



FACULDADE DE CIÊNCIAS DA EDUCAÇÃO E SAÚDE

GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

KARINE CALDEIRA DO NASCIMENTO BARBOSA

TRANSDIFERENCIAÇÃO E DESDIFERENCIAÇÃO CELULAR

Trabalho de conclusão de curso apresentado como requisito parcial para obtenção de grau de bacharel em Biomedicina, sob orientação do Prof. Dr. Paulo Roberto Queiroz.

BRASÍLIA, 2017.

TRANSDIFERENCIAÇÃO E DESDIFERENCIAÇÃO CELULAR

Karine CALDEIRA¹; Paulo QUEIROZ²

RESUMO

Transdiferenciação e dediferenciação são métodos terapêuticos gênicos, com capacidade de serem aplicados a uma grande variedade de doenças genéticas, representando uma evolução nos mecanismos de reparos e tratamentos aplicados a diversas doenças nas quais não há tratamentos eficazes. Esses métodos possuem a habilidade de diferenciação celular em linhagens distintas e de originar células funcionais em tecidos oriundos de uma mesma linhagem, dando ao organismo a capacidade de regeneração de membros ou até mesmo fazer a substituição de células que foram perdidas ou alteradas devido a patologias. A transdiferenciação ocasiona a perda da especificação de uma dada célula, podendo ser induzida a se especificar e se diferenciar em outro tipo celular, a dediferenciação ocorre quando há o retorno do grau de diferenciação de uma célula, podendo retornar ao ponto da célula se encontrar totalmente indiferenciada, reiniciando seu processo de diferenciação, ambas possibilitam corrigir alterações de genes expressos. O objetivo desse trabalho foi relacionar transdiferenciação e dediferenciação expondo suas vantagens para a saúde.

Palavras-chave: iPS, células tronco pluripotentes, células tronco, transdiferenciação, dediferenciação, diferenciação, transcrição, tratamento.

TRANSDIFFERENTIATION AND CELLULAR DEDIFFERENTIATION

ABSTRACT

Transdifferentiation and Dedifferentiation are genetic therapeutic methods, capable of being applied to a wide variety of genetic diseases, representing an evolution in repair mechanisms and treatments applied to several diseases in which there are no effective treatments. These methods possess the ability of cell differentiation in distinct lineages and to originate functional cells in tissues from the same lineage, giving the body the ability to regenerate limbs or even replace cells that have been lost or altered due to pathologies. Transdifferentiation causes the loss of the specification of a given cell, which can be induced to be specified and differentiated into another cell type. Dedifferentiation occurs when there is a return of the degree of differentiation of a cell, being able to return to the point where the

cell is completely undifferentiated, restarting their process of differentiation, both make it possible to correct changes of expressed genes. The objective of this work was to relate transdifferentiation and dedifferentiation exposing its health advantages.

Keywords: iPS, pluripotent stem cells, stem cells, transdifferentiation, dedifferentiation, differentiation, transcription, treatment.

¹ Graduanda de Biomedicina, Faculdade de Ciências da Educação e Saúde do Centro Universitário de Brasília – UniCEUB. kaa.cnb@gmail.com

² Biólogo. Doutor em Biologia Animal pela Universidade de Brasília (2006). paulo.silva@uniceub.br

INTRODUÇÃO

Na década de 90, houve importantes avanços nas pesquisas com terapia celular com o objetivo de tratamento de doenças hereditárias, autoimunes e outras patologias com baixas perspectivas terapêuticas. Nessas patologias as estratégias de terapia celular estiveram restritas à utilização de células hematopoiéticas voltadas ao tratamento de doenças hematológicas e oncohematológicas (DEL CARLO, 2008).

No século XXI, com a utilização de novos conhecimentos a respeito da utilidade das células-tronco e com os novos estudos científicos, a transdiferenciação e a desdiferenciação dessas células passaram a ter emprego considerado na terapia celular. A possibilidade de tratamento com células-tronco conquistou notoriedade devido ao seu grande potencial terapêutico, porém as novas técnicas de transdiferenciação e desdiferenciação celulares poderão substituí-la ou atualizá-la (EMERICK, 2011).

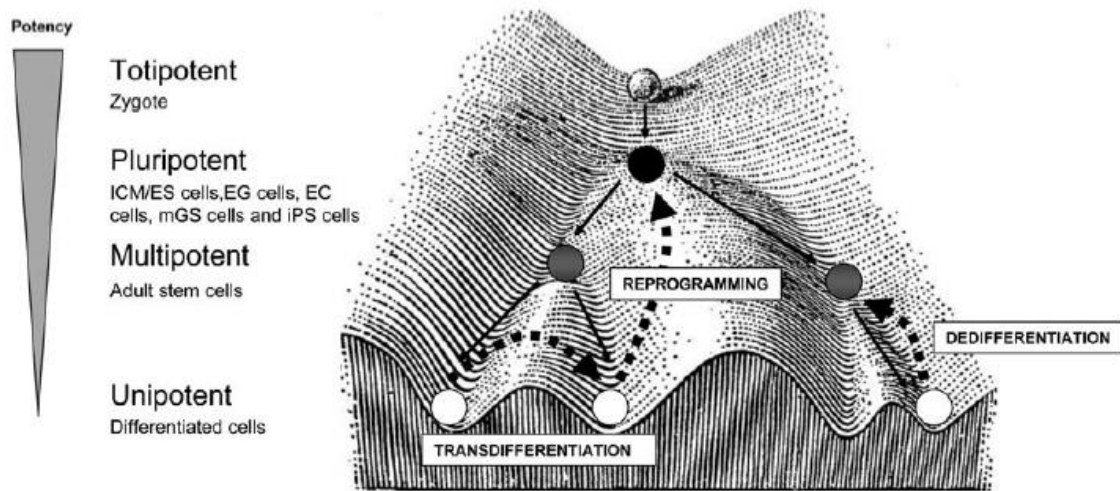
O princípio desse conceito reside no fato das diferenças de funções, denominadas de diferenciação celular, consistirem na especialização e especificação de cada célula. A especialização se caracteriza pela diversidade na morfologia celular e na consequente expressão gênica seletiva, adquirida durante o processo de diferenciação. Os inúmeros tipos celulares que compõem um animal adulto provêm do zigoto após a fecundação, resultando na união de informações genéticas a partir da junção de dois gametas, possuindo toda a informação necessária para a formação dos diferentes tipos celulares que irá formar um organismo. O zigoto é então a célula com máximo potencial para formar todas as células do corpo do indivíduo (JUNQUEIRA, 2011).

Uma das principais células que compõem um indivíduo são as células tronco, derivadas do embrião. Estas células possuem a capacidade de se autorenovar, gerando tipos de células funcionais diferenciadas e são classificadas de acordo com o seu potencial de desenvolvimento. O processo natural é a diferenciação na qual uma célula tronco ou uma célula indiferenciada é induzida a se diferenciar em células específicas, após estímulos adequados, tornando-as células adultas diferenciadas. Estas podem ser artificialmente induzidas a se desdiferenciarem, tornando-se novamente células indiferenciadas ou células tronco. Na transdiferenciação, uma célula adulta de um tecido, torna-se outra célula adulta de

outro tecido (YANG, 2011). A desdiferenciação torna-se uma estratégia viável para promover a regeneração de tecidos em mamíferos que não possuem tal capacidade, podendo a desdiferenciação regenerar tecidos *in vitro* e *in vivo* (JOPLING; BOUE; BELMONTE, 2011).

