

Construção

DE UMA DESCOBERTA

Linhagem brasileira de células-tronco embrionárias humanas abre caminho para novas pesquisas em busca de terapia contra doenças

MARIA GUIMARÃES

As células-tronco extraídas de embriões humanos têm sido celebradas como a grande esperança para curar muitas doenças contra as quais a medicina hoje tem as mãos até certo ponto atadas. É o caso de determinados problemas cardíacos, de anomalias de origem genética como distrofia muscular e de doenças degenerativas do sistema nervoso como mal de Parkinson. Frequentadoras assíduas das páginas de ciência e saúde de jornais e revistas, essas células, que podem dar origem a qualquer tecido humano, ganharam ainda mais destaque desde o dia 2 de outubro, quando a geneticista Lygia da Veiga Pereira, da Universidade de São Paulo (USP), anunciou ter obtido uma linhagem brasileira de células-tronco embrionárias – a BR-1.

A novidade foi recebida com festa pelos colegas presentes no III Simpósio Internacional de Terapia Celular em Curitiba, Paraná. Em seguida à apresentação, alguns pesquisadores tinham sugestões de como testar a capacidade das células. “Mas o que queriam mesmo era saber quando as células estariam disponíveis”, conta Lygia. Mesmo quem não entrou nessa fila afirma que a conquista é importante e dá independência aos pesquisadores brasileiros. Mais do que substituir a importação desse tipo de célula, a geneticista da USP celebra a competência técnica que seu grupo demonstrou em obter e manter a linhagem. Ela co-

Colônia viva: células-tronco embrionárias se multiplicam em placa com meio artificial

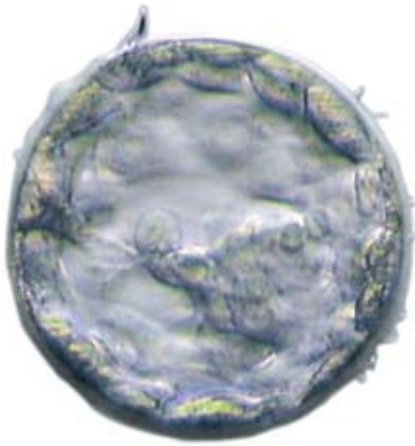
meçou a trabalhar com células-tronco embrionárias importadas logo após a aprovação da Lei de Biossegurança, em 2005, que regulamentou esse tipo de pesquisa. Em 2006 trouxe pesquisadores estrangeiros, como Prithi Rajan, do Instituto Burnham em San Diego, nos Estados Unidos, para mostrar como fazer o cultivo das células. “Ela nos ensinou as condições ideais de cultura e mostrou como treinar o olho para ver quando as células estão ‘felizes’”, lembra. Mesmo assim, as primeiras linhagens morreram. “Tivemos que alterar detalhes no meio de cultivo e com isso mostramos que conseguimos fazer sozinhos.” O cardiologista José Eduardo Krieger, do Instituto do Coração (InCor) da USP, faz coro: “O mais importante é dominar a tecnologia. Só assim podemos interferir ativamente em todo o processo de pesquisa com terapia celular. Isso não tem preço.” O presidente da Federação de Sociedades de Biologia Experimental (Fesbe), Luiz Eugênio Mello, completa: “Em muitas linhagens americanas é difícil saber se as células estão em boas condições de manutenção. É diferente quando se tem um vizinho que pode informar 100% sobre as características do material com que você trabalha”.

Outra vantagem é a agilidade para se conseguir amostras de células. Para a geneticista Mayana Zatz, do Centro de Estudos do Genoma Humano da USP, o grande entrave para fazer

pesquisa com células-tronco no Brasil é o tempo gasto para importar todo o material. “Demoramos meses para receber reagentes que um americano tem em mãos em menos de 48 horas”, conta. “Numa área competitiva como essa, fica quase impossível publicarmos em periódicos internacionais.”

Apesar de celebrado, o investimento necessário para desenvolver uma linhagem de células-tronco embrionárias está sujeito a críticas por ser mais um avanço técnico do que científico. Lygia é a primeira a admitir: “Não tem inovação científica nesse resultado, é um trabalho inglório que alguém tinha de fazer”. A obtenção de células-tronco consiste em retirar por volta de 50 células de um embrião de cinco dias, quando ainda é uma massa de apenas 150 células, e fazer com que se mantenham vivas e se dividindo, mas sem se transformar em células de tecidos específicos, como pele, músculo ou sistema nervoso. Essa capacidade de originar tantas variedades de células – a pluripotência – faz das células-tronco embrionárias um coringa do organismo.

