

Avanços no estudo de células-tronco no Brasil e suas implicações

Ricardo Junqueira Del Carlo¹, Betânia Souza Monteiro², Napoleão Martins Argôlo Neto²

RESUMO

As recentes descobertas sobre o comportamento *in vitro* das células-tronco embrionárias (CTE) e somáticas (CTS), assim como o aperfeiçoamento metodológico das técnicas de cultivo e aplicação clínica experimental incentivaram o apelo popular no Brasil pela liberação irrestrita das pesquisas com células-tronco (CT). Atualmente, mais um tipo de CT foi criada pela comunidade científica e nomeada de CT pluripotentes induzidas (iPS). Pesquisas com finalidades terapêuticas, envolvendo CTE, devem ser realizadas de forma cautelosa e, enquanto não se desvendar toda a biologia destas *in vivo*, deve-se prosseguir com as pesquisas *in vitro*. Dentre todas as linhagens de CTS estudadas até o presente momento, as células-tronco mesenquimais (CTM) apresentam maior plasticidade, originando tecidos mesodermis e não mesodermis. No Brasil, há um grande número de testes clínicos em andamento com CTS, em humanos, que avaliam o uso terapêutico destas células em diferentes doenças e recentemente, desenvolveu-se também a tecnologia para a criação de células iPS. Apesar da enorme expectativa quanto ao uso terapêutico desse tipo celular sua aplicação em humanos ainda não é aconselhada. As pesquisas com as diferentes linhagens de CT devem ser acompanhadas com entusiasmo e cautela. Ainda se desconhece quais tipos de CT contribuirão positivamente para o tratamento de enfermidades humanas, tampouco quais doenças poderão ser tratadas. A biologia das CT ainda é uma ciência em formação e a cada dia surgem novas evidências que refutam ou corroboram o conhecimento atual.

Palavras chave: células-tronco, células-tronco embrionárias, células-tronco somáticas, células-tronco pluripotentes induzidas, terapia celular.

ABSTRACT

Advances in stem-cell research in Brazil and its implications

Recent advances on *in vitro* behavior of embryonic (ESC) and somatic (SSC) stem cells, as well as methodological improvements in culture techniques and experimental clinical application, have prompted the Brazilian public's appeal for unrestricted stem cell research. Recently, another type of SC has been identified and named induced pluripotent stem (iPS) cell by the scientific community. Research involving ESC, with therapeutic goals, must be carried out cautiously, and, until its *in vivo* biology has not been fully elucidated, *in vitro* studies should continue. Among all SSC lines studied up to this moment, mesenchymal stem cells (MSC) showed the greatest plasticity, giving rise to mesodermal and non-mesodermal tissues. In Brazil, there are a large number of ongoing SSC clinical trials in humans to evaluate the therapeutic use of these cells in different diseases, and, recently, the technology for creating iPS cells has also been developed. Despite the huge expectation on the therapeutic use, this cell type is not recommended to application in

Recebido para publicação em abril de 2009 e aprovado em julho de 2009

¹ Professor Titular de Cirurgia e Obstetrícia Veterinárias, Departamento de Veterinária (DVT), Universidade Federal de Viçosa, Av. P. H. Rolfs s/n 36570-000 - Viçosa, MG. E-mail: ricarlo@ufv.br.

² Médico (a) Veterinário (a), Mestre em Medicina Veterinária. Doutorando do Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, DVT/UFV, Viçosa, MG.

humans. Research with different SC lines should be followed with enthusiasm and caution. It is still unknown which types of SC will contribute positively to the treatment of human's diseases and which diseases can be treated. Stem-cell biology is a science still in its infancy and new evidences corroborating or refuting the current knowledge arise every day.

Key words: stem cell, embryonic stem cell, somatic stem cell, induced pluripotent stem cell, cellular therapy.

INTRODUÇÃO

As recentes descobertas sobre a biologia das células-tronco embrionárias (CTE) e somáticas (CTS), bem como o aperfeiçoamento das técnicas de cultivo e aplicação clínica experimental incentivaram o apelo popular no Brasil pela liberação irrestrita das pesquisas com células-tronco (CT) (Albuquerque, 2009). Tal apelo foi motivado, em parte, pelo sensacionalismo com o qual os meios de comunicação abordam as perspectivas terapêuticas (Leite, 2009).