A transdiferenciação consiste na perda da especificação de uma determinada célula, que basicamente perde sua especificidade ou seu estado diferenciado, levando à produção de células que vão se dividir e atuar como progenitoras. Já na desdiferenciação as células recebem alguns genes que codificam fatores de transcrição que teriam o potencial de transformar células adultas em células tronco pluripotentes induzidas (iPS); essas células recebem a inserção de um vírus composto por quatro fatores, Oct3/4, Sox2, c-Myc, e Klf4, via transdução, responsáveis pela reprogramação do código genético da célula, esses fatores são inseridos no DNA da célula adulta e reprogramam o código genético para que ela volte a ser uma célula tronco embrionária com autorenovação, podendo se diferenciar em outro tipo de célula com uma nova função. Essas técnicas poderão ser muito usadas para a reparação de tecidos lesionados, como demonstrado na figura 1. (EISENSTEIN, 2016) (TAKAHASHI; YAMANAKA, 2007).

Figura 1: Representação da transdiferenciação, reprogramação e desdiferenciação.



Fonte: Adaptado de EGUIZABAL et al. (2013)

Mesmo após a descoberta das células iPS, as células tronco embrionárias não perderam sua importância nas pesquisas de transdiferenciação celular, pois foi preciso chegar primeiro até elas para que fossem desenvolvidas as iPS e, conseqüentemente, a transdiferenciação. A insegurança dos pesquisadores em relação à utilização dos vírus é

evidente, devido a mínima diferença entre as células tronco e as iPS que devem sempre serem comparadas em relação a eficácia das suas funções futuras (JAMES, 2011).

Os novos tipos celulares podem vir de diferentes fontes presentes no organismo, principalmente das células-tronco, as próprias células já diferenciadas do organismo podem sofrer inúmeras divisões com o objetivo de reparação tecidual. As novas células, que irão atuar no processo de regeneração, podem surgir por meio da transdiferenciação que pode ocorrer sem necessariamente haver divisão celular, podendo ocorrer via progenitor que foi obtido a partir de um processo de desdiferenciação (TANAKA, 2011).

Nesse contexto o presente estudo teve como objetivo relacionar a transdiferenciação e desdiferenciação celular, apresentando os seus conceitos e vantagens para aplicações na saúde humana.

METODOLOGIA

O trabalho em questão relacionou no contexto científico a transdiferenciação celular e desdiferenciação celular expondo seus métodos e benefícios extremamente vantajosos para a saúde humana. Para a elaboração desse trabalho, foram utilizados como base artigos científicos recentes de 2011 a 2016, como também, artigos mais antigos de 2006 para método introdutório dos conceitos apresentados.

Trata-se de uma revisão bibliográfica narrativa que de acordo com Rother (2007) é uma análise qualitativa da literatura na interpretação e análise crítica e individual do autor, associada a dados levantados pelos cientistas, revistas, livros, sites e artigos relacionados a tratamentos genéticos celulares. O levantamento dos artigos foi realizado por meio de consulta às bases de dados biblioteca virtual em saúde - BVS, Google acadêmico e *Scientific Eletronic Library Online - SciELO*.

Para essa busca de artigos foram utilizadas as seguintes palavras-chave: diferenciação, transdiferenciação, desdiferenciação, terapia gênica, evolução celular, mutação gênica, tratamentos genéticos. Selecionando artigos publicados nos idiomas inglês e português.

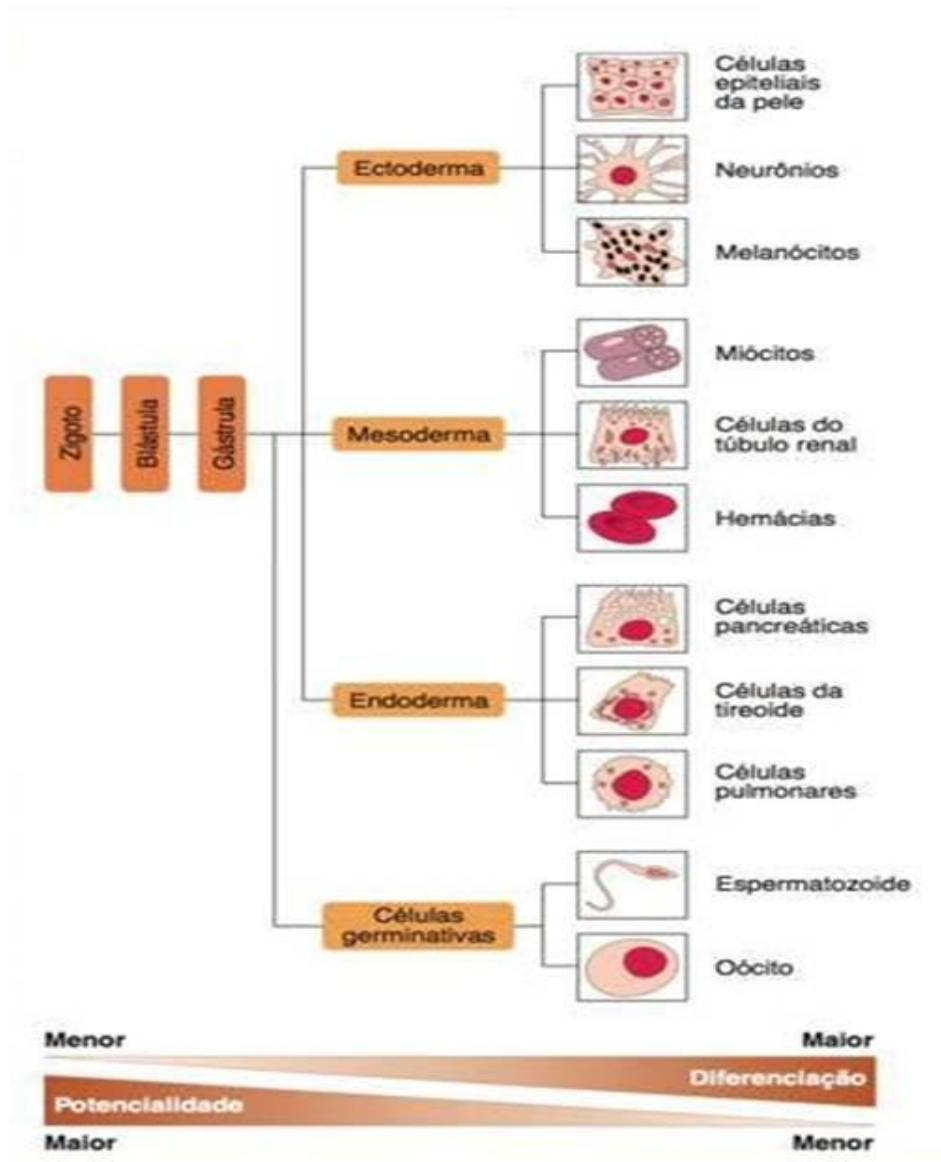
DESENVOLVIMENTO

A diferenciação celular

Cada célula é composta por duas características: diferenciação e potencialidade. Diferenciação é o grau de especialização, a capacidade que a célula tem em ser eficiente em sua determinada função. Este processo é regulado pelos genes controladores do desenvolvimento, genes nos quais determinam o destino e o grau de diferenciação de uma determinada célula, cada região possui seu grupo de genes controladores específicos. Potencialidade é a capacidade de originar outros tipos celulares e, quanto maior for à potencialidade maior é a capacidade da célula em originar outros tipos celulares e menor será a sua diferenciação (GOMES, 2010; MALLANNA, RIZZINO, 2010).