Não é preciso instalações muito especiais para trabalhar com essas células: Lygia montou seu Laboratório de Genética Molecular com auxílio da FAPESP para projetos anteriores. Além do equipamento básico como reagentes e microscópios, basta ter uma área isolada para lidar com as células e uma incubadora para mantê-las numa temperatura confortável, a 37 graus Celsius. Parece simples, mas poucos laboratórios no



Embrião de cinco dias de onde são retiradas as células pluripotentes

Brasil têm a receita para manter as células nessas condições. Mesmo assim o feito do grupo de Lygia não é novidade, porque já existem linhagens de células-tronco em vários países – o pioneiro foi o norte-americano James Thomson, da Universidade de Wisconsin, em 1998.

Conhecimento transferido - Obter uma linhagem de células-tronco embrionárias é sobretudo prova de paciência e muita persistência para encontrar a composição exata do líquido que nutre as células. Lygia conta para isso com uma equipe de estudantes – alguns deles com bolsa da FAPESP, embora o projeto específico que desembocou na BR-1 tenha sido financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e pelo Ministério da Saúde. Para obrigar as células a permanecerem pluripotentes, o procedimento tradicional era cultivá-las sobre uma camada de fibroblastos de camundongo. Essas células secretam uma combinação de substâncias que mantêm a cultura nesse estado versátil, mas os pesquisadores se preocupam porque elas também produzem compostos típicos de roedores que podem de certa maneira contaminar as células humanas, que se tornariam inadequadas para fins terapêuticos. Lygia tentou usar fibroblastos humanos, mas não teve sucesso. Finalmente, no ano passado, lançou mão de uma nova ferramenta: um meio de cultura artificial que tem tudo o que a célula precisa, como aminoácidos, vitaminas e fatores de crescimento. Com mais uns ajustes deu certo, e daí saiu a BR-1.

Lygia preocupou-se em otimizar todo o processo antes de usar os minúsculos embriões que, como a lei brasileira exige, estavam havia mais de três anos nos congeladores das clínicas de reprodução assistida Fertility, em São Paulo, e Prof. Franco Junior, em Ribeirão Preto. Mesmo com a técnica dominada, a taxa de sucesso é baixa: dos 250 embriões descongelados inicialmente, a maior parte já não era viável e não poderia ser usada para fins reprodutivos. Só 35 se desenvolveram até o estágio de 150 células. Apenas as células de um desses embriões conseguiram fincar raízes no meio de cultura e começaram a se espalhar como se fosse um gramado em solo fértil.

O produto de dois anos de trabalho está agora em dezenas de ampolas armazenadas no congelador do Laboratório de Genética Molecular da USP. E também na incubadora e nas bancadas do laboratório, onde a equipe testa as células para verificar se elas são mesmo pluripotentes. Até agora parece que sim. A equipe de Lygia demonstrou que a morfologia das células que se reproduzem nas placas de vidro é típica da de células-tronco. O grupo também analisou geneticamente as células e detectou a atividade de genes que só se expressam em células pluripotentes. O grande teste foi remover os freios que mantêm as células em estágio não diferenciado. “As células entram em diferenciação caótica”, explica a pesquisadora da USP, que viu surgirem neurônios e células de músculos, reconhecidas por suas características ao microscópio e também por anticorpos específicos. Faltam

ainda testes importantes para garantir que as células terão a versatilidade funcional que se espera delas: o primeiro será implantar algumas dessas células em camundongos e ver se causam teratomas, estruturas em que as células se multiplicam e se diferenciam em diferentes tecidos. “Forma uma massa com pele, músculo, cabelo, dente, as coisas mais variadas”, conta Lygia. Também será necessário fazer testes funcionais para saber se, por exemplo, as células com aparência de neurônios realmente produzem potenciais de ação em resposta a um estímulo elétrico, como fazem num organismo.

