

Estratégias de regeneração em anfíbios urodelos

Andréia Carvalho dos Santos¹

Daniel Abensur Athanazio²

Resumo

Na era das células-tronco, é interessante observar que a natureza resolveu o problema da regeneração com estratégias diferentes da restauração de tecidos por células indiferenciadas. Anfíbios urodelos são únicos, entre vertebrados, que têm a capacidade de regenerar córnea, retina, mandíbula, membros e secções do coração. A proliferação de células especializadas, transdiferenciação e desdiferenciação são importantes estratégias da regeneração de tritões e salamandras. De modo importante, algumas vias sinalizadoras estão conservadas em mamíferos, incluindo os seres humanos, e o potencial papel do conhecimento sobre a regeneração de urodelos no contexto de mamíferos é discutido nesta revisão.

Palavras-chave: regeneração, urodelos, anfíbios, transdiferenciação, reparo.

INTRODUÇÃO

O reparo de tecidos que sofrem lesão aguda ou crônica é um processo que utiliza duas estratégias gerais: a regeneração e a substituição. A regeneração ocorre quando a área de lesão é repostada pela proliferação das células parenquimatosas funcionais do tecido original. A substituição ocorre quando as células perdidas não exibem potencial regenerativo após diferenciação terminal, ou quando a perda do arcabouço estromal impede que toda área de lesão seja repostada por células parenquimatosas. Exemplos de reparo de substituição são os agregados de células gliais (astrócitos) em zonas de morte neuronal e a formação de tecido fibroso (cicatriz fibrosa) como resultado de um amplo espectro de doenças agudas e crônicas em diversos tecidos.¹

Uma área promissora da pesquisa biomédica é o uso de células-tronco em medi-

cina regenerativa. Células-tronco são capazes de manter uma população em crescimento e diferenciar-se em tipos celulares diversos. Em mamíferos adultos, essas células podem constituir uma “reserva” em tecidos como pele e glândulas intestinais, possibilitando a renovação contínua e a regeneração após lesão. Em humanos, alguns tecidos que não regeneram grandes áreas de lesão possuem precursores com capacidade de formar células funcionais, como recentemente foi demonstrado pelo surgimento de novos neurônios e cardiomiócitos nas bordas de áreas de isquemia do tecido cerebral e cardíaco, respectivamente.^{2, 3}

A plasticidade de células-tronco embrionárias e hematopoéticas para diferenciação em diversos tipos celulares oferece racional para o uso clínico e apresenta resultados promissores. No entanto, os resultados de curto prazo dessas

¹ Acadêmica de Ciências Biológicas. Instituto de Ciências Biológicas. Universidade Católica de Salvador – UCSAL. Salvador - BA

² Professor Mestre. Departamento de Biointeração – Setor de Patologia Geral. Instituto de Ciências da Saúde. Universidade Federal da Bahia – UFBA. Salvador - BA

Correspondência para / Correspondence to:

Daniel Abensur Athanazio

Departamento de Biointeração - Instituto de Ciências da Saúde

Universidade Federal da Bahia - UFBA

Av. Reitor Miguel Calmon, s/nº - Campus do Canela

40.110-100. Salvador- BA -Brasil

Tel: (71) 3235-0937

E-mail: dathanazio@cpqgm.fiocruz.br

estratégias não devem desestimular outras abordagens de regeneração dos tecidos. Regeneração a partir de células-tronco representa a restituição de tecidos a partir de precursores indiferenciados; entretanto, é interessante notar que a natureza resolveu o problema da regeneração de grandes secções do plano corporal com outra estratégia: a desdiferenciação e reprogramação de tecidos especializados. Entre vertebrados, apenas anfíbios urodelos (axolote, tritões e salamandras) compartilham a fascinante capacidade de regenerar membros inteiros, córnea, retina, mandíbula e pequenas secções do coração. Na presente revisão, apresentaremos conceitos e mecanismos envolvidos no reparo de anfíbios urodelos, ressaltando potenciais implicações para a regeneração em mamíferos.

REVISÃO DE LITERATURA E DISCUSSÃO

Anfíbios urodelos e a regeneração na evolução de metazoários

É interessante observar que a capacidade de regenerar grandes secções do plano corporal não é uma exceção entre metazoários (animais). Dentre os cerca de trinta e cinco filos, apenas seis não têm membros com essa habilidade. Em vários grupos de invertebrados, a habilidade regenerativa está associada à reprodução assexuada. Mesmo entre grupos que compartilham grande potencial regenerativo, é importante notar que há grande variação nessa capacidade, mesmo entre espécies filogeneticamente próximas. Isso sugere que a habilidade regenerativa não é uma aquisição evolutiva que surge em múltiplos momentos da evolução animal. A regeneração, portanto, provavelmente é uma habilidade primordial de metazoários, que foi reprimida em alguns contextos.⁴

A capacidade regenerativa de invertebrados pode ser surpreendente. As planárias, platelmintos de vida livre, com sistema nervoso central rudimentar, são capazes de gerar dois organismos completos e independentes após uma secção transversal que as separa em segmentos cranial e caudal. Nesse caso, a regeneração é inclusive um modo de reprodu-

