

# Células-tronco pluripotentes e doenças neurológicas

ALYSSON RENATO MUOTRI

## Introdução

**B**IOPSIAS do sistema nervoso periférico são frequentes e muitas vezes executadas com o objetivo de investigar o processo patológico em alguns pacientes. No entanto, em razão da característica extremamente invasiva do do procedimento, biopsias no sistema nervoso central (SNC) são apenas feitas em condições especiais e raras. Essa incapacidade de explorar o cérebro de um indivíduo vivo limita em muito nosso conhecimento sobre o avanço de doenças do desenvolvimento e neurodegenerativas. Atualmente, nosso conhecimento sobre os fenótipos celulares relacionados como doenças humanas do SNC é oriundo de tecidos *post-mortem*, não necessariamente preservados de forma apropriada. Além disso, na grande maioria dos casos, os tecidos representam apenas o estágio final da doença, eliminando a possibilidade de explorar os eventos iniciais responsáveis pela cascata de alterações celulares que leva ao resultado final, seja ele alterações estruturais ou mesmo morte celular.

Modelos animais são extremamente úteis porque podem reproduzir diversas formas de doenças genéticas humanas neurodegenerativas. Modelos transgênicos ou *knockouts* produziram inúmeros *insights* sobre novos mecanismos moleculares por trás de diversas patologias humanas, gerando novas possibilidades de intervenção terapêutica. Atualmente, esses modelos são restritos a doenças monogênicas, limitando o espectro de uso e apenas representando um número pequeno de doenças humanas passíveis de modelagem. Dificuldades técnicas, diferenças entre espécies e diferenças nos *backgrounds* genéticos acabam por interferir no processo de modelagem animal, mesmo no caso de doenças monogênicas. Em muitos casos, a tecnologia de transgênicos ou *knockout* não consegue reproduzir os sintomas humanos em animais, indicando uma necessidade clara de modelos humanos.

Os experimentos originais de reprogramação celular, liderados pelo pesquisador japonês Shinya Yamanaka, surpreenderam a comunidade científica por quebrarem o dogma de que células especializadas do corpo humano teriam uma identidade vitalícia (Takahashi et al., 2007). A expressão forçada de um grupo de fatores de transcrição, genes relacionados ao estado pluripotente, tem a capacidade de redirecionar a identidade de células especializadas e representa uma forma extraordinária de demonstrar a flexibilidade celular. Essa volta induzida ao estágio embrionário pluripotente foi batizado de iPSC (do inglês, *Induced Pluripotent Stem Cells*).

De forma concisa, a reprogramação genética consiste no retorno a uma forma mais plástica e potente a partir de uma célula já diferenciada ou especializada. Por exemplo, pode-se usar a célula da pele de um indivíduo adulto e transformá-la numa célula não especializada, indiferenciada e com a capacidade de se dividir indefinitivamente. Essa célula indiferenciada e imortal teria o potencial de se especializar novamente na mesma célula da pele ou em outro tipo celular qualquer, mesmo num neurônio. Em resumo, consegue-se obter células-tronco embrionárias sob encomenda, usando o mesmo material genético do paciente e evitando uma eventual rejeição em caso de transplante.

Apesar de a ideia de um transplante sem rejeição ser extremamente atraente para os interessados numa eventual terapia celular, os experimentos de Yamanaka permitem trazer à realidade o sonho de muitos neurocientistas: capturar o genoma humano de um paciente em células-tronco pluripotentes e usá-las para a produção ilimitada de células especializadas do sistema nervoso (Muotri, 2009). Apesar de iPSC geradas do próprio paciente serem, em teoria, menos imunogênicas para eventuais terapias de transplante, o foco deste artigo está voltado para futuras aplicações clínicas dessa tecnologia *in vitro*, como a modelagem de doenças neurológicas e o uso biotecnológico para descoberta de novos medicamentos por meio da triagem de drogas.