Como representado posteriormente na figura 2, os blastômeros representam uma das primeiras células embrionárias que tem a capacidade de originar qualquer outro tipo celular, com baixo grau de diferenciação apresentando 100% de potencialidade e são denominadas de totipotentes. Àquelas que perderam a capacidade de divisão mitótica, que não podem originar outras células como o músculo cardíaco e células nervosas são, portanto, extremamente diferenciadas com sua potencialidade quase nula. Porém, a maioria das células possui graus intermediários de diferenciação e potencialidade (JUNQUEIRA, 2011).

Figura 2: Níveis da diferenciação celular com suas características e tipos de tecidos formados.

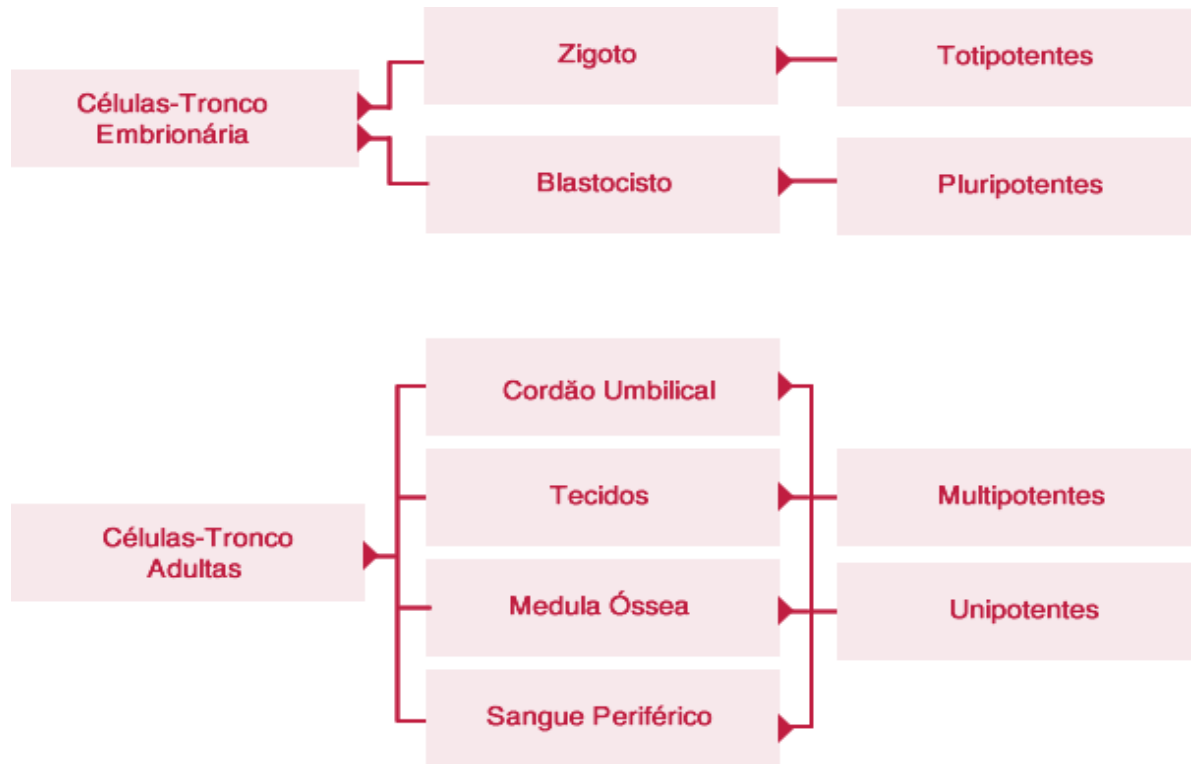


Fonte: JUNQUEIRA (2011).

Na maioria dos eucariontes multicelulares, as células se diferenciam durante o desenvolvimento do organismo para efetuar funções especializadas, como demonstrado na figura 3. Em sua maioria possui o mesmo DNA, porém transcrevem genes diferentes e como em todos os outros processos celulares, a diferenciação é controlada por genes, a coordenação das atividades de tipos diferentes de células requer a comunicação entre elas. Quando uma célula se divide, as células filhas podem ser totalmente idênticas ou podem mudar seus padrões de expressão gênica para se tornarem funcionalmente diferentes da célula original. Entre os eucariontes multicelulares complexos, as células embrionárias se diferenciam em células altamente especializadas como, por exemplo, músculos, nervos, fígado e rins. Com exceção de alguns casos especiais, o conteúdo do DNA permanece o mesmo, mas os genes

transcritos são diferentes. Essas mutações ocorrem para a viabilidade da diversificação eucariótica (DANI, 2016).

Figura 3: Tipos Celulares.



Fonte: (ROBERTIS, 2006)

O estudo de tais mutações gênicas permite que o processo de desenvolvimento embrionário seja compreendido. Em organismos multicelulares, a coordenação das atividades dos vários tecidos e órgãos são controlados pela comunicação entre eles, isto envolve moléculas de sinalização, tais como, os neurotransmissores, hormônios e fatores de crescimento que são secretados por um tecido e atuam em outro por meio de receptores específicos de superfície celular (ROBERTIS, 2006).

O início e evolução da transdiferenciação e desdiferenciação celular

Observa-se que as células maduras não são vistas mais como “terminalmente diferenciadas”, pois atualmente estas são persuadidas a adotar outros destinos. Essa ideia teve início em Kyoto no Japão, onde foi observado por cientistas da universidade de pesquisa e desenvolvimento Kyoto University, que vários genes com a capacidade de transformar células adultas do tecido conjuntivo em células imaturas induzidas a partir de células tronco

pluripotentes (iPS) têm a capacidade de se desenvolver em qualquer outro tipo celular por serem células estaminais embrionárias chamadas de pluripotentes. As iPS podem ser produzidas de forma ilimitada o que as diferem das células tronco embrionárias que se originam de embriões humanos. Dessa forma, as iPS não vão contra as questões bioéticas podendo se originar de qualquer tecido humano. Proveniente de anos de pesquisa foi descoberto então a reprogramação direta, que consiste na transformação direta de células maduras em outro tipo celular, sem necessitar da pluripotência. Foram realizados procedimentos para induzir células do estômago a se transformarem em células β pancreáticas que produzem insulina e células da pele em células do coração e neurônio (EISENSTEIN, 2016).

A transdiferenciação também foi inicialmente observada na regeneração de lentes da ocular de *Hemidactylus mabouia*, popularmente conhecido como “lagartixa” há mais de um século. Processo no qual permite que a desdiferenciação esteja um passo a frente onde se obtém células regressando a um ponto em que elas possam mudar suas linhagens, diferenciando-as em outros tipos celulares (JOPLING; BOUE; BELMONTE, 2011).