Fruto desse apoio popular e apelo da mídia, o Supremo Tribunal Federal (STF) liberou as pesquisas científicas com CTE sem nenhuma restrição, como previsto na Lei de Biossegurança de 29 de maio de 2008. O fato do Brasil possuir uma legislação específica sobre pesquisa e utilização terapêutica de CT, quando muitos países ainda não a possuem, coloca-o em posição de destaque na comunidade científica internacional (Burgardt, 2009). Além disso, garante a continuidade das pesquisas com CTE que estavam suspensas por infringir antigos preceitos éticos e reitera a imagem do Brasil como estado laico, no qual as decisões políticas não são pautadas em crenças religiosas (Paese, 2007).

Apesar dos possíveis avanços para as pesquisas com CTE, que a aprovação da lei de biossegurança poderá proporcionar, a maioria dos laboratórios dos principais centros de pesquisa brasileiros ainda não possuem estrutura adequada para esse tipo de estudo (Cimieri, 2009). Para sanar este problema, o governo Brasileiro recentemente disponibilizou 13 milhões de reais do Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social (BNDES) e 10,6 milhões de reais, conjuntamente, dos Ministérios da Saúde e da Ciência e Tecnologia para reestruturar os principais centros de pesquisas do país.

Esta iniciativa do Governo Federal propiciará, ainda, a construção de oito centros de pesquisa em terapia celular, com o objetivo de estabelecer logística para a produção de vários tipos de CT (adultas, induzidas e embrionárias) e fornece-las, gratuitamente, aos demais grupos de pesquisa interessados.

Além dos oito centros, o governo e o CNPq está investindo em 49 projetos de pesquisa com terapia celular

com CTE e CTS, dentre os quais destaca-se as pesquisas com doenças cardíacas degenerativas humanas (Instituto Nacional de Cardiologia de Laranjeiras – RJ), diabetes humana (Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto – SP) e doenças de Chagas (Fundação Oswaldo Cruz, FIOCRUZ – BA) (Cimieri, 2009).

Na Universidade Federal de Viçosa (UFV), localizada no estado de Minas Gerais, um grupo de pesquisa certificado pela Instituição, denominado “células-tronco mesenquimais e terapia reparativa” e registrado no CNPq, realiza estudos com a utilização de CTS e, vem recebendo apoio financeiro de Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e da Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).

O objetivo deste artigo é relatar os avanços obtidos, até o momento, no estudo de CT no Brasil, e suas consequências para a terapia reparativa.

CÉLULAS-TRONCO EMBRIONÁRIAS

As CTE são células indiferenciadas, denominadas totipotentes, pois podem originar quaisquer tecidos animais. Há 28 anos foram isoladas a partir da massa celular interna de blastocistos murinos e cultivadas *in vitro* (Evans & Kaufman, 1981; Zago & Covas, 2004; Alison, 2009). Posteriormente, no final da década de 90, utilizando os conhecimentos adquiridos a partir da cultura murina, as CTE humanas foram isoladas e cultivadas de pré-embriões fertilizados *in vitro*, não aptos a serem implantados e doados para propósito de pesquisa, com consentimento dos doadores (Thomson *et al.*, 1998, Hurlbut, 2007, Alison, 2009).

Entre o período de 2005 a 2008, antes da aprovação da Lei de Biossegurança do Brasil, alguns centros de pesquisas credenciados (Instituto de Biociências da USP em parceria com o Programa de Oncobiologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro, UFRJ) pelo Governo Federal realizavam pesquisas utilizando CTE humanas advindas de laboratórios norte-americanos, focadas nos aspectos básicos da morfofisiologia destas células (Zago & Covas, 2004; Baroni, 2008).

Estes estudos confirmaram propriedades interessantes destas CT como a formação de estrutura tridimensional esféricas denominadas corpos embrióides (CE). Os CE são agregados de células diferenciadas que simulam o desenvolvimento de embriões pré-implantados contendo as três camadas embrionárias: mesoderma, ectoderma e endoderma (Kerkis *et al.*, 2001, Sukoyan *et al.*, 2002). Nesses CE foi possível estudar os mecanismos de diferenciação celular até a geração de linhagens celulares somáticas, o processo de inativação do cromossomo X e os efeitos de substâncias tóxicas e biologicamente ativas no desenvolvimento embrionário *in vitro* (Kerkis *et al.*, 2001; Zago & Covas, 2004).

Não obstante, em outros países, a maioria dos trabalhos desenvolvidos na área de CTE também se relacionam à ciência básica e apesar da enorme expectativa do uso terapêutico dessas células, até julho de 2007, não havia relato de nenhum teste clínico com CTE em seres humanos, em andamento no mundo (Pereira, 2008).