### **iPSC derivadas de doenças neurodegenerativas humanas**

Doenças que podem ser modeladas pela reprogramação celular podem ser raras, monogênicas ou no amplo espectro de doenças esporádicas ou multifatoriais. Até o presente momento, não existe publicação científica demonstrando a utilidade da tecnologia de iPSC para modelar este último grupo de doenças complexas. Possivelmente, tem sido complicado obter resultados conclusivos a partir desse tipo de doença complexa em razão dos diferentes *backgrounds* genéticos e influências do ambiente. Vale notar que mesmo doenças monogênicas também podem apresentar uma grande variabilidade fenotípica. Será necessário determinar se a variação genótipo-fenótipo observada nos pacientes será reproduzida por neurônios gerados a partir de iPSC dos pacientes ou se a reprogramação irá eliminar o “ruído” ambiental ou epigenético.

A reprogramação de células somáticas foi publicada para algumas doenças neurológicas. Porém, uma leitura crítica revela que poucos estudos realmente mostraram que é possível recapitular o fenótipo humano em neurônios derivados das iPSC. A derivação de neurônios oriundos de iPSC foi descrita para formas esporádicas de doenças neurodegenerativas de sintomas tardios como esclerose amiotrófica lateral (ELA) e a doença de Parkinson (Park et al., 2008; Soldner et al., 2009; Dimos et al., 2008). Pela perspectiva da reprogramação celular, é formidável observar que fibroblastos de pacientes idosos (até 85 anos de idade) com ELA e Parkinson foram capazes de gerar iPSC com eficiência semelhante a fibroblastos de pacientes mais jovens. Apesar da empolgação com esses trabalhos iniciais, nenhum dos artigos demonstrou fenótipos

relacionados à doença em células afetadas. É possível que os fenótipos celulares só surgirão com o passar dos anos, exatamente como acontece no corpo dos pacientes. Isso tornaria o processo altamente ineficiente em razão das dificuldades técnicas de manter neurônios funcionais em cultura por tanto tempo. Encontrar situações que simulem o envelhecimento precoce, por exemplo, aumentando as espécies reativas de oxigênio no meio de cultura, parece ser uma saída criativa.

A modelagem parcial, com a geração espontânea de um fenótipo em laboratório, foi observada para duas doenças monogênicas com sintomas precoces: atrofia muscular espinhal (AME) e Disautonomia Familiar (DF) (Ebert et al., 2009; Lee et al., 2009). Ambas as doenças são autossômicas recessivas e têm em comum a rápida progressão nos primeiros anos de vida. Além disso, ambas as doenças são associadas com a perda de função de genes envolvidos no processamento de RNA. A AME representa um grupo de doenças recessivas causadas por deleções ou mutações pontuais nos genes SMN (*Survival Motor Neuron*). O gene SMN1 codifica para uma proteína envolvida no processamento de RNA (Lorson et al., 1998). A AME tipo1 é caracterizada por mutações no gene SMN1, levando a uma degeneração rápida dos neurônios motores, induzindo uma atrofia muscular grave. Os sintomas aparecem por volta dos seis meses de idade e a morte do portador acontece por incapacidade respiratória antes dos dois anos de idade. Células iPSC de um único paciente AME foram caracterizadas e diferenciadas em neurônios motores. Quando comparadas com neurônios motores derivados de iPSC de um controle materno normal, não portador da doença, verificou-se que as AME-iPSC produziram um número reduzido de neurônios motores, sugerindo a morte precoce desse tipo celular. O trabalho não faz uma caracterização funcional dos neurônios motores gerados pelo grupo (capacidade de estimular potenciais de ação ou formar junções neuromusculares). Outra observação feita pelo grupo foi um aumento do número de agregados proteicos conhecidos como “gemas”, em fibroblastos e iPSC do paciente com AME. Essas gemas estão geralmente associadas diretamente com a intensidade da doença. Os agregados puderam ser revertidos em fibroblastos ou nas iPSC com a utilização de drogas específicas. Infelizmente, o grupo não analisou a presença dessas gemas nas células de interesse, os neurônios motores. Esse trabalho mostra, pela primeira vez, a prova de princípio de que as iPSC podem ser utilizadas como uma futura plataforma para triagem de drogas que possam reverter ou atenuar os fenótipos celulares relacionados com doenças humanas. Infelizmente, o entusiasmo inicial foi afetado pela ausência de controles mais rigorosos e pela presença de outros pacientes com AME. A incorporação de mais controles, perda e ganho de função teriam reduzido as críticas de que o fenótipo observado seria uma mera consequência intrínseca da variabilidade do sistema iPSC (tópico discutido em detalhes mais adiante).

