

## EDITORIAL

### VOLTANDO AO PASSADO: 60 ANOS NO ENTENDIMENTO DE COMO AS CÉLULAR E OS ORGANISMOS SE DESENVOLVEM

*“Se você realmente está interessado em algo, continue em frente, não se renda”. Professor John Gurdon.*

ORIETTA BELTRÁN, MD, MSc<sup>1</sup>

<sup>1</sup>MÉDICA, MSc GENÉTICA HUMANA. PROFESORA ASISTENTE UNIVERSIDAD MILITAR NUEVA GRANADA, FACULTAD DE MEDICINA. BOGOTÁ, COLOMBIA.

Correspondencia: [orietta.beltran@unimilitar.edu.co](mailto:orietta.beltran@unimilitar.edu.co)

A primeira tentativa de reprogramar uma célula somática a uma célula pluripotente realizou-se em 1.952 quando Robert Briggs e Thomas King (1) transferindo com sucesso exitosamente núcleos de blastócitos em ovócitos de *Rã pipiens* obtendo embriões viáveis. Porém, eles deduziram que a técnica de transferência nuclear somática (SCTN) não era aplicável em células diferenciadas pelo caráter irreversível dos processos de diferenciação. Posteriormente, em 1.962 o biólogo John Gurdon da Universidade de Cambridge fez uma descoberta revolucionária: demonstrou a formação de embriões que desenvolvem-se em girinos de *Xenopus laevis* a partir da transferência de núcleos de células intestinais de rãs adultas em ovócitos, evidenciando que os genomas das células somáticas mantêm sua capacidade de gerar organismos clonados viáveis e evidenciando que o processo de diferenciação é um mecanismo reversível mediante a reprogramação nuclear devida a modificações epigenéticas reguladas pela existência de fatores, - não identificados -, que induzem à pluripotência. Além disso, outra das observações de John Gurdon foi que os genes não perdiam, senão que tinham uma expressão diferencial (2,3,4). Três décadas mais tarde, em 1.996, o embriologista Ian Wilmut e colaboradores (5) conseguiram clonar com sucesso um mamífero, a ovelha Dolly, que foi acompanhada da clonagem de vacas, porcos, ratos, cabras, coelhos e gatos, bem como a clonagem com uma maior eficiência de ratos, primatas não humanos e cachorros, por vários pesquisadores(6,7,8).

Além disso, em 1.998 o biólogo James Thomson da Universidade de Winsconsin conseguiu o isolamento

e caracterização de células tronco embrionárias humanas (9), o qual señaló a gran posibilidad de utilizarlas para aplicaciones médicas através da obtenção in vitro de linhas celulares de todas as linhagens, como por exemplo cardiomiocitos, osteoblastos, condrocitos, hepatocitos e neurônios. Mas, as preocupações éticas ao redor da pesquisa com células tronco embrionárias são controversais, devido a que habitualmente se extraem mediante a destruição de embriões humanos que as clínicas de fertilidade descarta. Da mesma forma, a técnica de SCTN tem implicações éticas, devido à questionável necessidade de utilizar numerosos ovócitos. Outra das desvantagens técnicas da SCTN são sua baixa eficiência (1-4%) e a confirmação de anomalias cromossômicas estruturais em algumas linhas celulares obtidas o que faz que seja uma ferramenta limitada na produção de células ou tecidos autólogos para uso terapêutico (6). Porém, uma contribuição transcendental da clonagem de organismos através da técnica SCTN, foi que demonstrou que quando um núcleo é transferido no citoplasma dos ovócitos, se produzem mudanças na estrutura da cromatina que regulam de forma reversível a diferenciação, constituindo-se em uma importante prova da plasticidade do desenvolvimento (6,8).

Por outra parte, outros pesquisadores aplicaram a técnica de fusão células somáticas com células tronco embrionárias, para obter células pluripotentes. Richard Miller e Frank Ruddle em 1976, utilizando esta técnica demonstraram que timócitos de rato adquiriam pluripotência depois da fusão celular com células de carcinoma embrionários (9). Um dos estudos mais interessantes foi o de Chad Cowan e colaboradores em 2005, que conseguiram fundir fibroblastos humanos com células

tronco embrionárias humanas, obtendo células híbridas com características morfológicas e expressão gênica de padrões típicos de células tronco embrionárias como os genes envolvidos na pluripotência (Oct4, Nanog, TDGF1 e Rex1), com um silenciamento específico dos genes do estado somático em todo o genoma e a evidência de mudanças epigenéticas no promotor de Oct4 (10).