Lygia e seus colaboradores pretendem produzir células suficientes para todos os grupos brasileiros interessados em fazer pesquisa com células-tronco. Para isso será preciso produzir células em ampla escala, tarefa em que vem se empenhando o neurocientista Stevens Rehen em seu laboratório na Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ).

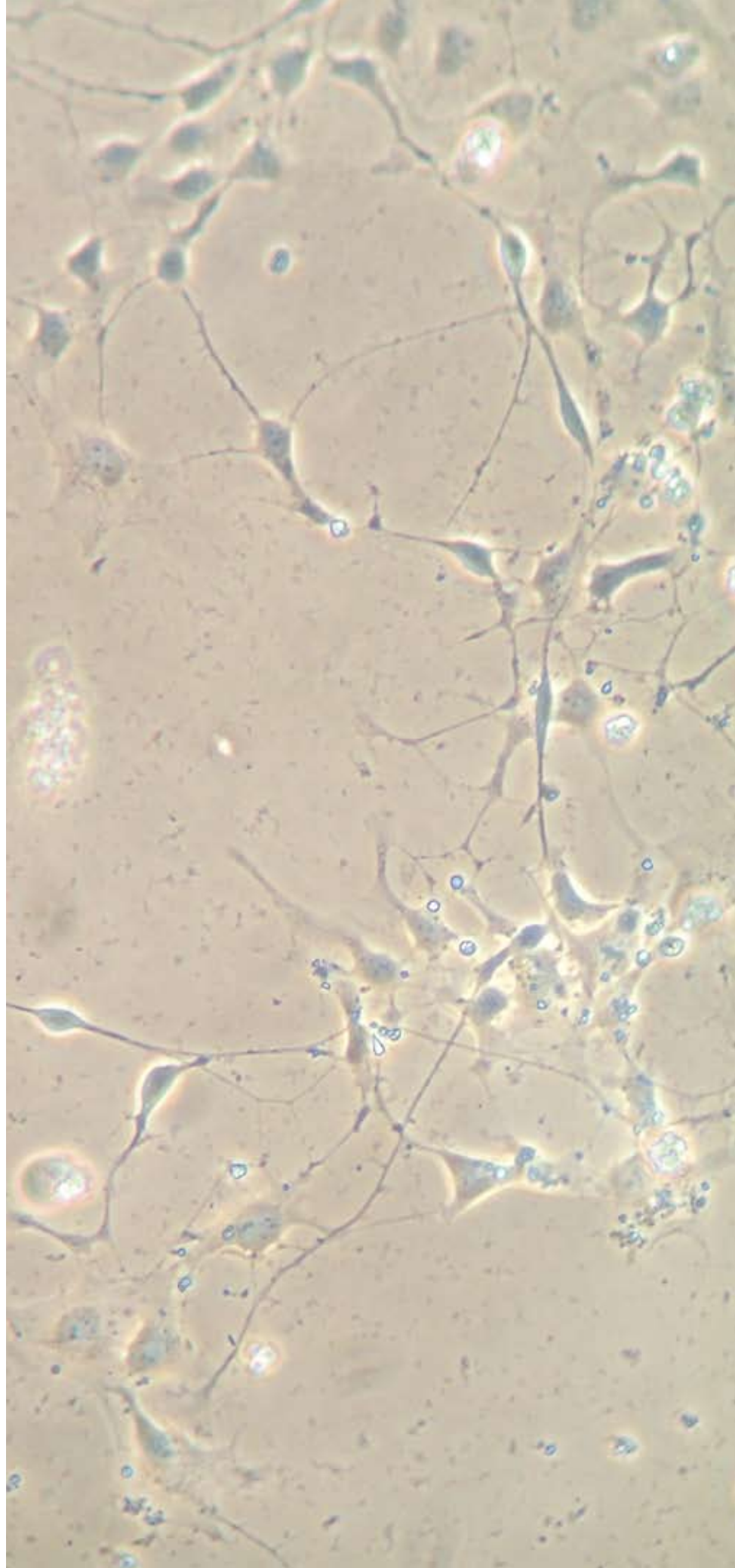
Quantidade de células não deve ser o problema. Em parceria com Leda Castilho e os alunos de doutorado Aline Marie Fernandes e Paulo André Marinho, todos da UFRJ, Rehen desenvolveu uma técnica que permite obter 90 milhões de células em duas semanas, 70 vezes mais do que seria possível no cultivo tradicional, com uma série de vantagens além da eficiência. “Precisamos trocar menos vezes o meio de cultura, o que diminui o risco de contaminação e torna o processo três vezes mais barato”, diz o pesquisador do Rio, que adaptou, para multiplicar células em cultura, um método engenhoso já usado para produção de fármacos. Em vez de cultivá-las nas placas que parecem fôrmas de gelo – se cheias d’água, produziriam seis cilindros de gelo com cerca de 3,5 centímetros de diâmetro – ele transfere as células para um biorreator. Apesar do nome pomposo, Rehen descreve o biorreator como um enorme frasco de maionese com uma placa e uma haste magnetizadas que agitam o vidro e controlam totalmente seu conteúdo. Além disso, em vez de deixar que as células proliferem presas ao fundo da placa, ele acrescenta microsferas à mistura. Depois de um tempo de descanso as células aderem às esferas – é a hora de começar a agitar. Com as esferas em suspensão, aumenta