A DF é também uma doença recessiva com alta incidência em descendentes da linhagem judia Ashkenzi (Brunt & McKusick, 1970). A doença é carac-

terizada pela degeneração de neurônios sensoriais e autônomos, levando a uma disfunção geral severa e letal. O quadro clínico inclui hipoatividade, lacrimação, indiferença a dor e temperatura. Um defeito no processamento de edição do gene IKBKAP resulta na perda de função da proteína em determinados tecidos (Slaugenhaupt et al., 2001). As iPSC derivadas de três portadores de DF foram diferenciadas em células neurais progenitoras e revelaram níveis baixos de expressão de IKBKAP quando comparado ao grupo controle. Defeitos na migração e capacidade de diferenciação neuronal também foram notados nas progenitoras neurais derivadas de DF-iPSC. Uma droga (cinetina) foi usada para recuperar em parte a edição do RNA de IKBKAP nessas células, revertendo os defeitos de migração mas não de diferenciação neuronal. Variações químicas da cinetina poderiam ter sido usadas na tentativa de recuperar ambos os defeitos. De qualquer forma, esse segundo trabalho apresenta vantagens sobre o primeiro, principalmente pelo uso de mais de um paciente.

### **Modelando doenças do desenvolvimento neural**

Apesar de os avanços de modelagem com iPSC se restringirem, até o momento, em doenças neurodegenerativas, antecipo que a tecnologia será útil para doenças do desenvolvimento e psiquiátricas como o espectro autista e a esquizofrenia. No entanto, acredito que resultados iniciais virão muito provavelmente de doenças monogênicas de causa conhecida e com sintomas precoces. Um exemplo de uma doença humana com grande potencial de modelagem é a síndrome de Rett, que é caracterizada por um retardo no desenvolvimento natural durante os primeiros anos de vida, regressão das habilidades manuais, perda do vocabulário, movimentos estereotipados e um amplo espectro autista (Samaco et al., 2005). Portadores da síndrome de Rett geralmente carregam mutações no gene MeCP2, localizado no cromossomo X. A proteína MeCP2 tem uma maior afinidade por DNA metilado e parece estar envolvida na regulação epigenética de genes-alvo no sistema nervoso. O fato de conhecermos o gene envolvido nessa síndrome permitirá a manipulação genética em neurônios derivados de Rett-iPSC, validando eventuais fenótipos celulares ou moleculares encontrados após a diferenciação. Essa importante validação será imprescindível para nos convencer de que os fenótipos observados não são frutos de variações experimentais.

A síndrome de Rett faz parte das síndromes associadas ao espectro autista e talvez seja o protótipo ideal para começar a investigar doenças psiquiátricas complexas. Seguindo esse modelo, o próximo passo consistiria em buscar fenótipos semelhantes em diversas síndromes do espectro autista, procurando vias moleculares comuns. Um desafio maior para essa categoria de doenças estaria na distinção da contribuição de fatores do *background* genético e do ambiente. Novas ferramentas para a manipulação do genoma de células-tronco pluripotentes, como a recombinação homóloga e uso de *zinc-fingers* com endonucleases específicas, podem ajudar na eliminação do ruído ou variabilidade experimental

(Zwaka & Thomson, 20003; Hockemeyer et al., 2009). Uma outra via para revelar fenótipos neuronais complexos e comportamentos neurais específicos pode ser pelo uso de animais quiméricos. O transplante de células-tronco embrionárias humanas no cérebro de embriões murinos revelou o enorme potencial de adaptação das células pluripotentes em decorrência do contato com nicho celular (Muotri et al., 2005). Esse tipo de modelagem une o *background* celular genético humano e a manipulação de um organismo animal, permitindo o estudo das consequências de alterações ambientais em neurônios humanos.

