da produção de IL-4, caracterizando uma alteração no perfil da resposta imune de pró-inflamatório para anti-inflamatório.

A maioria dos estudos realizados até o momento concorda que há participação de fatores solúveis envolvidos na imunossupressão, uma vez que o uso do sistema *transwell* (sistema que separa polimorfonucleares das células tronco mesenquimais por uma membrana semipermeável) não impede a inibição da proliferação. Esses resultados também deixam claro que, para ocorrer imunossupressão, não é necessário o contato célula-célula.

Dentre os fatores solúveis secretados pelas células-tronco mesenquimais objetivando a imunomodulação destacam-se: fator de crescimento transformante, fator de crescimento dos hepatócitos, indoleamina 2,3dioxigenase, prostaglandina 2 e óxido nítrico.



BIOENGENHARIA
TECIDUAL

Existe uma grande demanda para a restauração de tecidos lesionados em todo o mundo. Para superar esses problemas muitas pesquisas vêm sendo desenvolvidas na área de bioengenharia tecidual que envolve a introdução de células/ou agentes bioativos (fatores de crescimento, hormônios, etc.) com o auxílio de biomateriais (do inglês, *scaffolds*) tridimensionais biodegradáveis.

Os biomateriais são componentes chaves na engenharia tecidual, uma vez que agem como substratos temporários para a ancoragem de células que irão originar os novos tecidos. Esses materiais podem carrear fatores solúveis e insolúveis que modulam a função celular local. A forma como as células interagem com os biomateriais afeta seu comportamento: forte adesão celular e forma afilada estão associados com a proliferação, sendo que outras células devem ter a forma arredondada para desempenhar suas funções específicas. Baseado na morfologia celular, a relação espacial das células com sua matriz extracelular é importante para a correta função celular. O uso de biomateriais tridimensionais pode induzir a migração e proliferação celular sem prejudicar funções importantes para a diferenciação.

Os biomateriais tridimensionais podem ter macroporos ($> 10\mu\text{m}$) ou podem ser hidrogéis permeáveis. Existem biomateriais pré-formados que podem ser mais compatíveis, pois estes podem ser lavados com água por vários dias para a remoção de resíduos tóxicos.

I. PROPRIEDADES DOS BIOMATERIAIS

A. Biocompatibilidade

Os materiais biodegradáveis, a exemplo os utilizados em aplicações ortopédicas, devem ser primeiramente biocompatíveis, sendo esta característica importante para serem evitadas respostas inflamatórias. Fatores envolvidos com a biocompatibilidade (estrutura química, física e morfológica de superfície do polímero) podem ser afetados pelo processo de síntese ou pelas técnicas de processamento dos biomateriais. Os resíduos como estabilizadores, solventes orgânicos podem comprometer a biocompatibilidade. Além disso, como os biomateriais degradam *in vivo*, os produtos dessa degradação também devem ser biocompatíveis. Por exemplo, a liberação de alguns componentes ácidos de biomateriais pode causar necrose ou inflamação pela alteração de pH local.

B. Propriedades mecânicas

Algumas características mecânicas devem ser consideradas em materiais ortopédicos, tais como compressão, tensão, torção e dobramento. Na escala microscópica, a tensão local do polímero pode afetar a tensão mecânica gerada pelo citoesqueleto celular que controla a forma e a função celular. Por exemplo, superfícies rígidas podem causar a indução do citoesqueleto acarretando a divisão celular.

C. Promoção da formação tecidual

A formação de tecidos depende da porosidade, permeabilidade, tamanho e estrutura do poro bem como do tempo de degradação dos biomateriais. Poros com uma grande relação área/volume são necessários afim de maximizar o espaço de crescimento de células e para o estabelecimento da matriz extracelular. Pequenos poros são necessários para que se alcance uma alta área de superfície por unidade de volume e pelo diâmetro da célula em suspensão ter tipicamente 10µm. Entretanto, grandes poros facilitam a migração, o crescimento celular e a produção de ECM. Poros interconectados facilitam a difusão de nutrientes e remoção de metabólitos que aumentam a viabilidade das células e do núcleo das construções teciduais.

A taxa de degradação dos biomateriais é alterada por muitos fatores tais como a estrutura e peso molecular que compõe os materiais. A sua estrutura (taxa superfície-volume, porosidade, tamanho do poro, estrutura de poro) influencia em sua geometria. A quantidade de cargas mecânicas e a taxa de metabolismo afetam o tempo de degradação desses biomateriais. A erosão da superfície determina a degradação em camadas, fazendo com que os produtos sejam liberados gradualmente.