Porém, um descobrimento espetacular ocorreu em 2006 quando Shinya Yamanaka e Kazutochi Takahashi, pesquisadores do Departamento de Biologia de Células Tronco da Universidade de Kyoto no Japão, determinaram que a transfeção viral de quatro genes (Oct4, Sox2, KLF4 e c-Myc, abreviados OSKM) em fibroblastos de rato adulto gerava células com as características de células tronco embrionárias, as quais denominaram células tronco pluripotentes induzidas (iPS) (11); e que estes mesmos fatores são requeridos na geração de iPS humanas a partir de fibroblastos humanos (12). As células resultantes não parecem ser substancialmente diferentes das células tronco embrionárias e eventualmente pode proporcionar uma fonte adequada de diferentes tipos celulares específicos para cada paciente (13).

O legado científico de John Gurdon e Shinya Yamanaka de que a diferenciação celular não é um processo unidirecional e irreversível ha implicado o avance no conhecimento da biologia das células tronco e dos mecanismos de regulação epigenética. A indução de pluripotencia através de fatores específicos, as vezes chamados “os fatores de Yamanaka”, permitiu uma transição rápida no uso de células tronco pluripotentes induzidas no estudo de modelos fisiopatológicos, descobrimento de genes e medicamentos, estudos do desenvolvimento embrionário e a diferenciação, bem como uma potencial fonte de terapia celular e das linhas celulares específicas de doenças para avaliar possíveis alvos e agentes terapêuticos.

Recentemente, a Assembleia dos Prêmios Nobel anuncio que John Gurdon junto com Shinya Yamanaka foram os ganhadores do Premio Nobel de Fisiologia ou Medicina em 2012, por demonstrar que as células diferenciadas adultas podem ser reprogramadas para converter-se em células imaturas “tronco”, capazes de desenvolver todos os tecidos do corpo (14).

O atual desafio dos pesquisados no campo das Células Madre e da Medicina Regenerativa é entender o funcionamento molecular da pluripotência tanto a nível genético e epigenético, e aumentar a eficiência e a segurança das técnicas de reprogramação nuclear na aplicação clínica das iPS.

## Referências

1. Briggs R, King TJ. *Transplantation of Living Nuclei From Blastula Cells into Enucleated Frogs' Eggs*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1952 May;38(5):455-63.
2. Gurdon JB. *The developmental capacity of nuclei taken from intestinal epithelium cells of feeding tadpoles*. J Embryol Exp Morphol. 1962 Dec;10:622-40.
3. Gurdon JB. *The transplantation of nuclei between two species of Xenopus*. Dev Biol. 1962 Aug;5:68-83
4. Gurdon JB. *Adult frogs derived from the nuclei of single somatic cells*. Dev Biol. 1962 Apr;4:256-73.
5. Campbell KH, McWhir J, Ritchie WA, Wilmut I. *Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line*. Nature. 1996 Mar 7;380(6569):64-6.
6. Wilmut I, Beaujean N, de Sousa PA, Dinnyes A, King TJ, Paterson LA, Wells DN, Young LE. *Somatic cell nuclear transfer*. Nature. 2002 Oct 10;419(6907):583-6.
7. Byrne JA, Pedersen DA, Clepper LL, Nelson M, Sanger WG, Gokhale S, Wolf DP, Mitalipov SM. *Producing primate embryonic stem cells by somatic cell nuclear transfer*. Nature. 2007 Nov 22;450(7169):497-502.
8. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM. *Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts*. Science. 1998 Nov 6;282(5391):1145-7. Erratum in: Science 1998 Dec 4;282(5395):1827.
9. Wilmut I, Paterson L. *Somatic cell nuclear transfer*. Oncol Res. 2003;13(6-10):303-7.
10. Miller RA, Ruddle FH. *Pluripotent teratocarcinoma-thymus somatic cell hybrids*. Cell. 1976 Sep;9(1):45-55.
11. Cowan CA, Atienza J, Melton DA, Eggan K. *Nuclear reprogramming of somatic cells after fusion with human embryonic stem cells*. Science. 2005 Aug 26;309(5739):1369-73.
12. Takahashi K, Yamanaka S. *Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors*. Cell. 2006 Aug 25;126(4):663-76.
13. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S. *Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors*. Cell. 2007 Nov 30;131(5):861-72.
14. Gurdon JB, Melton DA. *Nuclear reprogramming in cells*. Science. 2008 Dec 19;322(5909):1811-5.
15. Vogel G, Normile D. Nobel Prize in physiology or medicine. *Reprogrammed cells earn biologists top honor*. Science. 2012 Oct 12;338(6104):178-9.