### **Uso de neurônios humanos como ferramenta para triagem de novas drogas**

No passado, a seleção de drogas candidatas era feita em linhagens de células humanas e representaram um grande avanço para a medicina. Um exemplo foi o desenvolvimento da vacina contra pólio, originalmente concebida *in vitro*, usando a linhagem de células HeLa (Syverton et al., 1954). As iPSC derivadas de pacientes podem oferecer uma vantagem bem maior em relação ao modelo tradicional de linhagens celulares transformadas, uma vez que levam em consideração o genoma original do doador, além da capacidade de diferenciação no tipo específico de célula afetada durante o exato momento do desenvolvimento.

Um dos grandes benefícios da reprogramação celular é a possibilidade de estudar estágios do desenvolvimento de células precursoras neurais, antes da completa maturação em um neurônio funcional. Células precursoras neurais podem se especializar tanto em neurônios como em glia. Essas populações podem ainda se dividir em subtipos específicos de neurônios, por exemplo, gerando diversos de tipos celulares responsáveis pelo desenvolvimento e pela formação do cérebro (Muotri & Gage, 2006). É bem provável que algumas doenças apenas afetem um subtipo específico de neurônio que tenha origem ainda na fase precursora. Nesses casos, as intervenções terapêuticas devem acontecer no estágio exato do desenvolvimento. Além dessas vantagens, as iPSC oferecem a oportunidade única de testar drogas diretamente em redes neurais humanas, algo que era dificilmente imaginado há alguns anos.

A observação de fenótipos celulares durante a triagem de drogas pode se beneficiar imensamente das técnicas de neurociência que já estão estabelecidas. A análise de células individualizadas pode ser feita de medidas morfométricas, arborização neuronal, polaridade, densidade de espinhos neuronais ou tempo de maturação. Da mesma forma, eletrofisiologia pode ser utilizada para demonstrar a comunicação entre duas células. Efeitos não autônomos, como a influência de astrócitos, podem também ser estudados após a diferenciação das iPSC e cocultura com mais de um tipo celular. Alguns protocolos de diferenciação para certos subtipos de neurônios já existem, mas ainda não sabemos como diferenciar em cultura as iPSC em todos os tipos celulares do cérebro humano. A conversão direta a partir de células somáticas, ou mesmo precursoras neurais derivadas de iPSC, pode ser uma alternativa e poderá ser obtida

com um *cocktail* de fatores de transcrição específicos para cada tipo celular. A obtenção desses protocolos permitirá o estabelecimento de circuitos neuronais em cultura, um passo mais avançado para compreensão de doenças e teste de novos medicamentos.

Uma vez que um fenótipo celular consistente é observado em neurônios derivados de iPSC de um paciente, plataformas para teste de drogas podem ser desenvolvidas com o intuito de testar novos medicamentos que possam reverter ou atenuar o defeito neuronal. Após diversos testes, em diferentes condições experimentais, novos compostos terapêuticos podem emergir, beneficiando diversos pacientes (Figura 1).