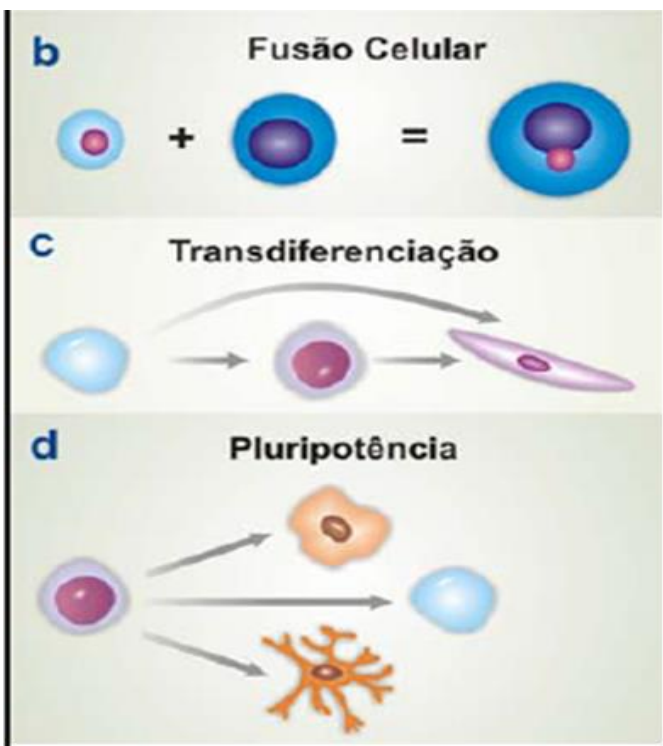
Transdiferenciação

A técnica de uma célula madura e diferenciada sofrer reprogramação genética e se tornar uma célula pluripotente, ou seja, uma célula capaz de se diferenciar em quase todos os tipos de células e, conseqüentemente, tecidos (com exceção dos anexos embrionários e da placenta), é conhecida como transdiferenciação. Células tronco mesenquimais humanas totalmente diferenciadas tem a capacidade de sofrer transdiferenciação *in vitro*. Ao trocar-se o agente indutor de diferenciação, sofrem transdiferenciação até tornarem-se indiferenciadas por reprogramação genética, possibilitando a formação de um novo tipo celular (IPCT, 2016).

São denominadas de células tronco pluripotentes induzidas (iPS) e se caracterizam por serem células somáticas diploides provenientes de procedimentos minimamente invasivos, induzidas geneticamente à reversão até o estado de célula tronco embrionária. Tem como principal utilidade otimizar e melhorar a plasticidade celular, tornando amplo seu potencial de diferenciação por meio da reprogramação genética de células somáticas e transferência nuclear somática a partir da introdução de genes determinantes de pluripotência (OLIVEIRA; FERNANDES, 2016).

Nesse processo ocorre fusão entre células de linhagens diferentes *in vitro*, e a célula hospedeira tem seus marcadores transferidos para a célula fundida, o que resulta na ativação de genes que realizam a conversão direta de uma linhagem para outra, alterando a especificidade celular, como representado na figura 4 (BARCELOS, 2010; WEBER, CALVI, 2010).

Figura 4: A) Adição de dois diferentes tipos celulares em um tecido. B) Fusão entre as células diferentes. C) A reprogramação genética de transdiferenciação. D) Multiplicação das células pluripotentes no tecido.



Fonte: Adaptado de BARCELOS (2010).

Algumas células da medula óssea podem se fundir com células tronco embrionárias espontaneamente e, assim, as células da medula óssea assumem o fenótipo das células receptoras, ocorrendo uma transdiferenciação (SCHWINDT et al., 2006).

Transdiferenciação natural

Outra opção para regeneração de tecidos é a transdiferenciação natural na qual primeiro a célula é desdiferenciada e seu programa de desenvolvimento natural é ativado dando capacidade à célula de se diferenciar em uma nova linhagem. A lente da ocular

regenerada do *H. mabouia* mostra exatamente o processo da transdiferenciação natural. As células epiteliais pigmentadas (PeCs) transdiferenciam-se quando a lente do *H. mabouia* é perdida e regeneram o tecido perdido. Primeiramente, as PeCs se desdiferenciam e se proliferam criando uma nova vesícula de lente e então sofrem o processo de maturação da célula. Após a lentectomia, processo no qual ocorre a remoção da lente ocular, as PeCs perdem a sua pigmentação natural e mudam de forma e, em seguida, o retinoblastoma (RB) que é uma importante proteína inibidora dos fatores de transcrição é inativada por hiperfosforilação, permitindo as células da lente ocular de *H. mabouia* se desdiferenciem e retornem ao ciclo celular. Durante este período pode haver aumento de genes relacionados à apoptose e de modificadores epigenéticos (JOPLING; BOUE; BELMONTE, 2011).

Células estaminais são especializadas para produzir variáveis tipos de células em todos os tecidos, essa especialização é muitas vezes regulada por fatores de transcrição, que são proteínas responsáveis pelas vias de ativação e repressão de transcrição de genes (LU; ZHANG, 2015).

Transdiferenciação Experimental

Através de uma regulação positiva ou negativa de uma programação genética é possível converter um tipo celular em outro diretamente, embora na transdiferenciação natural ocorra a desdiferenciação gradativamente na célula primária formando um tipo intermediário de célula que possa diferenciar em outra linhagem (SOUZA, 2006; CENTRE FOR GENOMIC REGULATION, 2016).

A transdiferenciação experimental de células β em macrófagos, usando fatores de transcrição da proteína de ligação CCAAT Enhancer (CeBP α) e CeBP β fornece um bom exemplo deste segundo mecanismo. Durante o desenvolvimento, a diferenciação de células β de progenitores hematopoiéticos é iniciada pelos fatores de transcrição e2A e células de fatores β precoces (eBF). Estes, por sua vez, induzem a expressão de célula β concomitante com fator PAX5, que posteriormente regula positivamente muitos genes específicos de células β . A ocorrência do macrófago, em contraste, é primeiramente induzido pelo CeBP α e CeBP β . No entanto, a ocorrência em ambos os tipos celulares, requer a transcrição do fator Pu1 (também conhecido como SPI1) (EGUIZABAL, 2013).

Acredita-se que CeBP α e CeBP β induzem transdiferenciação simultânea regulando

negativamente genes específicos de células β (Pax5), enquanto ao mesmo tempo coativando genes macrófagos específicos em rota de se tornar macrófago, as células β passam por uma fase intermediária não natural em que expressam baixos níveis de genes específicos de células β (Cd19) e genes macrófagos específicos (Mac1). Embora este processo não pareça envolver uma fase de desdiferenciação inicial, deve notar-se que a eliminação de Pax5 nas células B faz com que elas se desdiferenciem (SHEN, 2004; WEBER, CALVI, 2010).

Desdiferenciação

A desdiferenciação é associada a mecanismos naturais do corpo humano, ocorre quando uma célula diferenciada retorna a uma fase gênica menos diferenciada dentro da sua própria linhagem, este processo permite que a célula que sofreu desdiferenciação se prolifere antes de se diferenciar novamente, podendo substituir células que foram perdidas ou alteradas devido a patologias. A desdiferenciação também pode regredir ao ponto da célula mudar sua linhagem, pois a reprogramação tem o objetivo de induzir células diferenciadas a reverterem à pluripotência e, assim, podem se diferenciar em qualquer outro tipo celular, porém esse processo é bem mais complexo quando comparado a capacidade da transdiferenciação de troca de linhagem (JOPLING; BOUE; BELMONTE, 2011).