ção, visto que uma nova planária pode ser gerada a partir de fragmentos que representam 0,4 % de um organismo adulto.⁵ Tais observações, por séculos, despertam questões sobre quais são, afinal, as bases da identidade individual, um tema atual da pesquisa em clonagem de células humanas. Em vertebrados, exemplos excepcionais de regeneração (do ponto de vista de um humano) são escassos, embora suficientes para estimular a indagação: se eles podem, por que não podemos?⁶ O peixe zebra é capaz de regenerar pequenas secções do tecido cardíaco e a medula espinhal (FIGURA 1A). Entre anfíbios, sapos (ordem *Anura*) como os do gênero *Xenopus* sp. são capazes de regenerar completamente amputações de seus membros em desenvolvimento, enquanto tal habilidade é perdida assim que o órgão está completamente formado⁷(FIGURA 1B). Apenas os membros da ordem *Urodela* ou *Caudata* (tritões e salamandras) apresentam, quando adultos, a capacidade de regenerar completamente olhos, membros e tecido cardíaco.⁴ No entanto, essa habilidade é variável entre diferentes membros: a axolote (FIGURA 1C) é capaz de regenerar a cauda e os membros, mas não compartilha com tritões (FIGURA 1D) a capacidade de regenerar a córnea.⁸ Fetos mamíferos são capazes de regenerar a falange distal dos dedos durante o desenvolvimento, mas essa capacidade é perdida ainda dentro da vida intra-uterina.^{9, 10}

As estratégias regenerativas de anfíbios urodelos

Três modelos experimentais são frequentemente aplicados no estudo da capacidade regenerativa de urodelos: a regeneração do tecido cardíaco, da córnea e de membros amputados.

Após uma secção apical do ventrículo cardíaco de um tritão, um coágulo é formado, e a contração muscular em torno dele fecha a área lesionada. Cardiomiócitos proliferam na borda do coágulo, onde até 10% de todas as células especializadas reentram no ciclo celular.¹¹ Em contraste, a síntese de DNA numa pequena parcela de cardiomiócitos pode ser documentada em modelos experimentais de lesão cardíaca em mamíferos, mas não está claro se essas célu-

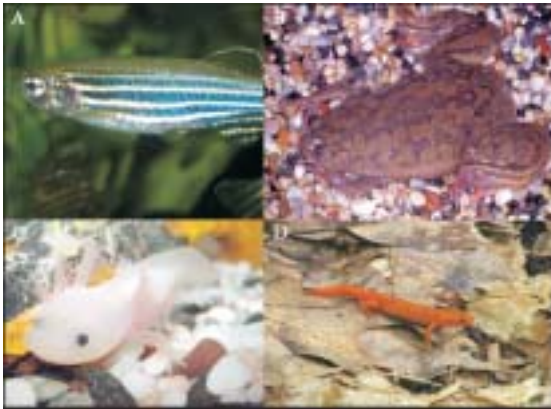


Figura 1 - Exemplos de vertebrados com potencial de regenerativo excepcional em comparação com mamíferos.

Notas: - A- Peixe zebra (*Brachydanio rerio*); B- Sapo do gênero *Xenopus* sp; C- Axolote (*Ambystoma mexicanum*); D- Tritão americano ou salamandra de pinta vermelha (*Notophthalmus viridescens*)

- Imagens autorizadas para reprodução disponíveis em < <http://en.wikipedia.org> > (Imagens A-D); a imagem B é uma cortesia do U.S. Geological Survey (<http://www.usgs.gov>).

las sobrevivem e restauram uma população funcional.¹² Na borda de infartos agudos de miocárdios humanos, uma população restrita de células indiferenciadas (40.000 por mm³) pode ser identificada, em que até 28% estão no ciclo celular.³ Em termos práticos, os tritões refazem a área seccionada com tecido muscular contráctil, enquanto o coração humano é substituído por uma cicatriz fibrosa. É impressionante a observação de que cardiomiócitos de urodelos, quando dissociados e colocados em cultura, permanecem contraindo e, sob estímulo, são capazes de proliferar e retornar à contração logo após o fim da divisão celular. Esse, portanto, é um exemplo de regeneração por proliferação de células que preservam sua diferenciação original (FIGURA 2A). Alguns exemplos de processos semelhantes ocorrem em mamíferos: hepatócitos são capazes de proliferar sem perda de diferenciação; e células de Schwann podem proliferar durante a regeneração de um axônio. No entanto, esse processo passa pela perda de expressão de marcadores de diferenciação como mielina. Como será discutido adiante, a regeneração de células da bainha nervosa é o exemplo mais próximo do processo de desdiferenciação, uma outra estratégia