Após a validação da Lei de Biossegurança do Brasil, pesquisadores do Instituto de Biociências da USP em parceria com o Programa de Oncobiologia da UFRJ obtiveram a primeira linhagem de CTE, em outubro de 2008, denominada BR-1. Esses estudos foram iniciados no final de 2005 e, mesmo durante a tramitação da validade da lei no STF, o Governo Federal apoiou o desenvolvimento dessas pesquisas (Baroni, 2008; Pereira, 2008).

Decorrente desse avanço, o Brasil tornou-se independente da necessidade de importação de culturas primárias de CTE, facilitando o desenvolvimento de novas pesquisas no país. Ademais, os futuros resultados poderão ser compartilhados com todos os cientistas brasileiros, por meio da Rede Nacional de Terapia Celular, com a finalidade de centralizar as informações, além de oferecer treinamento aos pesquisadores que desejarem realizar cultivo de novas linhagens de CT (Baroni, 2008).

Embora haja a expectativa que a BR-1 impulse as pesquisas clínicas com CTE no Brasil, alguns pesquisadores afirmam que os avanços obtidos são apenas metodológicos. Outras linhagens, como a brasileira, já foram estabelecidas e a maior contribuição da BR-1, até o momento, é o domínio da metodologia de cultivo, fato de impacto positivo tanto para os cientistas brasileiros quanto para a sociedade (Nardi, comunicação pessoal)¹.

Pereira (2008) afirmou que as primeiras pesquisas científicas utilizando células diferenciadas a partir das CTE em seres humanos, sob estrito controle científico, devem ter início em 2009, nos Estados Unidos e na Inglaterra. Contudo, esse autor reconheceu que apesar de todo o imenso potencial terapêutico dessas células, persistem ainda grandes incertezas sobre o seu comportamento *in*

vivo, já que existem alguns riscos, entre eles o desenvolvimento de certos cânceres.

As pesquisas com finalidades terapêuticas, envolvendo CTE, devem ser realizadas de forma cautelosa e enquanto não se desvendar toda a biologia das CTE *in vivo*, possibilitando sua aplicação como agente terapêutico, deve-se prosseguir com as pesquisas *in vitro*, pois essas podem fornecer conhecimentos básicos que contribuirão com benefícios à saúde humana.

CÉLULAS-TRONCO SOMÁTICAS

As CTS são células não-diferenciadas presentes em todos os tecidos adultos, capazes de auto-renovação por períodos de tempo ainda indeterminados e de originar tipos celulares diferenciados morfofisiologicamente. Essas características permitem que as CTS realizem a reparação e manutenção de todos os tecidos do organismo (Pittenger *et al.*, 1999; Minguell *et al.*, 2000).

Inicialmente, acreditava-se que as CTS possuíam seu potencial de diferenciação restrito somente às células do tecido no qual se encontram. Porém, nos últimos anos, diversas pesquisas têm demonstrado que algumas linhagens de CTS são capazes de originar tecidos diferentes de sua formação embrionária (Pereira, 2008).

Dentre todas as linhagens de CTS estudadas até o presente momento, as células-tronco mesenquimais (CTM) apresentam maior plasticidade, originando tecidos mesodermis e não mesodermis (Zago & Covas, 2004; Meirelles *et al.*, 2006). Essas células podem ser transplantadas para os sítios lesionais logo após a ocorrência da lesão tecidual e podem ser aplicadas na forma indiferenciada, recebendo o estímulo do meio para posterior diferenciação, ou sofrer diferenciação em cultura antes da implantação (Del Carlo *et al.*, 2004, Del Carlo *et al.*, 2008).

Em pesquisas com modelos animais, o grupo de pesquisa em reparação tecidual da UFV, em parceria com o Laboratório de Imunogenética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), vem obtendo sucesso e demonstrando a contribuição positiva do transplante de CTM autólogas para a reparação de falhas ósseas e feridas cutâneas em camundongos diabéticos.

O efeito terapêutico positivo das CTS, em modelos animais, justifica o uso dessas células em ensaios clínicos em humanos. Dessa forma, no Brasil, há um grande número de testes clínicos em andamento com CTS, em humanos, que avaliam o uso terapêutico destas células em diferentes doenças, como doenças cardíacas, auto-imunes e trauma de medula espinhal. Estes estudos estão em andamento e os resultados preliminares indicam que pelo menos não há efeitos adversos do transplante autólogo de CTS da medula óssea. Contudo, os efeitos terapêuticos ainda são discutíveis, pois são necessários diversos estudos clínicos randômicos para se determinar a influência dessas células sobre a biologia humana.