O blastômero, uma das primeiras células geradas no processo embrionário, foi considerado um exemplo de células progenitoras homogêneas por muitos anos, hipótese na qual propôs-se que células próximas às feridas abertas se desdiferenciassem a um estado de células tronco ou de multipotência, e se diferenciassem e proliferassem novamente para que ocorresse a regeneração de um membro perdido. Sabe-se que as células do blastema desdiferenciadas não mudam sua linhagem original, indicativo de que estas células não se rendem totalmente a pluripotência ou mantêm de alguma forma a memória celular de seu primeiro tecido de origem. Considera-se que a desdiferenciação esteja ligada intrinsecamente ao ciclo celular, porém após a desdiferenciação o retorno ao ciclo celular não mostra ser necessário (MACHADO, 2013).

O retinoblastoma (RB) é uma proteína supressora de tumor que possui papel indispensável ao permitir que as células retomem o ciclo celular e sua função ativa na manutenção de estado diferenciado de uma célula. A proteína RB impede a transcrição dos genes em sua forma não-fosforilada, mediada pelo fator de transcrição E2F, necessário para a replicação do DNA e iniciação da fase S. A supressão ocorre minimamente por três vias: de

início o RB induz nas histonas dos nucleossomos modificações através do recrutamento da histona deacetilase para o fator E2F. A deacetilação dessas histonas modifica a ligação do DNA e dos nucleossomos alterando a entrada ao aparato transcricional do DNA; Após esse processo o RB regula a estrutura do nucleossomo, captando complexos que dependem de ATP para agentes promotores como SWI/SNF; A terceira via atua sob a estrutura da cromatina, através do recrutamento de SUV39H1 metilase e HP1 para o gene promotor da ciclina E, causando metilação da histona H3 silenciando a ciclina E. O RB fosforilado é indispensável no controle de sua atividade repressiva e da ativação sequencial das ciclinas e podem ser necessárias também para a fosforilação do RB e ativação de genes dependentes de E2F (SWANTON, 2004; EZHEVSKY et al., 2001).

Drosophila melanogaster que de acordo com Nabais (2010), é um pequeno inseto díptero que mede cerca de 3 mm de comprimento, conhecido popularmente como “mosca das frutas” por ser encontrado muitas vezes cercando frutas em putrefação, possui um padrão preciso de diferenciação e proliferação em seu desenvolvimento ocular. *D. melanogaster* mutante tem formas inativas de ambos RB que mantém uma diferenciação neural normal, entretanto, ocorrem falhas celulares para manter o seu estado diferenciado, demonstrando uma proliferação irrestrita ao se desdiferenciarem a um estágio anterior à visualização ocular. Ao bloquear a proliferação, a desdiferenciação continua normalmente, mostrando que o ciclo celular e a desdiferenciação são ciclos distintos e que *RB* tem um papel fundamental na manutenção do estado diferenciado de uma célula (NICOLAY et al., 2010).

Nas células de Schwann a desdiferenciação também pode ser desacoplada da proliferação. A partir da remoção do AMP cíclico, as células de Schwann *in vitro* são desdiferenciadas sem proliferação subsequente, pois o AMPc está envolvido na mielinização das células de Schwann. Essas podem ser induzidas a diferenciar e desdiferenciar repetidamente ao adicionar ou ao remover o AMPc sem, necessariamente, entrar no ciclo celular (JOPLING et al., 2010).

Proliferação e desdiferenciação das células de Schwann

As células de Schwann possuem a capacidade de regeneração natural em mamíferos. Logo após associadas a danos neurais, células de Schwann se desdiferenciam e proliferam. A crista neural origina precursores de células de Schwann durante o desenvolvimento, essas células progridem para a formação de células de Schwann maduras não mielinizantes onde

precursores dessas células imaturas proliferam, para originar e maturar outras células de Schwann, mas quando essas células maturam perdem contato com o axônio elas se proliferam e reexpressam genes associados às células imaturas de Schwann e logo se desdiferenciam. O fator de transcrição Jun também é um componente muito importante, pois mostra regular a mielinização negativamente. Após o nervo ser lesionado, a expressão de Jun é aumentada de acordo com que as células de Schwann diferenciam-se, isso significa que se a transcrição Jun é inibida a desdiferenciação também é suprimida (BYDLOWSKI, 2009; DANI, 2016).

Principais fatores de transcrição

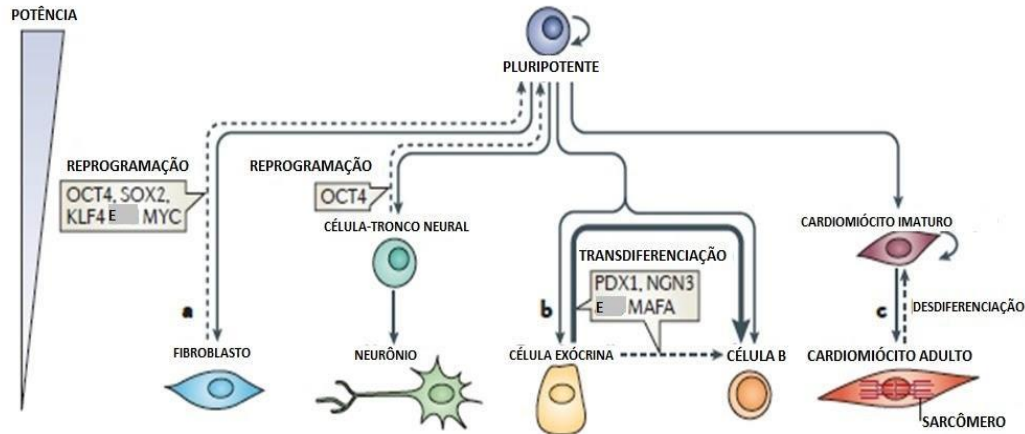
O estudo dos fatores de transcrições é indispensável para a compreensão de como uma célula tronco é convertida a uma célula especializada e o seu caminho inverso, de uma célula especializada a conversão de uma célula tronco imatura (MIRSKY, 2008).

A manutenção de uma célula pluripotente deve estar tão potencializada quanto a sua capacidade de variabilidade, partindo deste princípio os principais fatores de transcrição descritos são OCT4, SOX2 e nAnOG que podem e parecem estar organizados em um só processo. A manutenção e pluripotência contam com o papel essencial do OCT4 que possui a capacidade de ativar ou reprimir diversos genes. SOX2 é um antigo marcador de placa neural, que não se restringe apenas às células pluripotentes. Ele também necessita de um cofator, pois não se liga ao DNA sozinho e unido ao OCT4 forma heterodímeros. Uma das mais importantes funções do SOX2 é manter adequados os níveis de expressão do OCT4 necessários para a manutenção da pluripotência. Já nAnOG é expresso durante o desenvolvimento pelas células pluripotentes da massa celular interna (ICm) e, se for retirado de células que já obtiveram pluripotência estas se mantêm com várias características de células tronco mostrando que nAnOG tem maior função na obtenção da pluripotencialidade (LU; ZHANG, 2015).

Essas chaves reguladoras de pluripotência possuem a capacidade de não só reprimir e ativar a transcrição, mas também de controlar a expressão do ciclo celular e do gene regulando os microRNAs e os modificadores epigenéticos. Os três fatores de transcrição podem autoregular a transcrição por ligação dentro dos seus promotores. OCT4 e SOX 2 regulam a expressão de nAnOG diretamente, tornando-o fator não essencial para a transcrição necessária para regenerar as células tronco induzidas (Figura 5). Os três reprimem diversos genes associados com a diferenciação, assim como, ativam vários genes associados a

pluripotência (EGUIZABAL et al., 2013; NAKAZONE, 2007).