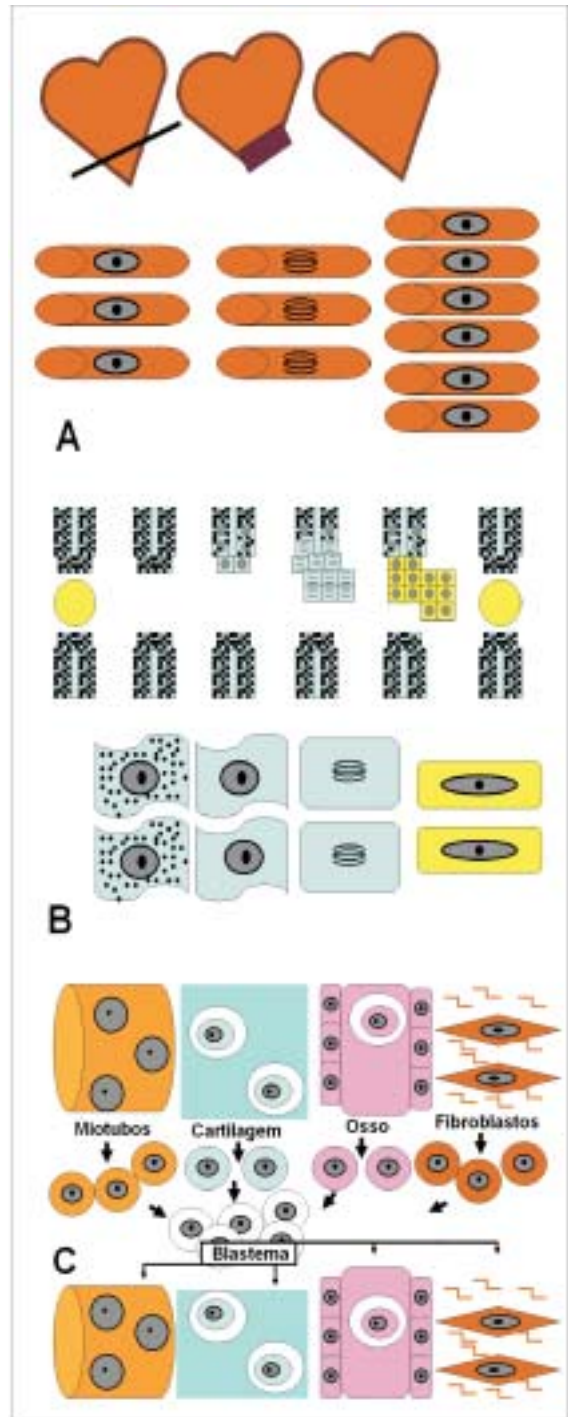


Figura 2 - Desenho esquemático das três estratégias principais de regeneração em anfíbios urodelos.

Nota: A- Proliferação de células que mantêm sua diferenciação original; cardiomiócitos proliferam e seguem em contração, logo após a divisão celular, após uma secção apical do coração; B - Transdiferenciação: células da margem dorsal da íris perdem grânulos de pigmento e diferenciam-se em células da córnea; C- Desdiferenciação e reprogramação: diversos tecidos conjuntivos e músculo estriado dão origem a um Blastema, que é capaz de refazer todos os tecidos de um membro amputado.

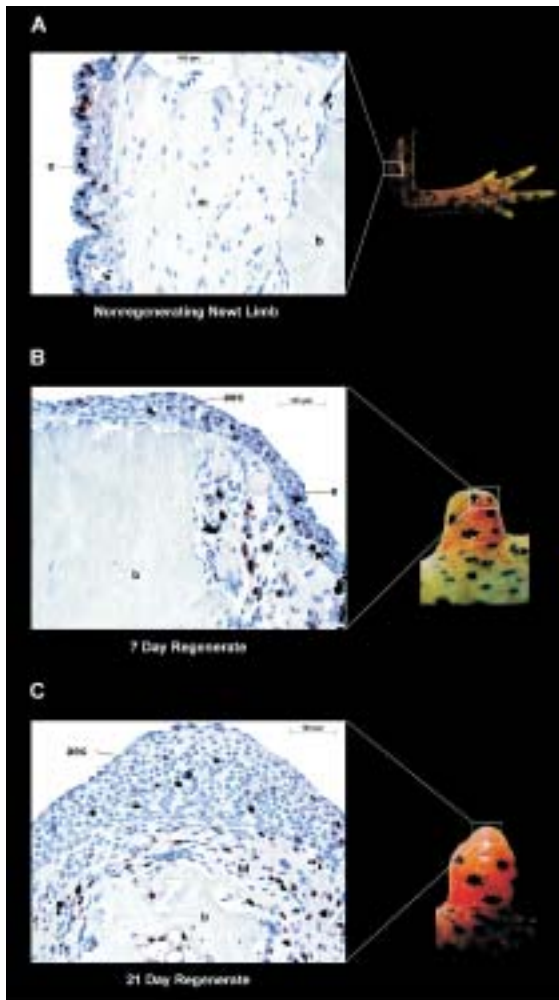


Figura 3 - Resumo dos eventos celulares envolvidos na fase inicial da regeneração de membros das salamandras.

Notas: - A - O membro não amputado apresenta a organização habitual de epitélio (e), derme (d), músculo (m) e osso (b); a coloração marrom marca a incorporação de 5-Bromo-2'-Deoxiuridina

(BrdU) e demonstra que apenas células na epiderme estão em divisão celular, mantendo renovação do epitélio; B - A superfície distal da amputação, após 7 dias, exibe uma camada reepitelizada, constituída por uma camada espessa de células epiteliais denominada capa epitelial apical (aec); células em síntese de DNA podem ser observadas no estroma abaixo da epiderme; C - Após 21 dias, o osso subjacente é progressivamente substituído pelo blastema (bl), que apresenta numerosas células em divisão.

- Imagem com reprodução autorizada e disponível em: <http://biology.plosjournals.org/archive/1545-7885/2/8/pdf/10.1371_journal.pbio.0020232-L.pdf>¹⁷.

regenerativa de urodelos.⁴ De modo semelhante, um relato recente demonstra que as células b pancreáticas são renovadas e regeneram a partir de células diferenciadas pré-existentis, sem

participação de células-tronco nesse processo, no modelo murino.¹³ Dessa forma, apesar de o uso de células-tronco representar um promissor campo de investigação em diversas doenças humanas, incluindo a diabetes, é importante notar que a via natural de restauração de tecidos envolve outros mecanismos, mesmo em mamíferos.