D. Esterilização

Os materiais ortopédicos devem ser facilmente esterilizados, para se prevenir a infecção, porém, esse processo não deve alterar a bioatividade ou a composição química dos materiais.

E. Processamento/Produto Final

Os biomateriais utilizados na engenharia tecidual podem ser produzidos em larga escala, desde que possuam uma longa vida de prateleira.

F. Tempo de ambientação/mudança de temperatura

Alterações de temperatura devem ser minimizadas no processo de armação do tecido, para que os danos teciduais sejam minimizados.

G. Viscosidade/facilidade de manuseio

A propriedade de viscosidade deve ser balanceada entre a necessidade de o material permanecer no sítio de injeção e a necessidade de o cirurgião manipular facilmente o implante.

II APLICAÇÕES DOS BIOMATERIAIS

A presença de biomateriais tridimensionais possibilita a regeneração, uma vez que promove a migração e a proliferação das células desejadas. Porém, em muitos casos a implantação apenas do biomaterial não é suficiente para a completa regeneração ortopédica. Desse modo, muitas pesquisas estão utilizando biomateriais para carregarem ECM, células, ou outros fatores pra melhorar a quantidade e qualidade dos tecidos formados.

A. Suportes à base de Matrizes Extracelulares

Matrizes Extracelulares (ou análogos) podem ser criadas pela pré-cultura de biomateriais com células autogênicas em biorreatores ou a partir de combinações de materiais naturais e sintéticos. Muitas pesquisas têm utilizado hidrogéis que são menos rígidos que outros tipos de materiais.

B. “Entrega” ou “Distribuição” das células no organismo

Neste processo uma biopsia é obtida e as células são expandidas em cultura e semeadas em biomateriais apropriados. Essa associação de células e biomateriais pode ser transplantada para o paciente imediatamente ou após permanecer um longo tempo em cultura. Experimentos em ratos sugerem que biomateriais compostos por um biomaterial (poly DL-lactic-acid-co-glicolic acid) propiciam a proliferação e diferenciação de células tronco mesenquimais de ratos quando implantadas no mesentério por dois meses, resultando na formação de uma matriz mineralizada.