muito a área que as células têm para ocupar. Além disso, a agitação deixa o ambiente mais oxigenado e propício para reações biológicas.

A produtividade antecipada por Rehen mais do que daria conta da demanda brasileira, mesmo com o desperdício que deverá haver no início, até que os grupos de pesquisa aprendam a manter as células embrionárias humanas em meio de cultura – com ajuda de Lygia e Rehen, que se dispõem a treinar quem mostrar interesse em trabalhar com elas. Mas ainda é cedo para cantar vitória. O neurocientista carioca está otimista, afinal seu método deu certo com as células americanas. Mesmo assim será preciso ver se as células BR-1 mantêm sua capacidade pluripotente depois de multiplicadas em grande escala.

Instrumento de pesquisa - Lygia pretende ampliar a família das BR. “Não está claro quão idênticas as linhagens são entre si”, conta, “verificamos que cada uma delas é mais propensa a se diferenciar em um tipo de tecido ou outro”. Além disso, particularidades genéticas podem ser necessárias para cada linha de pesquisa. A própria Lygia, por exemplo, está interessada em entender como os dois cromossomos X, que juntos definem que um ser humano será mulher, interagem numa célula. Isso é importante porque em cada célula de uma mulher existe um mecanismo que inativa um dos cromossomos X – de outra maneira os genes localizados nesse cromossomo teriam presença duplicada nas mulheres em relação aos homens. Para entender como isso funciona, Lygia precisa de células femininas, o que não é o caso da BR-1, obtida a partir de um embrião masculino. À medida que se multiplicam, as células acumulam pequenas mudanças. Por isso linhagens antigas são mais diferentes do embrião original do que uma estabelecida mais recentemente. Comparar as propriedades de linhagens diferentes será justamente a missão do doutorado de Ana Maria Fraga, a aluna de Lygia que teve papel central em estabelecer a linhagem brasileira.

Apesar do interesse que notícias sobre células-tronco despertam no público, as terapias com esse tipo de células ainda devem demorar para chegar à