Após a remoção da córnea de um tritão, células pigmentadas da margem dorsal da íris proliferam e perdem os grânulos pigmentados, proliferam e assumem a diferenciação de células da córnea.¹⁴ Esse é um exemplo clássico do conceito de **transdiferenciação** a transformação de uma célula diferenciada numa célula com outra diferenciação terminal (FIGURA 2B). É interessante notar que essa capacidade de transdiferenciação *in vitro* é compartilhada por um amplo espectro de espécies de vertebrados estudados, incluindo o homem, mas apenas alguns peixes e urodelos são capazes de reproduzir esse processo *in vivo*.¹⁵ Novamente, mamíferos apresentam situações semelhantes, tais como a conversão de células pancreáticas exócrinas em hepatócitos, na deficiência de cobre, embora exemplos de transdiferenciação estejam aparentemente restritos ao desenvolvimento e condições patológicas no adulto.¹⁶

O exemplo mais impressionante, no entanto, é a regeneração de um membro amputado. Nesse caso, a ferida é rapidamente reepitelizada, e os tecidos abaixo da área de amputação perdem a sua diferenciação original reentrando no ciclo celular. Músculo estriado, osso, cartilagem, bainha nervosa, tecido fibroso e outros tecidos conjuntivos são convertidos num blastema regenerativo.¹⁷ O termo **blastema** refere-se a uma massa de células indiferenciadas, com capacidade de diferenciar-se num órgão. Nesse caso, urodelos apresentam a estratégia de **desdiferenciação**, desconhecida como mecanismo de reparo em mamíferos, excetuando-se as células de Schwann (FIGURA 2C). Os eventos celulares da fase inicial da regeneração de membros da salamandra estão ilustrados na Figura 3. Convém ressaltar que neoplasias malignas são freqüentemente reconhecidas como tecidos “desdiferenciados”, mas essa é uma visão equivocada, visto que neoplasias derivam de célu-

las-tronco (células indiferenciadas) dos tecidos e não de células já diferenciadas.

Regeneração muscular – algumas etapas da via de regeneração estão conservadas em mamíferos

Duas estruturas musculares esqueléticas de urodelos são usadas na pesquisa de habilidade regenerativa: miotubos e miofibras. Miotubos são estruturas multinucleadas que derivam da fusão de mioblastos e apresentam alguns marcadores de diferenciação muscular, enquanto miofibras (ou fibra muscular especializada) representa uma longa fibra muscular com diferenciação terminal. A diferenciação de miotubos está relacionada à formação de sincícios multicelulares e à saída do ciclo celular. A implantação de miotubos marcados no blastema regenerativo demonstra que muitos deles dividem-se em células mononucleares, num processo denominado **celularização**.¹⁸ Além disso, núcleos de miotubos entram na fase S (de duplicação do material genético).¹⁹ Dessa forma, tanto a multinucleação quando a estabilidade da fase G0 (fora do ciclo celular), dois aspectos fundamentais da diferenciação miogênica, são revertidos pelo microambiente do blastema regenerativo.

Apenas miotubos de urodelos são capazes de entrar na fase S *in vitro* após estímulos como soro. Entre mamíferos, somente miotubos de camundongos deficientes para as duas cópias do gene do retinoblastoma (**Rb**) são capazes de migrar da fase G1 para S, após estimulação com soro. A proteína Rb tem função crucial como um regulador negativo do ciclo celular e promove expressão de genes sob controle do fator de transcrição MEF-2 (**myocyte enhancer factor 2**), induzindo diferenciação muscular.²⁰ É sabido que o gene **Rb** é fundamental no controle do crescimento e da diferenciação celular de diversos tecidos de mamíferos, e também cresce o interesse de sua via no processo de reprogramação de células em regeneração de urodelos (FIGURA 4A).

Outro grupo de genes importantes para regeneração de urodelos são os **genes homeobox**, que compartilham **seqüências homeobox** de cerca de 180 pares de bases. Essas seqüências codifi-

cam domínios protéicos com ação de fatores transcricionais que interferem na morfogênese de animais, plantas e fungos. O gene homeobox **Msx-1** é um repressor da diferenciação muscular que aumenta sua expressão durante o processo de celularização de miotubos de urodelos *in vitro*. Além disso, estudos em miofibras de larvas de salamandra demonstram o aumento da expressão do gene durante a celularização, enquanto a administração de seqüências inibitórias de RNA antisense mantém a diferenciação muscular.²¹ Miotubos murinos *in vitro*, sob expressão induzida do gene **Msx-1**, sofrem celularização, perdem marcadores de diferenciação muscular, proliferam e são capazes de diferenciar-se em linhagens miogênica, osteogênica, condrogênica e adipogênica sob estímulo apropriado.²² Fetos de camundongos são capazes de regenerar a falange distal de um dedo amputado, mas essa habilidade é perdida em animais deficientes para o gene **Msx-1**. Tal defeito foi creditado à perda da via da proteína morfogenética óssea BMP4 (**bone morphogenetic protein 4**), visto que a administração exógena desse fator recupera habilidade regenerativa de animais sem o gene **Msx-1**.²³

Uma interessante observação baseia-se nos experimentos com heterocárions, miotubos híbridos que contêm núcleos derivados de tritões e camundongos. Estímulos para proliferação de miotubos de urodelos resultam também na entrada na fase S dos núcleos murinos. Uma explicação para o achado é que mamíferos perderam a capacidade de reconhecer a sinalização extracelular envolvida na regeneração muscular; entretanto, as vias intracelulares que desencadeiam esse processo estão conservadas. No entanto, a determinação “daquilo que falta” não é clara, visto que extratos protéicos de blastemas regenerativos de tritão são capazes de induzir celularização de miotubos murinos em cultura, um achado que sugere que alguma sinalização extracelular está preservada em mamíferos.²⁴

Algumas estratégias farmacológicas para desdiferenciação foram aplicadas no modelo de miotubos murinos. Uma triagem numa biblioteca química de derivados da purina identificou a mioseverina como agente capaz de indu-