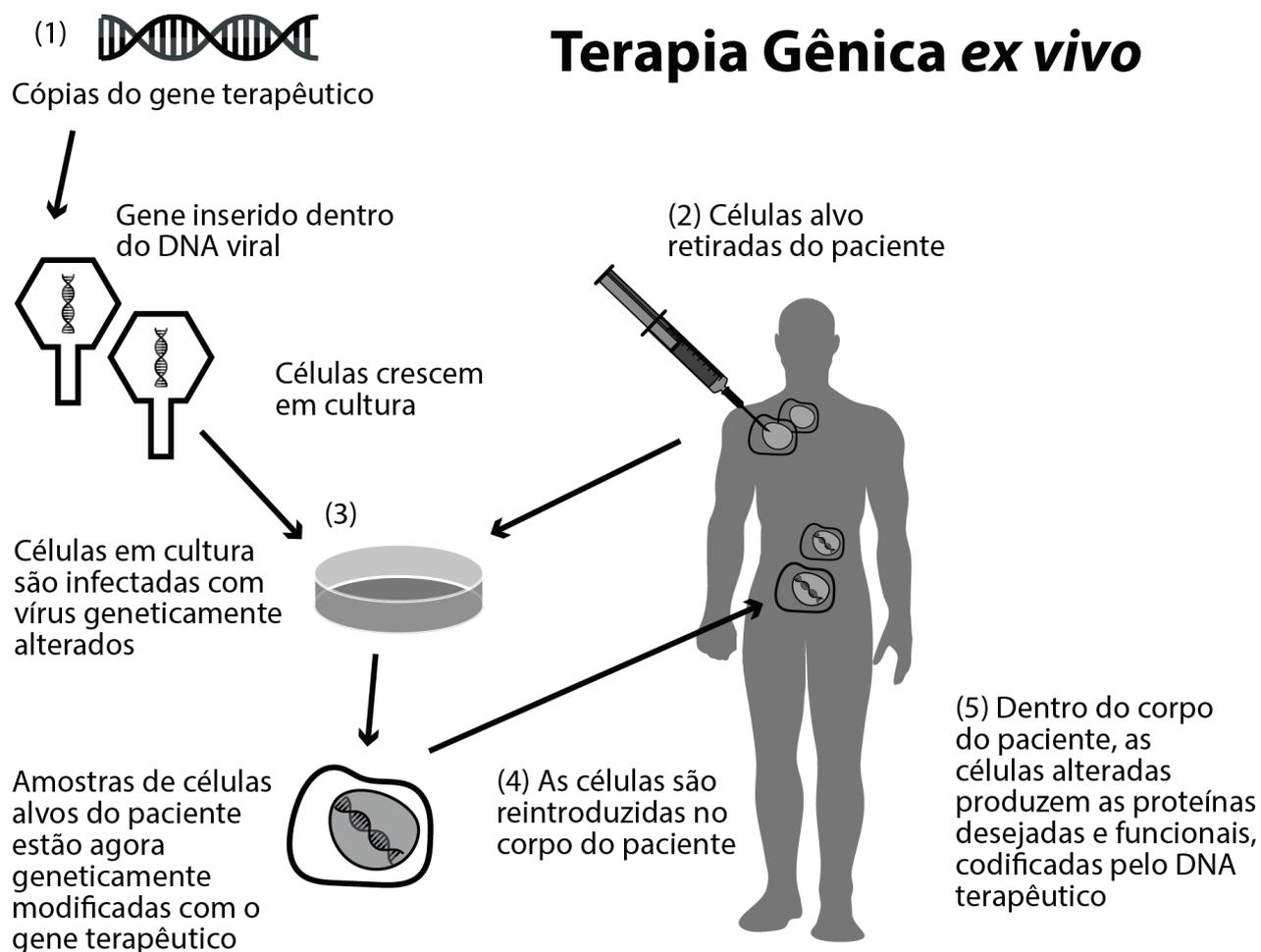


TERAPIA GÊNICA

Danielle Luciana Aurora Soares do Amaral
Doutoranda do Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas
Universidade Federal de Juiz de Fora

CONCEITO

Terapia gênica, Terapia genética ou Geneterapia é a inserção de genes nas células e tecidos de um indivíduo para o tratamento de uma doença; em especial, doenças hereditárias, ou seja, aquelas em que o DNA sofreu mutação, gerando genes que resultam em uma pior qualidade de vida. A terapia genética visa a suplementar com alelos, ou genes, funcionais aqueles que são defeituosos³².



Em 1990 foi feito o primeiro tratamento utilizando-se terapia gênica. Os primeiros pacientes foram duas crianças portadoras de imunodeficiência combinada severa, com sucesso parcial no procedimento. Dez anos depois, em junho de 2000 foi estabelecido um importante marco no desenvolvimento de pesquisas relacionadas à genética humana: o sequenciamento do genoma humano. As pesquisas concluíram que possuímos três bilhões de pares de nucleotídeos distribuídos em nossos 24 cromossomos.

A partir de então intensificou-se a busca de genes relacionados a características normais ou patológicas, abrindo caminhos para a aplicação dos princípios da medicina genômica (na

32 Disponível em <http://www.institutonocell.org.br/terapia-genica-com-celulas-tronco-humanas-segura-e-eficaz/>; Acessado em 22/01/2015.

qual se inclui a terapia gênica), que podem modificar os procedimentos médicos no diagnóstico e tratamento de várias doenças e onde se inclui a terapia gênica. Até janeiro de 2014 em torno de 2000 testes clínicos envolvendo terapia gênica foram completados³³ e até 2012 a maior parte (64,4%) destes foi direcionada a curar o câncer³⁴.

A terapia gênica é a transferência de material genético, DNA, para as células de um indivíduo com o objetivo de corrigir uma anormalidade genética existente. Esse DNA pode ser expresso como proteínas, interferir na expressão de outros genes ou corrigir possíveis mutações genéticas, baseando-se no fato de que algumas doenças são causadas pela expressão excessiva de alguns genes, levando a excesso de proteínas ou pela supressão da expressão, levando à diminuição ou falta de algumas proteínas. Em ambos os casos pode haver desenvolvimento de enfermidades.

A terapia gênica ideal substituiria o gene defeituoso por um gene normal, porém realizar esse procedimento em um ser humano é extremamente difícil. Por isso na maior parte das vezes é feita a introdução de um gene que deve ser reconhecido pelo organismo receptor e expresso, sem que haja a remoção do gene defeituoso.