### **A variabilidade intrínseca das células-tronco pluripotentes**

Células-tronco embrionárias humanas disponíveis são extremamente variáveis em relação a marcadores epigenéticos, perfil de expressão gênica e propensão a diferenciação (Osafune et al., 2008). Aparentemente, as iPSC se comportam de maneira semelhante, oferecendo o mesmo espectro de variabilidade intrínseca (Pick et al., 2009). As diferenças no perfil de expressão gênica são geralmente atribuídas à introdução dos vetores de reprogramação que se integram de maneira aleatória no genoma ou mesmo à contínua expressão dos cDNAs pluripotentes usados no processo. Uma explicação alternativa, gerada a partir da reprogramação sem o uso de vetores virais, sugere a retenção da “memória genética” da célula original (Marchetto et al., 2009). O porquê da variação ainda é uma questão em aberto, e mais dados serão necessários para a formulação de hipóteses a serem testadas. De qualquer forma, esse é ainda um ponto muito importante para definir o nível de variabilidade entre diversos clones de iPSC geradas a partir de um mesmo indivíduo. Esse tipo de informação é imprescindível para o estabelecimento de controles rigorosos durante a definição de fenótipos celulares.

### **Conclusões**

Cientistas do mundo todo estão usando a tecnologia de iPSC para investigar estágios iniciais do desenvolvimento neural humano e para modelagem de doenças neurológicas. Até então, essa tecnologia mostrou-se restrita para doenças monogênicas, revelando uma nova metodologia de trabalho para elucidar novas vias moleculares responsáveis por patologias humanas. A modelagem de doenças com sintomas tardios, como Alzheimer, ou mesmo psiquiátricas, como no autismo, vai precisar de fatores adicionais para que o sistema seja desafiado e revele fenótipos celulares relevantes. O potencial da reprogramação celular parece estar mesmo limitado pela capacidade criativa humana e pelos princípios éticos definidos pela sociedade. Neurocientistas do passado não poderiam imaginar um cenário como esse, onde infinitas células nervosas de pacientes vivos pudessem ser geradas constantemente e estudadas em laboratórios do mundo todo. Por sua vez, pesquisadores do futuro não conseguirão imaginar a ciência sem uma ferramenta como essa. Quem viver verá.