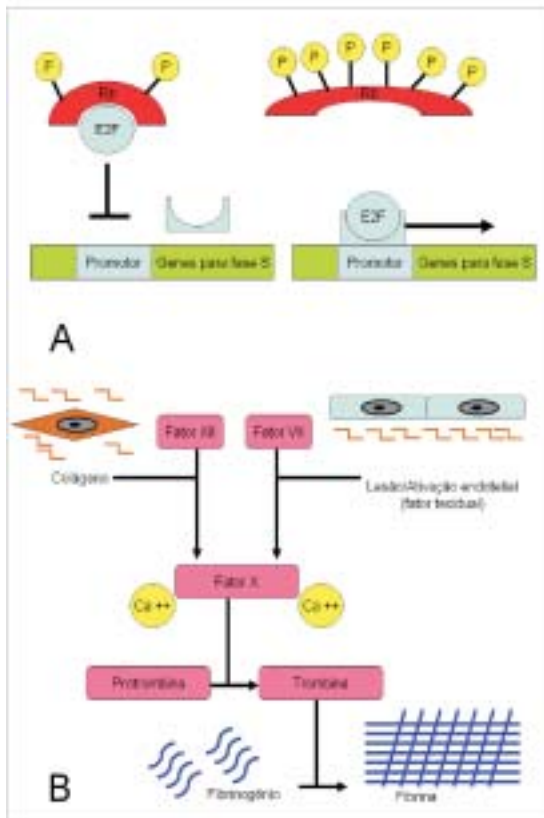


Figura 4 - Vias de sinalização intra e extracelular são conservadas na regeneração de urodelos em mamíferos.

Nota: A - O produto do gene do retinoblastoma (proteína Rb), na forma hipofosforilada, sequestra fatores de transcrição (como o E2F), que promovem expressão de genes importantes para a progressão do ciclo celular para fase S; na forma hiperfosforilada, a proteína Rb é inativa e a progressão do ciclo é liberada; B - A cascata da coagulação do sangue pode ser ativada por elementos da matriz extracelular (como o colágeno) ou por fator tecidual expresso no endotélio ativado; as duas vias convergem para ativação da trombina que induz a formação da rede de fibrina além de induzir uma série de respostas de células envolvidas na inflamação e no reparo.

zir celularização. Numa abordagem de inicial de 6000 genes, a expressão de 93 genes foi induzida por mioseverina, incluindo fatores de crescimento, enzimas remodeladoras de matriz extracelular e mediadores da resposta tecidual à agressão.²⁵ Uma investigação subsequente identificou outra pequena molécula, triazina 2, com o mesmo efeito. Ambas compartilham o efeito de despolimerizar microtúbulos, e a nocodazolona, um inibidor conhecido da

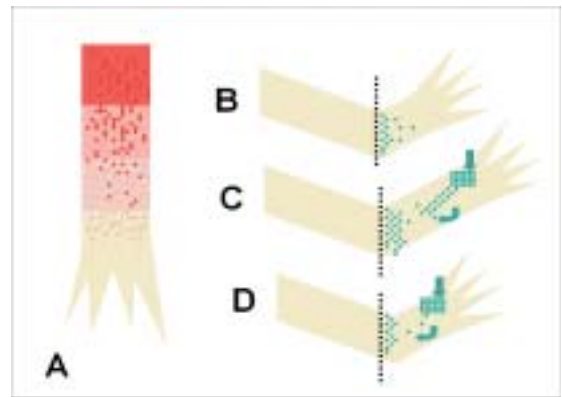


Figura 5 - Um gradiente decrescente proximal-distal de ácido retinóico é importante no desenvolvimento de vertebrados, e implicado também na memória de posição da regeneração de urodelos.

Nota: A - Uma concentração maior de ácido retinóico é mantida na extremidade distal pela distribuição de enzimas que o sintetiza (no pólo proximal) e degrada (no pólo distal); B - Prod-1 é uma proteína de superfície, induzida por ácido retinóico, que, em condições Normais, é expressa no blastema proximal; a expressão forçada de Prod-1, na extremidade distal do blastema regenerativo, resulta em: C - defeitos como proximalização, ou duplicação de estruturas proximais; ou D - migração das células que expressam Prod-1 para localizações proximais.

polimerização de microtúbulos, também é capaz de induzir celularização e síntese de DNA nos miotubos murinos em cultura. No entanto, os miotubos submetidos a esses tratamentos apenas separam-se em estruturas mononucleares, enquanto retêm os marcadores de diferenciação muscular e mantêm-se parados na fase G2 do ciclo celular.²⁶ Um recente avanço nesse campo foi a identificação de outro derivado de purina, a reversina, capaz de induzir celularização, crescimento e reprogramação para linhagens osteogênicas e adipogênicas, sob o estímulo apropriado *in vitro*. O desafio atual é compreender todos os mecanismos de ação e em até que grau uma molécula será capaz de induzir a reprogramação de tecidos inteiros *in vivo*.²⁷

Interações com o sistema de coagulação

Fatores de crescimento típicos de vertebrados, como o derivado de plaquetas (PDGF)

e o epidérmico (EGF), são capazes de estimular o blastema regenerativo, mas não miotubos de urodelos. Por outro lado, a atividade da trombina estimula a celularização de miotubos de urodelos em cultura, enquanto células musculares de mamíferos não respondem.⁴ Tritões respondem à retirada da córnea com ativação local da trombina, enquanto essa resposta está ausente no axolote, um urodelo incapaz de regenerar a córnea. Além disso, a inativação *in vivo* da trombina inibe o processo de regeneração da córnea. A produção local e regulada de trombina, como efeito da ativação do sistema de coagulação, oferece um estímulo compartimentalizado para regeneração de tecidos¹⁵ (FIGURA 4B). É interessante notar que, também em mamíferos, fatores derivados de plaquetas e da cascata de coagulação estimulam o crescimento de células envolvidas no reparo, tais como fibroblastos, células endoteliais e células parenquimatosas.¹ Os mecanismos moleculares envolvidos nessa sinalização e os fatores derivados da atividade da trombina responsáveis pelo estímulo de reprogramação ainda não foram elucidados.