O principal tipo celular alvo da terapia gênica é o constituído pelas células-tronco do organismo. Isso por alguns motivos já estudados anteriormente, como a capacidade de dar origem a diferentes linhagens celulares, levando assim a o “novo” gene não defeituoso a diferentes partes do corpo.

O gene de interesse, também chamado de transgene³⁵, é transportado por um vetor que carrega ainda outros elementos genéticos importantes para sua manutenção e expressão. A inserção desse transgene pode ser feita tanto *in vivo* como *ex vivo*. Alguns vírus podem ser usados como carreadores ou podem-se usar princípios físicos e químicos para a transferência.

TIPOS DE CARREADORES

Os carreadores do material genético para as células alvo da terapia são chamados **vetores**, palavra de origem grega que significa “aquele que entrega”.

O vetor ideal deve possuir algumas características, como a capacidade de acomodar transgenes de diferentes tamanhos, não causar resposta do sistema imune, não ser tóxico às células, manter a expressão estável do transgene, permitir o seu direcionamento para células ou tecidos específicos e ser de baixo custo. As exigências são muitas e ainda não há um vetor que

33 Gene Therapy Clinical Trials Worldwide Database *The Journal of Gene Medicine*, wiley.com., Retrieved 28 April 2014; Disponível em <http://www.wiley.com/legacy/wileychi/genmed/clinical/>; Acessado em 24/01/2015.

34 Ginn, Samantha L., et al. “Gene therapy clinical trials worldwide to 2012—an update.” *The journal of gene medicine* 15.2 (2013): 65-77.

35 O termo transgene descreve um segmento de ADN que contenha uma sequência genética que tenha sido isolada a partir de um organismo e introduzida depois num organismo diferente.

reúna todas as qualidades necessárias, porém existem diferentes vetores, com características específicas para a finalidade desejada.

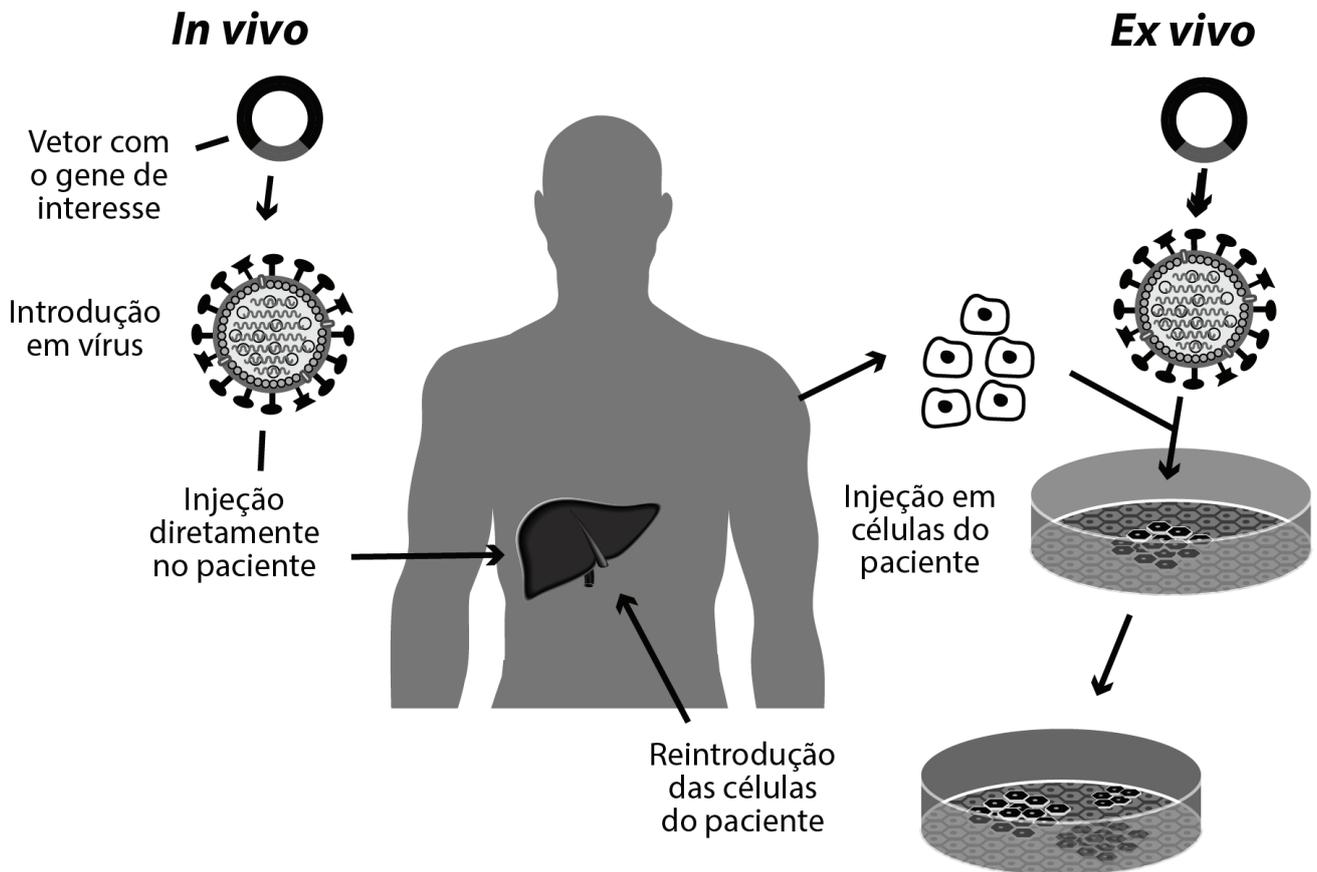
O DNA, material genético usado para transferência, está geralmente contido num plasmídeo ou em um fragmento de interesse, o qual substitui o material genético de um vírus carreador, que é “enganado” e transfere o DNA de interesse no lugar de seu próprio material genético, que seria responsável pela patogenicidade desse vírus. Devido a essa substituição, tal vírus perde a capacidade de causar doença no paciente.