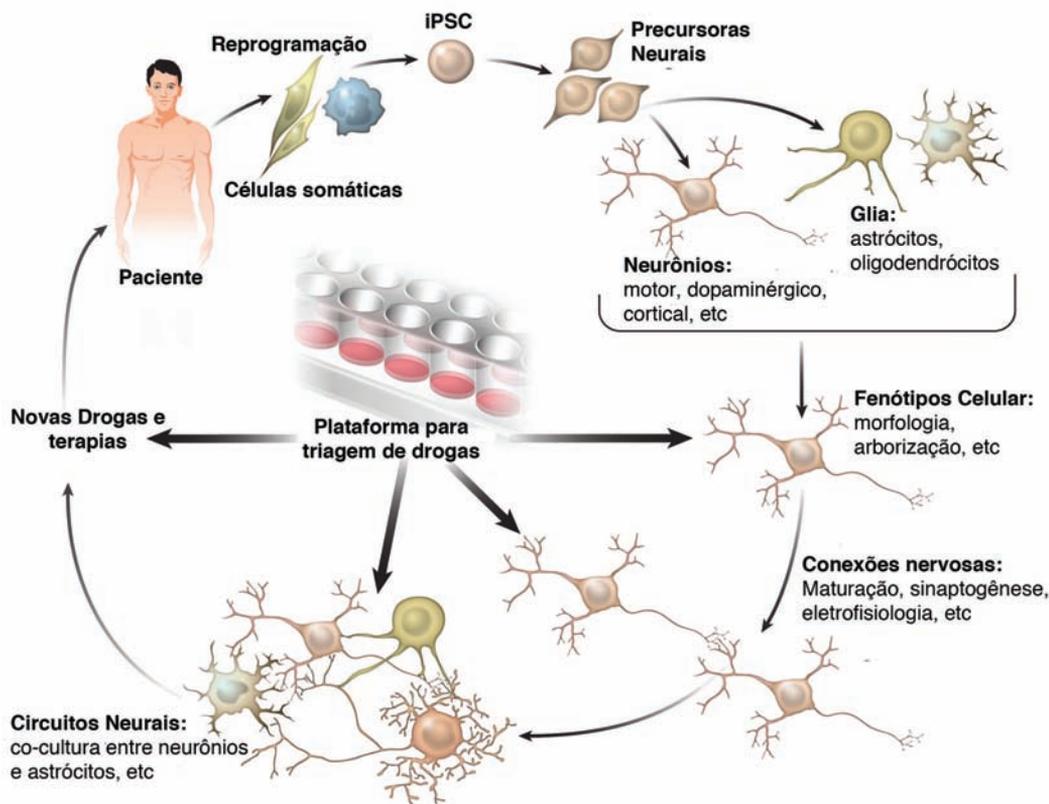


Figura 1 – Modelagem de doenças neurológicas usando a tecnologia de iPSC. Reprogramação de células somáticas de pacientes e controles, gerando iPSC isogênicas, isto é, com o mesmo genoma do paciente. Células progenitoras neurais são derivadas das iPSC e diferenciadas em neurônios ou células da glia. Neurônios podem ser diferenciados em subtipos específicos, de acordo com a célula-alvo de cada doença. Fenótipos celulares são analisados por morfometria, por exemplo, tamanho do soma, número de processos etc. Conexões entre neurônios e a formação de circuitos em cultura podem ser estudadas por diferentes métodos já estabelecidos em neurociência, como eletrofisiologia. Além disso, a interação neurônio-glia pode ser estudada em coculturas para distinguir eventos autônomos de fenótipos secundários em cada tipo de doença humana. Uma vez que o fenótipo é identificado, plataformas para a triagem de drogas capazes de reverter ou atenuar o fenótipo podem ser utilizadas. Novas terapias e remédios podem surgir a partir desse tipo de abordagem, beneficiando uma série de pacientes portadores de doenças neurológicas. Adaptada de Marchetto et al., 2010.

## Referências

BRUNT, P. W.; MCKUSICK, V. A. Familial dysautonomia. A report of genetic and clinical studies, with a review of the literature. *Medicine*, Baltimore, v.49, p.343-74, 1970.

- DIMOS, J. T. et al. Induced pluripotent stem cells generated from patients with ALS can be differentiated into motor neurons. *Science*, v.321, p.1218-21, 2008.
- EBERT, A. D. et al. Induced pluripotent stem cells from a spinal muscular atrophy patient. *Nature*, v.457, p.277-80, 2009.
- HOCKEMEYER, D. et al. Efficient targeting of expressed and silent genes in human ESCs and iPSCs using zinc-finger nucleases. *Nat. Biotechnol.*, v.27, p.851-7, 2009.
- LEE, G. et al. Modelling pathogenesis and treatment of familial dysautonomia using patient-specific iPSCs. *Nature*, v.461, p.402-6, 2009.
- LORSON, C. L. et al. SMN oligomerization defect correlates with spinal muscular atrophy severity. *Nat. Genet.*, v.19, p.63-6, 1998.
- MARCHETTO, M. C. et al. Transcriptional signature and memory retention of human-induced pluripotent stem cells. *PLoS One*, v.4, p.e7076, 2009.
- \_\_\_\_\_. Pluripotent stem cells in neurodegenerative and neurodevelopmental diseases. *Hum. Mol. Genet.*, v.19, p.R71-6, 2010.
- MUOTRI, A. R. Modeling epilepsy with pluripotent human cells. *Epilepsy Behav.*, v.14, Suppl. 1, p.81-5, 2009.
- MUOTRI, A. R.; GAGE, F. H. Generation of neuronal variability and complexity. *Nature*, v.441, p.1087-93, 2006.
- MUOTRI, A. R. et al. Development of functional human embryonic stem cell-derived neurons in mouse brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v.102, p.18644-8, 2005.
- OSAFUNE, K. et al. Marked differences in differentiation propensity among human embryonic stem cell lines. *Nat. Biotechnol.*, v.26, p.313-5, 2008.
- PARK, I. H. et al. Disease-specific induced pluripotent stem cells. *Cell*, v.134, p.877-86, 2008.
- PICK, M. et al. Clone – and gene – specific aberrations of parental imprinting in human induced pluripotent stem cells. *Stem Cells*, v.27, p.2686-90, 2009.
- SAMACO, R. C. et al. Epigenetic overlap in autism-spectrum neurodevelopmental disorders: MECP2 deficiency causes reduced expression of UBE3A and GABRB3. *Hum. Mol. Genet.*, v.14, p.483-92, 2005.
- SLAUGENHAUPT, S. A. et al. Tissue-specific expression of a splicing mutation in the IKBKAP gene causes familial dysautonomia. *Am. J. Hum. Genet.*, v.68, p.598-605, 2001.
- SOLDNER, F. et al. Parkinson's disease patient-derived induced pluripotent stem cells free of viral reprogramming factors. *Cell*, v.136, p.964-77, 2009.
- SYVERTON, J. T. et al. Studies on the propagation in vitro of poliomyelitis viruses. V. The application of strain HeLa human epithelial cells for isolation and typing. *J. Lab. Clin. Med.*, v.43, p.286-302, 1954.
- TAKAHASHI, K. et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*, v.131, p.861-72, 2007.
- ZWAKA, T. P.; THOMSON, J. A. Homologous recombination in human embryonic stem cells. *Nat. Biotechnol.*, v.21, p.319-21, 2003.