Regeneração de membros e memória de posição

Entre as questões intrigantes que cercam a regeneração de membros de urodelos, um ponto fundamental diz respeito a como é possível interpretar a posição tridimensional dos tecidos para refazer um membro completo. A regeneração de um membro de um urodelo adulto difere do que ocorre durante o desenvolvimento, pois não é necessária a recriação de todas as posições. Um membro pode ser regenerado a partir de uma área pré-existente, a qualquer nível de amputação, e só a área distal amputada é refeita. Se o blastema em regeneração for removido e implantado na câmara anterior do olho, ou numa barbatana, o resultado será a formação de um membro ectópico, com forma e tamanho exato da área distal que foi amputada, o que é descrito como *autonomia* do blastema. Isso significa que, em contraste com o princípio geral da morfogênese, o blastema não depende de um gradiente de sinais e da distribuição espacial de estruturas vizinhas que determinam limiares de estimulação para vias

de diferenciação.²⁸ Uma quantidade relativamente pequena de células de um blastema indiferenciado (10.000) já guarda toda informação necessária para formar estruturas amputadas, mesmo quando implantadas em sítios ectópicos.⁶ Dessa forma, está claro que esses anfíbios mantêm um sistema de *memória de posição* do membro maduro.²⁸

O ácido retinóico (AR) está implicado na memória de posição e, quando membros regeneram num ambiente de excesso de AR, o tecido em diferenciação tende a exibir características proximais, ou mesmo induzir duplicação de estruturas, ao invés de apenas regenerar a parte distal à amputação. Um gradiente de AR decrescente do tronco para as extremidades distais é postulado como mecanismo de memória de posição. Durante o desenvolvimento, apenas o mesoderma lateral (tronco) produz AR, enquanto os brotos dos membros não sintetizam e, além disso, as extremidades distais expressam enzimas que degradam AR (FIGURA 5A).^{29, 30}

Entre os genes induzidos por AR, um codifica uma proteína de superfície denominada Prod-1, ortólogo do CD59 de mamíferos, que está ancorada à membrana por glicosilfosfatil-inositol.³¹ Os genes homeobox *Meis* são também expressos sob o estímulo do AR. Tanto a proteína de membrana Prod-1 quanto os fatores de transcrição Meis-1 e Meis-2 são expressos em abundância no blastema proximal e geram um gradiente decrescente de expressão até a extremidade distal (FIGURA 5B). A expressão forçada de Prod-1 ou Meis na extremidade distal resulta em proximalização do blastema ou relocação/migração das células para posições de localização mais proximais (FIGURA 5C; FIGURA 5D).^{32, 33}

A memória de posição não é um aspecto importante apenas da regeneração de membros. Células da íris transplantadas num blastema regenerativo de um membro amputado formam uma nova córnea.³⁴ Tais observações são importantes, visto que, mesmo quando a terapia com células-tronco é bem sucedida no sentido de induzir o enxerto de células na área de lesão cardíaca, problemas com distúrbios do ritmo

sugerem que o circuito eletrofisiológico original não é restaurado, e a contração das novas células pode ser independente e não coordenada com o restante do tecido cardíaco.^{35, 36} Ou seja, o mecanismo de regeneração natural de urodelos não promove apenas a diferenciação para células originais dos tecidos, mas também garante a restauração de relações fundamentais para a preservação funcional.

Como perdemos a plasticidade das salamandras?

É difícil determinar que via sinalizadora foi perdida durante a evolução dos vertebrados, o que resultou na incapacidade de regenerar estruturas complexas, como membros. Uma série de observações clássicas e recentes chama a atenção para o papel da regeneração dos nervos periféricos no resultado final do reparo de uma área perdida. A denervação prévia, ou na fase inicial da regeneração, após a amputação de um membro da salamandra, impede que um novo membro seja restaurado, enquanto a perda da função nervosa na fase tardia do processo não tem mais efeito sobre o resultado final.⁷

Entre os genes homeobox importantes para o desenvolvimento dos membros, um deles é o *Dll* (*Drosophila distal-less*), que apresenta um gradiente de expressão decrescente da extremidade distal para a proximal na mosca da fruta. Uma família de ortólogos do *Dll* em vertebrados foi identificada como *Dlx*. O gene *Dlx-3* é expresso na epiderme do membro em regeneração, e sua expressão é abolida quando a denervação do membro ocorre no estágio inicial do processo de reparo. Assim, tanto a capacidade regenerativa quanto a expressão de *Dlx-3* são dependentes de estímulos nervosos. O fator de crescimento fibroblástico 2 (FGF-2) é outra molécula expressa na epiderme dos membros em regeneração, e a administração de FGF-2 exógeno resgata a expressão epidérmica de *Dlx-3*, bem como a habilidade regenerativa de membros denervados. Além disso, recente publicação demonstrou a expressão de FGF-2 nos axônios de membros em desenvolvimento.³⁷ Em conjunto, os achados sugerem que estímu-

los tróficos de nervos periféricos determinam a decisão inicial pela regeneração, enquanto que, numa etapa posterior, a epiderme do membro amputado assume a função de expressar fatores tróficos (FGF-2) e fatores de transcrição (*Dlx-3*), responsáveis pela autonomia da estrutura em formação.