Os métodos utilizados para inserção desse material genético na célula ou no tecido são escolhidos de acordo com o tipo de célula, tempo de expressão desejada, tamanho do transgene, entre outros fatores. Existem basicamente três estratégias, que são métodos físicos, químicos e biológicos, que encontram-se mais detalhados no Quadro 3.

Quadro 3: tipos de estratégias utilizadas para a transferência de material genético na terapia gênica.

Tipo	Estratégia	Vantagens	Desvantagem
Físico	Microinjeção, eletroporação e biobalística	Requer baixa quantidade de DNA	Requer mão de obra especializada; obtem de baixo número de células transgênicas; produz reação imune contra o DNA;
Químico	Utilização de compostos com carga positiva que se ligam ao DNA que tem carga negativa	Alto nível de segurança; Baixo custo;	Baixa eficiência; Baixa reprodutibilidade; Utilização <i>in vivo</i> limitada;
Biológicos	Uso de vírus desarmados	Elevado tropismo por células humanas;	Pode haver mutação m no genoma hospedeiro após a inserção; Silenciamento da expressão do transgene; Tamanho do transgene limitado;

Decidido o método de transferência a ser utilizado, deve-se escolher como a administração do material será feita. Tal administração pode ocorrer de duas formas: *in vivo* e *ex vivo* (Figura). Na administração *in vivo*, o paciente recebe o vetor contendo material genético diretamente em seu organismo e ele é carregado diretamente para as células alvo. Já no processo *ex vivo*, as células do tecido alvo são retiradas do organismo do paciente, cultivadas *in vitro*, recebem o transgene e são reimplantadas no paciente.



O desenvolvimento de técnicas que permitem e aprimoram a terapia gênica *ex vivo*, traz a possibilidade de aliar a terapia gênica à terapia celular. Células-tronco do paciente seriam tratadas com terapia gênica a fim de corrigir seus defeitos genéticos, tendo, então, a possibilidade de diferenciar-se em diversas linhagens teciduais.

ALVOS DA TERAPIA GÊNICA

Inicialmente a terapia gênica tinha como foco doenças monogênicas, ou seja, aquelas que são causadas por defeito em apenas um gene, como é o caso da hemofilia. Os portadores dessa doença não têm o fator de coagulação, o que faz que até mesmo um pequeno corte possa levá-las a sangrar até a morte. A substituição desse único gene defeituoso por um funcional poderia fazer com que o fator de coagulação voltasse a ser secretado no sangue do paciente, resolvendo seu problema.

Além de doenças monogênicas, mais recentemente, doenças adquiridas durante a vida como câncer, doenças do coração e infecções virais como a AIDS, também têm sido alvo de terapia gênica.