*RESUMO* – Grande parte do conhecimento atual dos fenótipos celulares relacionados a doenças neurológicas foi obtida a partir de estudos de tecidos cerebrais coletados após a morte do indivíduo. Essas amostras geralmente representam os estágios finais da doença e, portanto, não servem como fiel representação de como os sintomas aparecem. Além disso, nessas circunstâncias, a patologia observada pode muito bem ser um efeito secundário do processo patológico ou mesmo da deterioração do tecido em vez de um fenótipo celular autêntico. Da mesma forma, modelos animais nem sempre recapitulam exatamente a patologia das doenças em humanos. Neste artigo, pretendo apresentar uma visão crítica dos recentes avanços obtidos a partir da modelagem de doenças neurológicas humanas, utilizando células-tronco pluripotentes. O foco na reprogramação celular de células somáticas, gerando células-tronco pluripotentes induzidas, justifica-se em razão do grande potencial experimental não só para a modelagem de doenças humanas, mas também como ferramenta biotecnológica para triagem de novas drogas, contribuindo para uma futura medicina personalizada.

*PALAVRAS-CHAVE:* Células-tronco pluripotentes, Reprogramação genética, Doenças neurológicas, Triagem de drogas.

*ABSTRACT* – Most of our current knowledge about cellular phenotypes related to neurological diseases was gathered from studies performed in brain tissue collected post-mortem. These samples often represent the end-stage of the disease process and may not represent a fair picture of how the disease developed over time. Furthermore, under these conditions, the pathology may as well be a secondary effect of the disease process or even due to the poor tissue condition and may not represent an authentic cellular phenotype. Likewise, animal models not always recapitulate the pathology from human disorders. In this article, I will present a critical view on the recent advances obtained from disease modeling using human pluripotent stem cells. The focus on cellular reprogramming as tool to generate patient-specific induced pluripotent stem cells is justified by the great experimental potential, not only for disease modeling, but also as a biotechnological tool for future drug-screening platforms and personalized medicine.

*KEYWORDS:* Pluripotent stem cells, Cellular reprogramming, Neurological diseases, Drug-screening.

*Alysson Renato Muotri*, Ph.D., é professor da University of California San Diego, Dept. Pediatrics/Cellular & Molecular Medicine. @ – muotri@ucsd.edu

Recebido em 23.9.2010 e aceito em 29.9.2010.