A supressão natural da regeneração axonal ocorre em mamíferos, e a inibição desse processo potencialmente favorece a recuperação funcional de tecidos agredidos. Por exemplo, oligodendrócitos são responsáveis pela formação da bainha de mielina dos axônios no sistema nervoso central e expressam inibidores da regeneração axonal associados à mielina, como Nogo-A. Anticorpos neutralizantes contra Nogo-A aumentam a recuperação funcional em graus variáveis nos modelos experimentais de lesão da medula espinhal.³⁸ Em recente relato da inibição de Nogo-A em sagüis (*Callithrix jacchus*), um aumento da regeneração de fibras nervosas foi observado após lesão da medula espinhal.³⁹ Ainda não está claro como esses achados podem ser relacionados à capacidade de regenerar estruturas não axonais. No entanto, eles demonstram que existem vias inibitórias da regeneração nervosa em mamíferos e que esse poderia ser o principal diferencial entre mamíferos e urodelos. Além disso, tais vias são aparentemente reversíveis clinicamente.

Se for possível regenerar completamente órgãos de mamíferos, será que guardamos a memória de posição para restauração perfeita de estruturas perdidas?⁶ Embora esteja claro que uma série de mecanismos, durante o desenvolvimento e a regeneração, está conservada entre todos vertebrados, um aspecto fundamental da regeneração de urodelos é sua autonomia. A regeneração independe de relações espaciais com tecidos vizinhos, que são fundamentais durante o desenvolvimento. A avaliação da memória de posição em mamíferos é difícil na ausência de regeneração nos mesmos contextos em que ela é observada em urodelos.

CONCLUSÃO

Um olhar rápido pela capacidade

regenerativa de alguns anfíbios pode parecer uma característica extravagante desses pequenos vertebrados. No entanto, uma análise mais cuidadosa permite concluir que a regeneração não é uma exceção entre os animais, e que vários de seus mecanismos envolvem vias de sinalização que são conservadas, inclusive em humanos. Uma abordagem para a identificação de agentes farmacológicos que tentam reproduzir a estratégia de desdiferenciação em mamíferos

já está em curso, embora sua aplicação clínica não esteja num horizonte próximo. Por outro lado, o estudo dos mecanismos básicos da regeneração de urodelos fornece um fascinante conjunto de informações sobre o desenvolvimento e regulação dos tecidos, que podem ser importantes nas abordagens atuais e futuras da medicina regenerativa.

Regeneration strategies in urodele amphibians

Abstract

In the age of stem cells, it is interesting to notice that nature has solved the problem of regeneration with diverse strategies rather than repopulation by undifferentiated cells. Urodele amphibians are unique among vertebrates as they are able to regenerate lens, retina, jaws, limbs and heart sections. Proliferation of specialized cells, transdifferentiation and dedifferentiation are important strategies for regeneration among newts and salamanders. Importantly, some signaling pathways are conserved among mammals including humans and the implications of our current knowledge on urodele regeneration in the mammalian context are discussed in this review.

Keywords: regeneration; urodele; amphibian; transdifferentiation; repair

REFERÊNCIAS

- 1 KUMAR, V.; ABBAS, A.K.; FAUSTO, N. ***Robbins & Cotran Patologia*** bases patológicas das doenças. 7.ed. Rio de Janeiro: Elsevier Brasil, 2005.
- 2 KOKAIA, Z.; LINDVALL, O. Neurogenesis after ischaemic brain insults. ***Curr Opin. Neurobiol.*** London, v.13, n.1, p.127-132, 2003.
- 3 URBANEK, K. et al. Myocardial regeneration by activation of multipotent cardiac stem cells in ischemic heart failure. ***Proc Natl. Acad. Sci. USA***, Washington, DC, v.102, n.24, p.8692-8697, 2005.
- 4 BROCKES, J.P.; KUMAR, A. Plasticity and reprogramming of differentiated cells in amphibian regeneration. ***Nat. Rev. Mol. Cell Biol.***, London, v.3, n.8, p.566-574, 2002.
- 5 NEWMARK, P.A.; SANCHEZ ALVARADO, A. Not your father's planarian: a classic model enters the era of functional genomics. ***Nat. Rev. Genet.***, London, v.3, n.3, p.210-219, 2002.
- 6 TANAKA, E.M. Regeneration: if they can do it, why can't we? ***Cell***, Cambridge, UK, v.113, n.5, p.559-562, 2003.
- 7 GARDINER, D.M.; ENDO, T.; BRYANT, S.V. The molecular basis of amphibian limb regeneration: integrating the old with the new. ***Semin. Cell Dev. Biol.***, London, v.13, n.5, p.345-352, 2002.
- 8 DEL RIO-TSONIS, K.; WASHABAUGH, C.H.; TSONIS, P.A. Expression of pax-6 during urodele eye development and lens regeneration. ***Proc Natl. Acad. Sci. USA***, Washington, DC, v.92, n.11, p.5092-5096, 1995.