¹ Nardi, N. Comunicação pessoal. Porto Alegre, RS. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS. Outubro de 2008.

Em medicina humana, uma das áreas mais exploradas tem sido a cardiologia. Em um trabalho desenvolvido numa parceria entre a UFRJ, o Hospital Pró-Cardíaco e a Universidade do Texas, quatorze pacientes, com doença isquêmica grave do coração, receberam injeções de CTM autólogas de medula óssea diretamente na região isquêmica. Os resultados iniciais mostraram uma melhora significativa da função contrátil nos pacientes tratados quando comparados com controles, após quatro meses do tratamento (Pereira, 2008).

Além das CTM, as células-tronco hematopoiéticas (CTH) destacam-se pelo potencial terapêutico para tratamento de doenças onco-hematológicas. Por este motivo, o Brasil criou a rede BrasilCord, primeiro banco de cordão umbilical público nacional, que permite rapidez na localização de doadores compatíveis dentro de uma mesma população (Blanc, 2005). O Instituto Nacional do Câncer (INCA - RJ), integrante do BrasilCord, recentemente, deu um salto tecnológico em direção a auto-suficiência na estocagem de sangue de cordão umbilical. Através da obtenção de recursos não-reembolsáveis no valor de 4,09 milhões de reais, junto ao BNDES, a capacidade de congelamento do INCA aumentará de três mil para 10.340 bolsas em 2009 (Montenegro, 2009).

Contudo, até recentemente, apenas o sangue de cordões umbilicais de partos realizados nos estados do Rio de Janeiro e São Paulo eram doados para o BrasilCord. Conseqüentemente, a variabilidade étnica das amostras desse banco de cordão pode ser muito baixa e não representar toda a diversidade genética da nossa população. A iniciativa da criação da rede de bancos públicos no Brasil é de extrema importância para a saúde da população, mas para que esta tenha impacto relevante, deve contemplar a natureza diversificada de nossa população, o que deve se refletir na escolha dos pontos de coleta e em um cálculo realista da meta de número de amostras armazenadas (Montenegro, 2009).

Novas fontes de CTS vêm sendo caracterizadas de lipoaspirado e da polpa do dente de leite humano. Ainda não se sabe quais dessas células cumprirão sua promessa terapêutica, mas elas ilustram o quanto ainda tem-se que aprender sobre os diferentes nichos de CTS no organismo adulto (Zuk *et al.*, 2002; Kerkis *et al.*, 2007).

CÉLULAS-TRONCO PLURIPOTENTES INDUZIDAS

As células-tronco pluripotentes induzidas (iPS) são células geneticamente modificadas e reprogramadas que se originam de células somáticas ou de CTS, por meio de mecanismos de transfecção celular, gerando exemplares similares às células embrionárias (Takahashi *et al.*, 2007).

Esta recente descoberta envolve a reprogramação das células somáticas pela incorporação de fatores transcripcionais que são altamente expressados pelas CTE, como os fatores Oct3/4, Sox2, c-Myc, e Klf4, por meio de transdução retroviral (Takahashi & Yamanaka, 2006). Após a introdução desses fatores reprogramantes, ocorre ativação e produção de genes endógenos normalmente expressados pelas CTE, gerando células semelhantes às embrionárias, em relação à morfologia e funcionalidade (Yu & Thomson, 2008; Amabile & Meissner, 2009).

O Brasil é o quinto país do mundo a desenvolver tecnologia para a criação de células iPS obtidas sem a necessidade de embriões. Os primeiros estudos foram desenvolvidos por pesquisadores da UFRJ e os resultados foram apresentados em 2008. Para eles, a produção de células iPS representa um grande avanço para a ciência, sobretudo para a biomedicina. Em acréscimo, o fato de não serem provenientes de embriões permite que sejam derivadas diretamente de células dos pacientes a serem tratados (Escobar, 2009).

Apesar da enorme expectativa quanto ao uso terapêutico desse tipo celular sua aplicação em humanos ainda não é aconselhada. A única aplicação garantida dessas células, por enquanto, é em pesquisas básicas e em modelos animais, visando a geração de modelos para estudos de doenças e testes de drogas *in vitro* (Amabile & Meissner, 2009). Tal opinião também é compartilhada entre os pesquisadores brasileiros (Escobar, 2009).