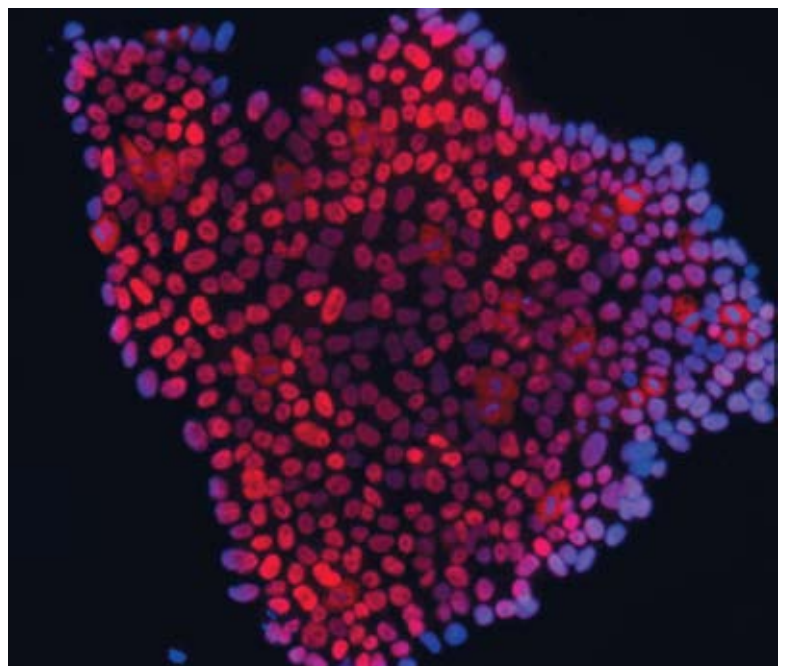
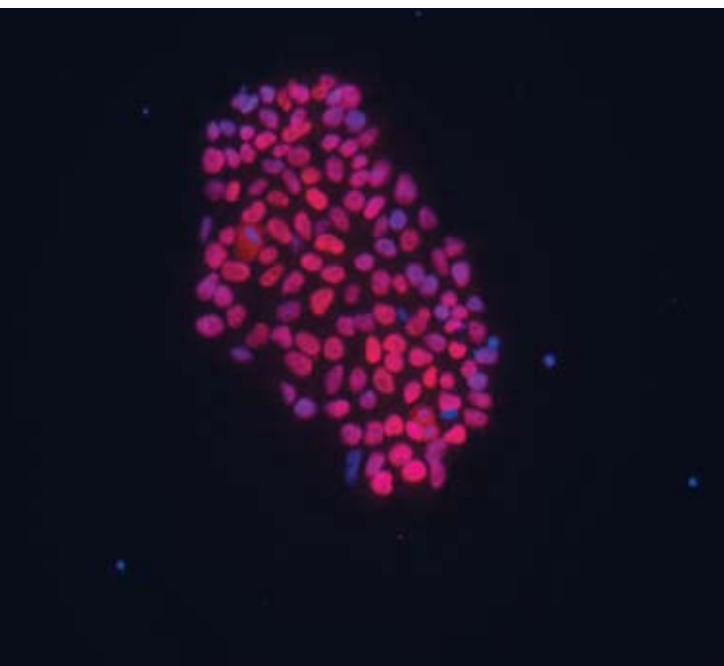
realidade – pesquisadores nem mesmo arriscam uma previsão. Mayana Zatz não se cansa de repetir que as células em si não são um tratamento: “Não vamos injetar células-tronco embrionárias em ninguém”. Até agora, experimentos vêm mostrando que células-tronco indiferenciadas geram tumores quando injetadas em animais. Pesquisadores as vêem como um poderoso instrumento de pesquisa, não uma solução terapêutica mágica. Quando eles entenderem como as células-tronco embrionárias originam todos os tecidos humanos, poderão tentar interferir na atividade dos genes e nas características do ambiente que permitirão manipular células adultas. “Células embrionárias são as únicas que têm o *hardware* completo”, explica Krieger, do InCor, “precisamos conhecer o *software* e aprender a explorar esse *software* em outras células”. Nesse ponto talvez as células-tronco embrionárias até deixem de ser necessárias.

Nesse espírito, o cardiologista tenta descobrir quais são os estímulos químicos que transformam as células-tronco embrionárias em diferentes componentes do sistema vascular, como músculo cardíaco ou vaso sanguíneo. As linhas de pesquisa que prometem resultado mais rápido são as que usam células-tronco adultas. Em seu laboratório, Krieger tem testes clínicos em andamento para averiguar a capacidade de células da

medula óssea do próprio paciente para corrigir isquemias, quando o coração recebe menos sangue do que necessita. Se der certo, será possível substituir, ou pelo menos completar, a grande quantidade de cirurgias de pontes, em que se implanta um novo vaso sanguíneo para substituir um obstruído, e assim restituir o fluxo de sangue para o coração.

Passo a passo - O entusiasmo maior de Krieger vai para um projeto que não envolve células-tronco – nem embrionárias nem adultas – e por isso mesmo mostra que talvez seja possível prescindir de células embrionárias depois de desvendado seu funcionamento. Trata-se da manipulação de células de pele ou de fibroblastos para que produzam uma substância chamada fator de crescimento vascular endotelial (VEGF). Injetadas no sistema vascular, essas células levam um recado às células do sistema circulatório no local onde há uma deficiência: produzam mais células. Em vez de implantar células-tronco que se transformarão em tecidos cardíacos ou vasculares, a estratégia é estimular a produção local. O trabalho fez parte do doutorado de Giovana Gonçalves, que defendeu sua tese este ano. “É uma idéia tão simples que as pessoas costumam a aceitar”, se diverte o orientador. Por enquanto os resultados foram tão bons que o grupo de Krieger já começa a fazer

Anticorpos marcam células pluripotentes (as duas da esquerda), e transformadas em neurônios (núcleos em azul)



testes em porcos, cujo coração é muito mais parecido com o de seres humanos do que os ratos. E tem o privilégio de estar no InCor, com acesso a aparelhos de primeira linha – os mesmos usados para pacientes humanos – para monitorar o coração dos porcos.