- 9 MUNEOKA, K.; SASSOON, D. Molecular aspects of regeneration in developing vertebrate limbs. *Dev. Biol.*, Orlando, v.152, n.1, p.37-49, 1992.
- 10 REGINELLI, A.D. et al. Digit tip regeneration correlates with regions of Msx1 (Hox 7) expression in fetal and newborn mice. *Development*, Cambridge, UK, v.121, n.4, p.1065-1076, 1995.
- 11 OBERPRILLER, J.O. et al. Stimulation of proliferative events in the adult amphibian cardiac myocyte. *Ann. NY Acad. Sci.*, New York, v.752, p.30-46, 1995.
- 12 SOONPAA, M.H.; FIELD, L.J. Survey of studies examining mammalian cardiomyocyte DNA synthesis. *Circ. Res.*, Baltimore, v.83, n.1, p.15-26, 1998.
- 13 DOR, Y. et al. Adult pancreatic beta-cells are formed by self-duplication rather than stem-cell differentiation. *Nature*, London, v.429, n.6987, p.41-46, 2004.
- 14 EGUCHI, G.; ABE, S.I.; WATANABE, K. Differentiation of lens-like structures from newt iris epithelial cells in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Washington, DC, v.71, n.12, p.5052-5056, 1974.
- 15 IMOKAWA, Y.; SIMON, A.; BROCKES, J.P. A critical role for thrombin in vertebrate lens regeneration. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, London, v.359, n.1445, p.765-776, 2004.
- 16 TOSH, D.; SLACK, J.M. How cells change their phenotype. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, London, v.3, n.3, p.187-194, 2002.
- 17 ODELBERG, S.J. Unraveling the molecular basis for regenerative cellular plasticity. *PLoS Biol.*, San Francisco, v.2, n.8, p.E232, 2004.
- 18 LO, D.C.; ALLEN, F.; BROCKES, J.P. Reversal of muscle differentiation during urodele limb regeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Washington, DC, v.90, n.15, p.7230-7234, 1993.
- 19 KUMAR, A. et al. Plasticity of retrovirus-labelled myotubes in the newt limb regeneration blastema. *Dev. Biol.*, Orlando, v.218, n.2, p.125-136, 2000.
- 20 SCHNEIDER, J.W. et al. Reversal of terminal differentiation mediated by p107 in Rb-/- muscle cells. *Science*, Washington, DC, v.264, n.5164, p.1467-1471, 1994.
- 21 KUMAR, A. et al. The regenerative plasticity of isolated urodele myofibers and its dependence on MSX1. *PLoS Biol.*, San Francisco, v.2, n.8, p.E218, 2004.
- 22 ODELBERG, S.J.; KOLLHOFF, A.; KEATING, M.T. Dedifferentiation of mammalian myotubes induced by msx1. *Cell*, Cambridge, UK, v.103, n.7, p.1099-1109, 2000.
- 23 HAN, M. et al. Digit regeneration is regulated by Msx1 and BMP4 in fetal mice. *Development*, Cambridge, UK, v.130, n.21, p.5123-5132, 2003.
- 24 MCGANN, C.J.; ODELBERG, S.J.; KEATING, M.T. Mammalian myotube dedifferentiation induced by newt regeneration extract. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Washington, DC, v.98, n.24, p.13699-13704, 2001.
- 25 ROSANIA, G.R. et al. Myoseverin, a microtubule-binding molecule with novel cellular effects. *Nat. Biotechnol.*, New York, v.18, n.3, p.304-308, 2000.
- 26 DUCKMANTON, A. et al. A single-cell analysis of myogenic dedifferentiation induced by small molecules. *Chem. Biol.*, London, v.12, n.10, p.1117-1126, 2005.
- 27 CHEN, S. et al. Dedifferentiation of lineage-committed cells by a small molecule. *J. Am. Chem. Soc.*, Washington, DC, v.126, n.2, p.410-411, 2004.
- 28 BROCKES, J.P.; KUMAR, A. Appendage regeneration in adult vertebrates and implications for regenerative medicine. *Science*, Washington, DC, v.310, n.5756, p.1919-1923, 2005.
- 29 NIEDERREITHER, K. et al. Restricted expression and retinoic acid-induced down regulation of the retinaldehyde dehydrogenase

- type 2 (RALDH-2) gene during mouse development. *Mech. Dev.*, Limerick, v.62, n.1, p.67-78, 1997.
- 30 YASHIRO, K. et al. Regulation of retinoic acid distribution is required for proximodistal patterning and outgrowth of the developing mouse limb. *Dev. Cell*, Cambridge, Mass., v.6, n.3, p.411-422, 2004.
- 31 SILVA, S.M. da; GATES, P.B.; BROCKES, J.P. The newt ortholog of CD59 is implicated in proximodistal identity during amphibian limb regeneration. *Dev. Cell*, Cambridge, Mass., v.3, n.4, p.547-555, 2002.
- 32 ECHEVERRI, K.; TANAKA, E.M. Proximodistal patterning during limb regeneration. *Dev. Biol.*, Orlando, v.279, n.2, p.391-401, 2005.
- 33 MERCADER, N.; TANAKA, E.M.; TORRES, M. Proximodistal identity during vertebrate limb regeneration is regulated by Meis homeodomain proteins. *Development*, Cambridge, UK, v.132, n.18, 4131-4142, 2005.
- 34 ITO, M. et al. Lens formation by pigmented epithelial cell reaggregate from dorsal iris implanted into limb blastema in the adult newt. *Dev. Growth Differ.*, Tokyo, v.41, n.4, p.429-440, 1999.
- 35 ZHANG, Y.M. et al. Stem cell-derived cardiomyocytes demonstrate arrhythmic potential. *Circulation*, Hagerstown, v.106, n.10, 1294-1299, 2002.
- 36 LEOBON, B. et al. Myoblasts transplanted into rat infarcted myocardium are functionally isolated from their host. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Washington, DC, v.100, n.13, p.7808-7811, 2003.
- 37 MULLEN, L.M. et al. Nerve dependency of regeneration: the role of distal-less and FGF signaling in amphibian limb regeneration. *Development*, Cambridge, UK, v.122, n.11, p.3487-3497, 1996.
- 38 SCHWAB, M.E. Increasing plasticity and functional recovery of the lesioned spinal cord. *Prog. Brain Res.*, Amsterdam, v.137, p.351-359, 2002.
- 39 FOUAD, K.; KLUSMAN, I.; SCHWAB, M.E. Regenerating corticospinal fibers in the Marmoset (*Callitrix jacchus*) after spinal cord lesion and treatment with the anti-Nogo-A antibody IN-1. *Eur. J. Neurosci.*, Paris, v.20, n.9, p.2479-2482, 2004.

Recebido em / *Received*: 26/01/2006
Aceito em / *Accepted*: 28/04/2006