Figura 5: Chaves reguladoras de pluripotência em reprogramação, transdiferenciação e desdiferenciação.



Fonte: Adaptado de JOPLING; BOUE; BELMONTE (2011).

Células pluripotentes possuem a habilidade de se diferenciarem em qualquer linhagem, originando diversos tipos celulares. Reprogramação do fibroblasto regredindo a pluripotência é utilizado OCT4, fator 4 de Kruppel (K1F4), SOx2 e MYC. Células troncos neurais podem ser reprogramadas com eficiência utilizando apenas OCT4. Na transdiferenciação ocorre a mudança da linhagem criando outro tipo celular, como nas células pancreáticas exócrinas induzidas a transdiferenciarem em células β , expressando neurogenina (NGN3), fatores de transcrição do duodeno homeobox 1 e do pâncreas e MAFA. A desdiferenciação regride uma célula madura sem mudar sua linhagem, que na maioria das vezes, permite proliferar. No peixe zebra, os cardiomiócitos maduros desdiferenciam-se e proliferam-se durante a regeneração cardíaca (DANI, 2016).

Os fibroblastos podem ser reprogramados em pluripotência com os quatro fatores de transcrição SOX2, OCT4, myC60,76 e fator Kruppelike 4 (K1F4), sem restringir a nenhuma combinação que deva ser rigorosamente cumprida, pois podem ser reprogramados sem myC77, tornando-o viável a sua reprogramação mesmo com a ausência de alguns genes não essenciais. A reprogramação de células sanguíneas do cordão umbilical é outro tipo celular que pode ser reprogramado apenas com OCT4 e SOX2 (MONJE, 2010; MAKI et al, 2010).

As células de mais fácil acesso para reprogramação são células tronco neurais que

necessitam apenas de OCT4. O motivo de certos tipos celulares exigirem menos fatores de transcrição ainda não foi totalmente esclarecido, apesar de algumas células com baixa capacidade de diferenciação são efetivamente mais capazes de se tornarem pluripotentes, exigindo menos fatores exógenos. Outro parecer é o de alguns tipos celulares já expressarem de forma endógena alguns desses fatores, como o OCT4 que é essencial para a reprogramação, é induzido de forma endógena e fornecido exogenamente (SHEN, 2004; NAKAZONE, 2007). Alguns dos vários tipos de fatores de transcrição estão descritos no quadro 1 com a respectiva classe, funcionalidade em testes feitos em ratos em ambiente laboratorial e função *in vitro*. (CALDEIRA, 2017)

Quadro 1: Principais genes envolvidos na transdiferenciação e desdiferenciação.

Símbolo do Gene	Classe	Função <i>in vivo</i>	Fenótipo de nocaute em ratos
<i>Arf</i> (<i>Cdkn2a</i>)	Inibidor da proteína quinase.	Regulador negativo da proliferação;	Aumento da tumorigênese;
<i>Ascl1</i>	Fator de transcrição.	Especificação de linhagem neural;	Desenvolvimento prejudicado de vários centros cerebrais; Letalidade neonatal;
<i>Baf60c</i> (<i>Smarcd3</i>)	Modulador de cromatina.	Diferenciação neural;	Cardiogênese defeituosa e somitogênese;
<i>Bcl11b</i>	Fator de transcrição.	Desenvolvimento e sobrevivência dos timócitos fetais;	Mortalidade pré-natal e perinatal; Defeitos hematopoiéticos;
<i>Brn2</i> (<i>Pou3f2</i>)	Fator de transcrição.	Especificações neuroectoderme;	Letalidade perinatal;
<i>Cebpa</i>	Fator de transcrição.	Ampla alcance alvo;	Letalidade neonatal; Defeitos de múltiplos órgãos;

<i>Cebpb</i>	Fator de transcrição.	Resposta imune e inflamatória; Especificação de gordura marrom;	Hipoglicemia neonatal elevada e mortalidade;
<i>Fgf1</i>	Fator de crescimento	Angiogênese;	Normal;
<i>Gata4</i>	Fator de transcrição	Tubo do coração e formação de intestino oblíquo;	Letal; Defeitos ventrais;
<i>Klf4</i>	Fator de transcrição	Diferenciação de células epiteliais;	Morte perinatal devido a defeitos cutâneos;
<i>Lin28</i>	Fator de transcrição	Supressor da biogênese de microARN;	Desconhecido;
<i>Mafa</i>	Fator de transcrição	Ativador da expressão do gene da insulina;	Anormalidades em diabetes e ilhas pancreáticas;
<i>Mef2c</i>	Fator de transcrição	Controla a morfogênese cardíaca e Miogênese;	Morte pré-natal e anormalidades cardiovasculares
<i>Myc</i>	Fator de transcrição	Ação ampla sobre o ciclo celular e o crescimento;	Letalidade pré-natal e defeitos no crescimento.
<i>Myt1l</i>	Fator de transcrição	Fator de transcrição pan-neural com papéis na diferenciação neuronal;	Desconhecido;
<i>Nanog</i>	Fator de transcrição	Impede pluripotência em células estaminais embrionárias e evita a sua diferenciação	Primeira morte embrionária;
<i>NGN3</i>	Fator de transcrição	Neurogênese e especificação das células endócrinas	Deficiência de células endócrinas e células produtoras de

		pancreáticas	insulina; Diabetes pós-natal
<i>p38 mapk</i> (<i>Mapk14</i>)	Proteína quinase	Inflamação e resposta ao estresse	Embrionário para perinatal letal com defeitos multi-sistema
<i>PDX1</i>	Fator de transcrição	Especifica o epitélio pancreático precoce	Mortalidade pós-natal e desenvolvimento anormal do pâncreas e do fígado
<i>OCT4</i>	Fator de transcrição	Crucial para embriogênese precoce e para pluripotência de células-tronco embrionárias	Letalidade da implantação peri; Falha no desenvolvimento da massa celular interna
<i>Pu.1</i> (<i>Spi1</i>)	Fator de transcrição	Potenciador específico de linfóides	Mortalidade pós-natal e defeitos hematopoiéticos
<i>Rb1</i>	Fator de transcrição e modulador de cromatina	Regulador chave da entrada na divisão celular	Mortalidade pré-natal e defeitos neuronais e hematopoiéticos
<i>Tbx5</i>	Fator de transcrição	Diferenciação de Mesoderma	Mortalidade pré-natal e efeitos cardiovasculares

Fonte: Adaptado de JOPLING; BOUE; BELMONTE (2011).

Transdiferenciação e desdiferenciação

Os três processos podem induzir células terminalmente diferenciadas a se tornarem altamente plásticas. Porém, alguns dos mecanismos envolvidos na desdiferenciação e transdiferenciação foram elucidados, mas ainda, pouco se sabe a respeito do que ocorre durante a reprogramação. Alguns dos processos envolvidos na desdiferenciação ou transdiferenciação também se aplicam à reprogramação, como a aplicação de fatores de transcrição para regeneração de membros perdidos e, também, pode ser feito *in vitro* ou *in*

vivo (SOUZA, 2006).

Desdiferenciação X Reprogramação

Desdiferenciação e reprogramação são muito semelhantes pois, ambos induzem uma célula diferenciada a regredir. A reprogramação é a forma final de desdiferenciação, à medida que as células regredem a um estado pluripotente. A regressão de uma célula diferenciada é a principal semelhança entre esses dois processos (EGUIZABAL, 2013).