Células-tronco adultas são também a matéria-prima das geneticistas Maria Rita Passos-Bueno e Daniela Bueno, da USP, que retiram células de músculo e da polpa dos dentes para regenerar ossos. Seu objetivo, sobre o qual resultados promissores foram publicados recentemente no *site* da revista *Tissue Engineering*, é reparar defeitos cranianos congênitos, como lábio leporino e fenda palatina. “As células-tronco embrionárias são importantes, mas temos que nos lembrar que as células que naturalmente reconstituem o tecido quando danificado são as adultas”, afirma Maria Rita.

Stevens Rehen, por sua vez, quer entender como os neurônios se diferenciam e como surgem alterações no número de cromossomos. Quando – e se – ele conseguir a receita para produzir um tipo específico de neurônios, os dopaminérgicos, terá uma boa arma contra o mal de Parkinson, uma doença que seu grupo estuda em um modelo em camundongos.

No simpósio de terapia celular em Curitiba, o mesmo onde Lygia apresen-

tou a BR-1 à comunidade, Rehen mostrou resultados de uma segunda linha de pesquisa, feita em colaboração com o laboratório de Ana Maria Martinez, da UFRJ. O grupo provocou lesões na medula de camundongos, semelhantes às que podem causar paralisia depois de um acidente de carro. A compressão mata tanto células neuronais como as que formam a bainha de mielina em torno dos neurônios. Foram implantadas células-tronco embrionárias já direcionadas para o caminho neural, em que ainda têm flexibilidade para tornar-se neurônio ou outro tipo de célula do sistema nervoso, mas nunca outro tipo como pele ou músculo. Os resultados foram bons: ao longo de dois meses os camundongos recuperaram cerca de 60% da mobilidade. Se tivessem injetado células indiferenciadas, nesse mesmo tempo elas teriam dado origem a tumores – daí a necessidade de direcioná-las antes. “Seria como pôr uma criança de 8 anos na faculdade”, compara o neurocientista. “É melhor deixar a criança estudar, aprender e pôr na faculdade mais adiante.”

Rehen vem usando células-tronco de camundongo, assim como células humanas importadas dos Estados Unidos. “Nesse ponto da nossa pesquisa não estou limitado pela falta de uma linhagem brasileira”, conta. O problema surgiria quando chegasse ao ponto de produ-

zir terapias com base nessas células: os acordos obrigariam os pesquisadores brasileiros a dividir quaisquer lucros com os Estados Unidos. “Com a BR-1 as patentes serão 100% brasileiras.”

Mayana Zatz frisa que o que mais falta no Brasil é estrutura para pesquisa. “No exterior as universidades têm o que eles chamam de *core facilities*, que são centros que produzem os produtos necessários, como células-tronco, transgênicos ou reagentes”, conta. “Aqui, cada laboratório tem que saber fazer tudo por conta própria.” Mesmo assim, seu grupo tem conseguido projeção internacional com pesquisas sobre células-tronco para regenerar músculo e osso: em conjunto com Maria Rita Passos-Bueno, foram nove trabalhos publicados em revistas internacionais desde o ano passado. Apesar de defensora das pesquisas com células-tronco embrionárias, Mayana tem se concentrado mais em células-tronco adultas, nas quais ela espera resultados mais imediatos. “Fico feliz que a Lygia tenha disposição para trabalhar com as embrionárias e ajudar os outros pesquisadores a pular etapas. Valeu a pena batalhar para a liberação das pesquisas”, completa. Para ela, mesmo que tudo dê certo com a BR-1, a linhagem é ainda o começo de um longo caminho. “Temos tijolos brasileiros, agora temos que construir a casa do zero.” ■