No caso do câncer, a terapia gênica tem função um pouco diferente da que existe em sua aplicação no reparo de doenças monogênicas. Nesta, o objetivo é substituir um gene defeituoso, mas, naquela, o gene inserido no paciente tem como objetivo diminuir a replicação

apenas das células cancerosas ou incitar a resposta imune contra o tumor, não tendo como principal objetivo a substituição de um gene específico.

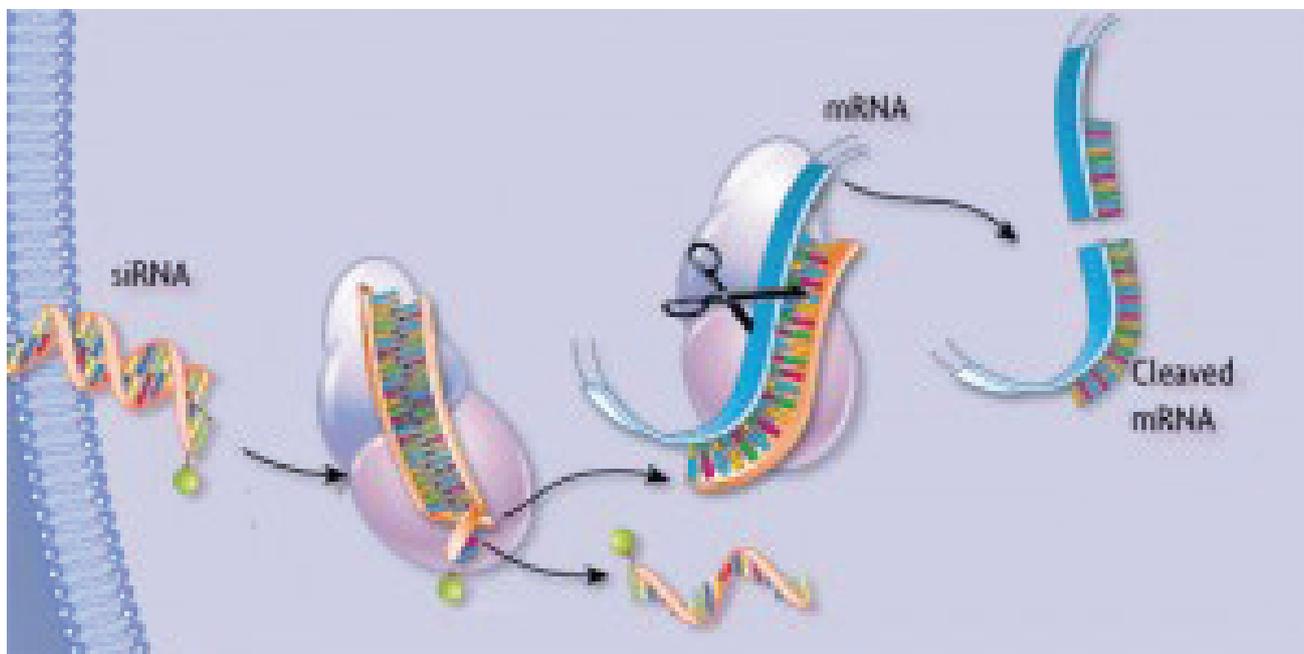
QUANDO O EXCESSO É O PROBLEMA

Até o momento discutimos a terapia gênica como solução para a falta de alguma proteína devido ao defeito de um gene, como no caso da hemofilia. Mas e quando o problema é o excesso de um produto gênico?

Por anos a ideia foi de que todo gene era transcrito em um mRNA que por sua vez, era traduzido em proteínas, tendo estas sim teria funções regulatórias no organismo.

Em 1998, foi descoberto no nematoide *Caenorhabditis elegans* um mecanismo natural de silenciamento gênico, no qual um gene é transcrito em RNA, porém esse RNA não precisa ser traduzido em proteína para ser funcional. Este RNA, dupla fita, é funcional por si só, capaz de interferir na regulação de funções importantes no organismo. Tal mecanismo de regulação ficou conhecido como Interferência por RNA ou RNA interferente (RNAi).

Alguns anos mais tarde, em 2002, o mecanismo foi descrito também para mamíferos. Basicamente, a partir de uma sequência de DNA, são transcritos pequenos RNAs dupla-fita e este passam por uma série de processos sendo capazes de clivar RNAs mensageiros complementares a eles (figura), podendo diminuir assim a quantidade de proteína produzida em até 80%.