Para uma célula se desdiferenciar, ela precisa ser "desbloqueada" do seu *status* terminalmente diferenciado antes que ela possa regredir ou entrar no ciclo celular. Durante a reprogramação, ocorre um evento inicial desconhecido que permite que os fatores exógenos induzam a pluripotência. Embora este evento desconhecido tenha sido ligado à proliferação, muitas células também precisam se desdiferenciar para entrar no ciclo celular. Isto poderia permitir que os fatores de transcrição, tais como, OCT4 e SOX2 acessassem à cromatina previamente restrita e subsequentemente sequestrassem o processo natural e empurrassem de volta as células ainda mais. Em apoio à esta noção, as células B maduras necessitam serem desdiferenciadas com CeBP α ou PAX5 antes de poderem ser reprogramadas (LU; ZHANG, 2015).

Uma grande diferença entre esses processos são os estágios intermediários naturais definidos que estão associados com a desdiferenciação no que parece ser uma inversão do desenvolvimento da diferenciação. Nenhum desses intermediários naturais definidos até agora foram identificados durante o processo de reprogramação, tornando improvável que uma reversão similar tenha sido instigada (SOUZA, 2006).

Transdiferenciação X Reprogramação

Desdiferenciação e transdiferenciação compartilham muitas semelhanças. De fato, um dos modelos de transdiferenciação requer uma etapa inicial de desdiferenciação. Levando em conta a diferenciação das células iPS em linhagens específicas, a reprogramação parece exteriormente similar à transdiferenciação natural, com uma etapa de desdiferenciação que reverte a célula até a pluripotência antes de se rediferenciar em uma nova linhagem (KIM, 2010; MAKI et al, 2010).

A transdiferenciação entre células estritamente relacionadas tais como células β e macrófagos ou células α e células β 42,51, foram propostas para regular negativamente ou

positivamente células transdiferenciadas, levando a um fenótipo intermediário não natural. Os intermediários não naturais também podem surgir através da reprogramação quando as células expressam genes que especificam a linhagem e pluripotência. Embora isto pareça semelhante aos intermediários não naturais observados durante a transdiferenciação de células a macrófagos e células α a células β , os intermediários de transdiferenciação não são estáveis e, provavelmente, refletem a rapidez com que este processo ocorre, com os restos de um programa genético, sob a forma de RNAm e proteína, ainda persistente se espalha como um novo programa. Também deve ser enfatizado que a transdiferenciação ocorre entre linhagens distintas, resultando na formação de uma célula diferenciada e não, como na reprogramação, uma célula pluripotente. Parece, então, que é muito cedo para dizer se a reprogramação e a transdiferenciação compartilham qualquer base comum (POSS, 2010; KONDOH, KAMACHI, 2010).

Aplicabilidade

Desdiferenciação, transdiferenciação e reprogramação poderiam ser todos utilizados para fins terapêuticos na medicina regenerativa. Ser capaz de gerar novas células *in vivo* contorna a necessidade de transplante de células e, assim, nega muitos dos problemas associados a este procedimento. No entanto, a reprogramação oferece a oportunidade de modificar geneticamente as células. Isto abre uma ampla gama de possibilidades, tais como, corrigir mutações indutoras de doenças, tais comparações são feitas no quadro 2. As populações de células iPS clonais geneticamente modificadas sejam geradas *in vitro*, assegurando que apenas células corretamente modificadas sejam selecionadas para utilização subsequente. Além disso, essas populações também podem ser expandidas, o que é especialmente pertinente se o objetivo é substituir células perdidas por danos ou doenças (SLEEP, 2010; ALVARADO, 2006).

Quadro 2: Principais parâmetros da transdiferenciação, desdiferenciação e da reprogramação gênica.

TRANSDIFERENCIAÇÃO	DESDIFERENCIAÇÃO	REPROGRAMAÇÃO
- Ocorre em células de linhagens distintas;	- Ocorre em células da mesma linhagem;	-Ocorre em células pluripotentes;
- Pode ser feito a partir de qualquer	- Capacidade de proliferação	- Pode fazer com que uma

<p>célula pluripotente do corpo;</p> <ul style="list-style-type: none"> - Mudança/troca da linhagem celular; - Procedimento minimamente invasivo; - Otimização da linhagem celular; - Amplo potencial de diferenciação; - Processo rápido; 	<p>celular;</p> <ul style="list-style-type: none"> - Substituir células que foram perdidas ou alteradas devido a patologias; - Regeneração de um membro perdido; - Células não se rendem totalmente a pluripotência; 	<p>célula oncogênica retorne a uma fase gênica menos diferenciada e alterar a mutação;</p> <ul style="list-style-type: none"> -Induzir células diferenciadas a reverterem à pluripotência e assim se diferenciarem em qualquer outro tipo celular; - Potencial de diferenciar em qualquer outro tipo de célula;
---	---	---

Fonte: CALDEIRA (2017).

Embora os três processos possam induzir mudanças significativas em células diferenciadas, cada um tem certas vantagens em termos de medicina regenerativa. Se o objetivo for substituir as células perdidas em consequência de doenças ou danos isto poderia ser conseguido por meio da reprogramação de células retiradas do paciente *in vitro* e depois diferenciando-as para o tipo de célula correto, seguido de volta por enxerto no paciente. Uma abordagem mais simples *in vivo* seria induzir as células à desdiferenciação e, depois, proliferar ou induzir um tipo de célula mais abundante ou menos especializado para se transdiferenciar em tipos de células desejados. Se, no entanto, o objetivo é corrigir uma mutação genética indutora de doença, tentar transdiferenciar ou desdiferenciar qualquer das células do doente não aliviaria o problema, uma vez que, as novas células continuariam a conter a mutação. Neste caso, a única opção viável seria reprogramar as células do paciente *in vitro*, depois, corrigir o gene danificado antes de diferenciar as células para a linhagem correta e devolvê-los de volta para o paciente (VRIES, 2008).

Considerações finais

Ainda é necessária muita pesquisa, trabalho e investimento para a utilização segura e

promissora da terapia celular, apesar das pesquisas promissoras com células tronco adultas. As explicações e existência dos mecanismos de transdiferenciação e desdiferenciação, seus resultados efetivos são pouco conhecidos, àqueles que direcionam células para uma determinada linhagem além dos fatores de transcrição, a melhor via de integração de transplante de células, diferenciação e proliferação destas células *in vivo* e *in vitro*.

A padronização de procedimentos eficientes de isolamento, metodologias, técnica de cultivo de células tronco adultas garantindo assim a quantidade e qualidade para a aplicação terapêutica, é necessária e indispensável, por ser um processo complexo. O conhecimento e utilização dos fatores descritos pode auxiliar a desenvolver de protocolos seguros para terapia celular.

O investimento em pesquisas em transdiferenciação e desdiferenciação celular, não trarão benefícios voltados apenas ao desenvolvimento da ação terapêutica mas também para o desenvolvimento embrionário, mecanismos por trás da diferenciação celular, tratamentos oncológicos e preservação celular auxiliando no mecanismo de envelhecimento podendo melhorar consideravelmente a qualidade de vida humana.

Referências Bibliográficas

ALVARADO, A. S. Planarian Regeneration: Its End Is Its Beginning. **Cell**, Utah, v.124, p. 241-245, Jan. 2006.