<http://www.alnylam.com/our-approach/about-rnai/>, acessado em 17/12/2014 às 16:41hs.

A descoberta desse mecanismo trouxe, então, a possibilidade de silenciar ou diminuir a expressão de genes prejudiciais, trazendo uma nova visão sobre a terapia gênica.

ÉTICA NA TERAPIA GÊNICA

Tendo-se em vista o grande potencial da terapia gênica, nos deparamos com questões éticas, como o limite para a manipulação gênica. Logo podem surgir tentativas de selecionar ou modificar características físicas por interesses simplesmente estéticos. Ainda há a possibilidade da tentativa de selecionar ou modificar embriões, em busca de um bebe perfeito.

A instrução normativa n.º 9 da Comissão Técnica Nacional de Biossegurança - CTNBio, regulamenta normas sobre a intervenção genética em Seres Humanos. Tal normativa permite somente a manipulação genética de células somáticas humanas, não sendo permitida tal manipulação em células germinativas, ou seja, óvulos ou espermatozoides.

É também estabelecido por lei que a terapia gênica somente pode ser utilizada com os únicos e exclusivos objetivos de corrigir defeitos gênicos, tanto herdados quanto adquiridos, e de estimular respostas imunes contra a expressão fenotípica de defeitos genéticos ou para prevenir a sua ocorrência.

Todo tratamento que faça uso da terapia gênica é considerado como pesquisa em Seres Humanos e deve ser submetido às normas do Conselho Nacional de Saúde, sendo sempre analisado por um comitê de ética capacitado a decidir sobre a viabilidade ou não de tal tratamento.

PROBLEMAS AINDA NÃO RESOLVIDOS

A terapia gênica vem sendo aplicada ao longo dos anos e é promissora. Ela tem avançado no desenvolvimento de tecnologia, vetores de transferência, bem como tem aumentado a confiabilidade da técnica. Porém nem todos os problemas foram resolvidos e alguns surgiram quando os testes clínicos começaram³⁶. Existem quatro barreiras³⁷ para sucesso completo da técnica, a saber.

Entrega do vetor

Para que haja sucesso na terapia gênica, primeiramente, o vetor de entrega contendo o gene de interesse, deve ser capaz de atingir e integrar-se no tecido de interesse. O vetor chegar a seu destino depende de algumas variáveis como barreiras endoteliais, fluxo da corrente sanguínea, tamanho do vetor e sua interação com as células hospedeiras. O ideal é que o vetor entregue o transgene somente no tecido de interesse, pois como é sabido, tecidos diferentes expressam proteínas diferentes. O desafio tem sido produzir vetores que sejam engenhadados para serem reconhecidos por receptores específicos de células específicas de um determinado tecido.

Local de inserção do transgene

Um dos problemas ainda não resolvidos na terapia gênica é o local de inserção do transgene. Não há maneira eficiente de direcionar o gene, que é aparentemente, inserido de maneira aleatória nos cromossomos.