BARCELOS, L. P. Análise Proteômica das diversas fases de diferenciação osteoblástica de células tronco mesenquimais de medula óssea. **Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos**, Ribeirão Preto, v 1, p.1-145, Dez. 2010.

BYDLOWSKI, S. P. et al. Características biológicas das células-tronco mesenquimais. **Revista brasileira de hematologia e hemoterapia**, São Paulo, v. 1, p. 25-35, Jan. 2009.

CENTRE FOR GENOMIC REGULATION, **Cell transformation from one type of cell to another**. Disponível em: <<http://www.crg.eu/en/content/research/scientific-publications>>. Acesso em: 20 de Out. de 2016.

DANI, S. U. Vetores para terapia gênica. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Minas Gerais, v.1, p. 28-33, Jan. 2016.

DEL CARLO, R. Células tronco e fatores de crescimento na reparação tecidual. **Ciência Veterinária**, Recife, v. 11, n. 1, p. 39-49, Abr. 2011.

EGUIZABAL, C. et al. Dedifferentiation, transdifferentiation and reprogramming: Future Directions in Regenerative Medicine. **Semin Reprod Med**, New York, v. 31, p. 82-94, Dez. 2013.

EISENSTEIN, M. A simpler twist of fate. **Nature**, London, v. 534, n. 7607, p. 421-423, Jun. 2016.

EMERICK, C. Novas tecnologias na genética humana. **Avanços e impactos para a saúde**, Rio de Janeiro, v. 1, n. 1, p. 60, mar. 2007.

IPCT, **Instituto de Pesquisa com Células tronco**. Disponível em: <<http://celulastroncors.org.br/celulas-tronco-2/>>. Acesso em: 1 de setembro de 2016.

JAMES, B. Researchers discover cell differentiation mechanism. **News medical life sciences**, Washington, v.2, n. 242, p. 75-76, out. 2011.

JOPLING, C.; BOUE, S.; BELMONTE, J. C. I. Dedifferentiation, Transdifferentiation and reprogramming: three routes to regeneration. **Nature reviews**, California, v. 12, p. 79-89, Fev. 2011.

JOPLING, C. et al. Zebrafish heart regeneration occurs by cardiomyocyte dedifferentiation and proliferation. **Nature**, Londres, v.464, p. 606–609, Mar. 2010.

JUNQUEIRA, A. *Biologia Celular e Molecular*, Edição 9, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012. Capítulo 11, pag. 233-244.

KIKUCHI, K. et al. Primary contribution to zebrafish heart regeneration by gata4+ cardiomyocytes. **Nature**, Londres, v. 464, p. 601–605, Mar. 2010.

KIM, K. et al. Epigenetic memory in induced pluripotent stem cells. **Nature**, Londres, v. 467, p. 285–290, Abr. 2010.

KONDOH, H.; KAMACHI, Y. SOX-partner code for cell specification: regulatory target selection and underlying molecular mechanisms. **The International Journal of Biochemistry and Cell Biology**. Boston, v.42, p. 391–399, Set. 2010.

LU, F.; ZHANG, Y. Cell totipotency: molecular features, induction, and maintenance. **Natl Sci Rev**, Boston, v.2, p. 217-225, Jun. 2015.

MACHADO, R. S. R. Analysis of the transcriptional regulatory network: underlying heart development. **Unidades de Investigação, Desenvolvimento e Outas**, v. 1, p.1-95, Dez. 2013.

MALLANNA, S. K.; RIZZINO, A. Emerging roles of microRNA in the control of embryonic stem cells and the generation of induced pluripotent stem cells. **Developmental Biology**, v. 344, p. 16-25, Dez. 2010.

MAKI, N. et al. Expression profiles during dedifferentiation in newt lens regeneration revealed by expressed sequence tags. **Molecular Vision**, New York, v. 16, p. 72-78, Nov, 2010.

MONJE, P. V.; SOTO, J.; BACALLAO, K.; WOOD, P. M. Schwann cell dedifferentiation is independent of mitogenic signaling and uncoupled to proliferation: role of cAMP and JNK in the maintenance of the differentiated state. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, p. 31024–31036, Jul. 2010.

MIRSKY, R. et al. Novel signals controlling embryonic Schwann cell development, myelination and dedifferentiation. **Journal of the Peripheral Nervous System**, v. 13, p. 122–135, Jun. 2008.

NABAIS, J. R. Localização de mRNA em *Drosophila melanogaster*: estudo da proteína Ypsilon Schachtel. **Universidade Nova de Lisboa**, Lisboa, p. 1-84, Dez. 2010.

NAKAZONE, S. Regeneração cardíaca. **Notas de Literatura**, São Paulo, v. 9, p. 24-25, Abr. 2007.

NYCOLAY, B. N.; BAYARMAGNAI, B.; MOON, N. S.; BENEVOLENSKAYA, E. V.; FROLOV, M. V. Combined inactivation of pRB and Hippo pathways induces

dedifferentiation in the *Drosophila* retina. **PLoS Genetic**, California, v. 6, p. 918, Abr. 2010.

OLIVEIRA, I. S.; FERNANDES, T. R. L. Terapia celular utilizando células tronco adultas. **SaBios: Revista de Saúde e Biologia**, Paraná, v.11. n. 2, p. 84-94, Ago. 2016.

POSS, K. D. Advances in understanding tissue regenerative capacity and mechanisms in animals. **Nature**, Londres, v. 11, p. 710–722 Dez. 2010.

ROTHER, E. Revisão sistemática x revisão narrativa. **Acta Paulista de Enfermagem**, São Paulo, v. 20, n. 2, p. v-vi, Jun. 2007.

SCHWINDT, T.; BARNABÉ G.; MELLO, L. Proliferar ou diferenciar? Perspectiva de destino das células tronco. **Jornal brasileiro de neurociência**, São Paulo, v.1, p. 13-19, Dez. 2005.

SHEN, C. N.; BURKE, Z. D.; TOSH, D. Transdifferentiation, Metaplasia and Tissue Regeneration. **Landes Bioscience**, Londres, v.1, p. 36-44, Dez. 2004.

SLEEP, E. et al. Transcriptomics approach to investigate zebrafish heart regeneration. **Cardiovascular Medicine**, v. 11, p. 369–380, Dez. 2010.

SOUZA, L. T. A persistência dos cânceres e as células tronco tumorais. **Revista Associação Brasileira de Medicina**, Rio de Janeiro, v. 52, p. 88-379, Dez. 2006.

SWANTON, C. Cell-cycle targeted therapies. **The Lancet Oncology**, Washington, v.5, p. 27-36, Jan. 2004.

TAKAHASHI, K. et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. **Cell**, v. 131, p. 1– 12. Nov. 2007.

TANAKA, E. M.; REDDIEN, P. W. The cellular basis for animal regeneration. **Developmental cell**, Washington, v. 21, n. 1, p. 172-185, Jan. 2011.

VRIES, W. N. et al. Reprogramming and differentiation in mammals: motifs and mechanisms. **Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology**, v. 73, p. 33–38, Mar. 2008.

WEBER, J. M.; CALVI, L. M. Notch signaling and the bone marrow hematopoietic stem cell niche. **Bone**, v. 46, p. 281-285, Set. 2010.

YANG, N. et al. Induced Neuronal Cells: How to Make and Define a Neuron. **Cell Stem Cell**, New Brunswick v. 9, p. 517-525, Dez. 2011.