36 Disponível em <http://www.ufsm.br/blg220/hide/terapagenproblemas.doc>; Acessado em 24/01/2015.

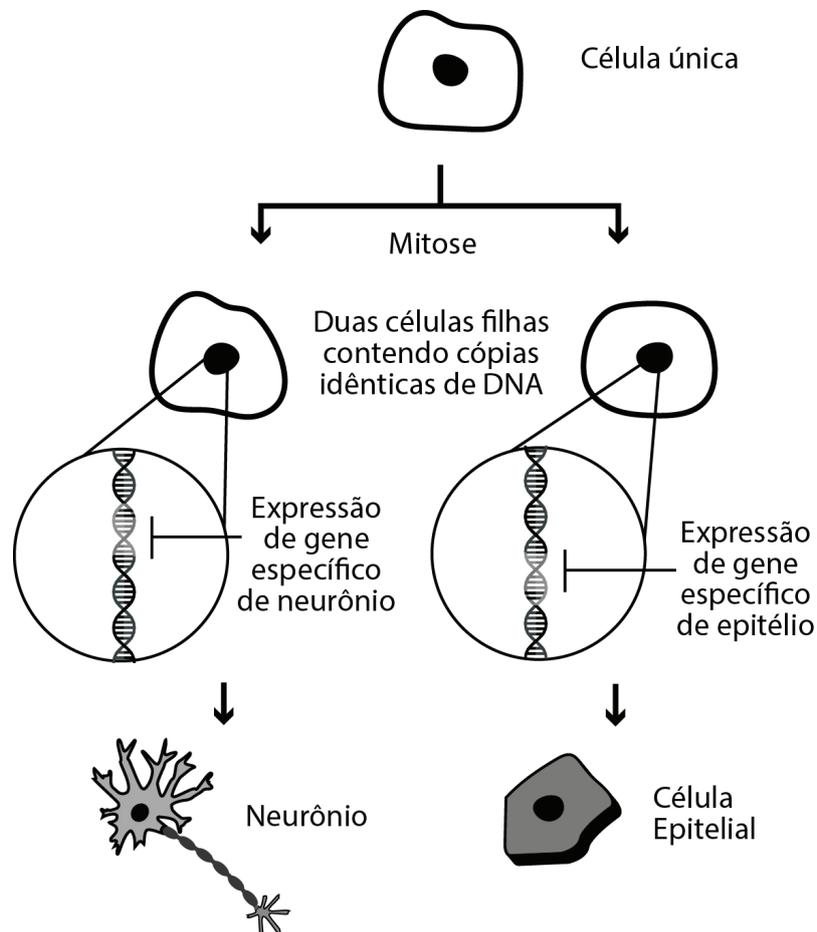
37 Kay, Mark A. "State-of-the-art gene-based therapies: the road ahead." *Nature Reviews Genetics* 12.5 (2011): 316-328.

Mas por que essa inserção aleatória pode ser um problema?

Como já discutido anteriormente, o objetivo da terapia gênica é inserir um gene no organismo para que ele possa ser expresso e, assim, suprir uma deficiência ou uma ausência proteica. Como acabamos de discutir, se um gene for inserido no DNA do hospedeiro ele será expresso. Porém, como essa inserção é aleatória pode ser que ocorra a inserção no meio de um gene funcional, interrompendo a produção de uma proteína. A extensão do dano causado, depende de qual gene é afetado. Por exemplo, em um tratamento com terapia gênica em crianças com imunodeficiência severa combinada, duas das três crianças tratadas desenvolveram leucemia três anos após receberem o transgene. Os pesquisadores buscam genes que não sejam conhecidamente oncogênicos, visando reduzir as chances do desenvolvimento de câncer. Sugere-se também que se busquem vetores que sejam capazes de expressar o transgene sem que haja integração do gene no genoma do hospedeiro, porém esta técnica teria a desvantagem de não resolver os problemas do paciente definitivamente, já que o transgene seria perdido durante as sucessivas divisões celulares que ocorrem habitualmente.

Silenciamento do transgene

Você já se perguntou por que, apesar de todas as nossas células terem o mesmo DNA, nem todas expressam as mesmas proteínas? Por que elas têm funções tão diferentes? Um neurônio e uma célula epitelial têm o mesmo DNA, mas têm funções completamente diferentes. Isso ocorre porque os genes que são expressos em diferentes células são diferentes (Figura). Cada tecido tem genes específicos que são expressos nele, os genes específicos de outros tecidos são silenciados, por um mecanismo chamado epigenética.



Da mesma forma que genes endógenos, ou seja, genes próprios podem ser silenciados, um dos problemas relacionados à terapia gênica é que o transgene também pode sofrer esse processo de silenciamento, fazendo com que o transgene perca sua capacidade de beneficiar o organismo. Como a maior parte das doenças requer um tempo de tratamento extenso, esse problema é contornado pela readministração do vetor que porta o transgene.

Resposta imune do hospedeiro

Um dos maiores problemas relacionados à terapia gênica é o desenvolvimento de resposta imune do hospedeiro contra o transgene e/ou o vetor que pode neutralizar a proteína terapêutica. É uma grande dificuldade para os pesquisadores prever possíveis respostas imunes em humanos, pois muitas vias não são compartilhadas com animais modelo. Ou seja, em testes de laboratório com animais não é possível saber se aquele transgene ou vetor irá ativar, em humanos, uma via de resposta imune que não existe no animal modelo.

Uma vez que a proteína é neutralizada, as chances de obter-se sucesso readministrando o mesmo vetor são baixas, já que o hospedeiro já tem uma resposta imediata contra aquele vetor.

Há também problema no fato de grande parte dos vetores de entrega serem vetores virais modificados. Desta forma, pacientes que já foram expostos a uma forma selvagem do vírus, podem já apresentar também uma resposta imune armada contra o vetor.