Toda essa cautela deve-se ao fato das iPS apresentarem os mesmos problemas intrínsecos das CTE, como o risco de formação de tumores e dificuldade de controlar a sua diferenciação *in vivo*, sendo esse risco ainda maior devido ao fato da reprogramação ser efetuada sob ação retroviral (Takahashi *et al.*, 2007).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

As pesquisas com as diferentes linhagens de CT devem ser acompanhadas com entusiasmo e cautela. Ainda se desconhece quais tipos de CT contribuirão positivamente para o tratamento de enfermidades humanas, tampouco quais doenças poderão ser tratadas. A biologia das CT ainda é uma ciência em formação e a cada dia surgem novas evidências que refutam ou corroboram o conhecimento atual. Contudo, espera-se que as novas terapias com CT substituam tratamentos atuais, mais caros e, muitas vezes, ineficientes. Além disso, acredita-se que as CT são um importante modelo experimental para o estudo dos mecanismos de diferenciação celular, desenvolvimento embrionário e câncer, entre outros. Esses conhecimentos de biologia básica poderão proporcionar, a médio prazo, uma melhora da abordagem terapêutica às doenças humanas e animais.

REFERÊNCIAS

- Albuquerque F (2009) Pesquisas com células-tronco têm avanço no Brasil, diz pesquisadora. Disponível em: <http://www.diariodasaude.com.br/news.php?article=pesquisas-com-celulas-tronco-tem-avanco-no-brasil&id=3788>. Acessado em: 10 de março de 2009.
- Alison MR (2009) Stem cells in pathobiology and regenerative medicine. *Journal of Pathology*, 217: 141-143.
- Amabile G & Meissner A (2009) Induced pluripotent stem cells: current progress and potential for regenerative medicine. *Trends in Molecular medicine*, 15: 59-68.
- Baroni LL (2008) Cientistas brasileiros criam linhagem de células-tronco. Disponível em: <http://www.universia.com.br/materia/materia.jsp?materia=16753>. Acessado em: 10 de março de 2009.
- Blanc V (2005) A polêmica do cordão. Disponível em: <http://www.revistaepoca.globo.com/Epoca/0,6993,EPT928441-1664,00.htm>. Acessado em: 10 de março de 2009.
- Burgardt L (2009) O que muda com decisão do STF sobre células-tronco. Disponível em: <http://www.universia.com.br/materia/materia.jsp?materia=16144>. Acessado em: 10 de março de 2009.
- Cimieri F (2009) País terá oito novos laboratórios para pesquisas com células-tronco. Disponível em: http://www.estadao.com.br/estadaoheje/20090223/not_imp328545.0.php. Acessado em: 10 de março de 2009.
- Del Carlo RJ, Monteiro BS, Daibert APF & Pinheiro LCP (2004) Medula óssea autógena. Uma alternativa em ortopedia veterinária. *Revista Ceres*, 51: 411-418.
- Del Carlo RJ, Monteiro BS & Argolo Neto NM (2008) Células-tronco e fatores de crescimento na reparação tecidual. *Ciência Veterinária nos Trópicos*, 11: 167-169.
- Escobar H (2009) Uso clínico de células iPS será difícil. Disponível em: http://www.estadao.com.br/estadaoheje/20090129/not_imp314659.0.php. Acessado em: 10 de março de 2009.
- Evans MJ & Kaufman MH (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*, 292: 154-156.
- Hurlbut WB (2007). Ethics and embryonic stem cell research: altered nuclear transfer as a way forward. *Biodrugs*, 21:79-83.
- Kerkis A, Soukoian M, Kerkis I, Merkel C, Mello MRB & Pereira LV (2001). Células-tronco embrionárias. *Biotechnology, Ciência e Desenvolvimento*, 20: 20-25.
- Kerkis I, Kerkis A, Dozortsev D, Stukart-Parsons GC, Massironi SMG, Pereira LV, Caplan AI & Cerruti HF (2007) Isolation and characterization of a population of immature dental pulp stem cells expressing oct-4 and other embryonic stem cells markers. *Cells Tissues and Organs*, 184: 105-116.
- Leite M (2009) Ciência em Dia: Células-tronco e sensacionalismo. Disponível em: <http://www1.folha.uol.com.br/folha/ciencia/ult306u7656.shtml>. Acessado em: 10 de março de 2009.
- Meirelles LS, Chagastelles PC & Nardi NB (2006) Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *Journal of Cell Science*, 119: 2204-2213.
- Minguell JJ, Conget P & Erices A (2000) Biology and clinical utilization of mesenchymal progenitor cells. *Brazilian Journal of Medical and Biology Research*, 33: 881-887.
- Montenegro KB (2009) Banco de cordão umbilical: Brasil busca auto-suficiência. Disponível em: http://www.ghente.org/temas/celulastronco/cordao_umbilical.htm. Acessado em: 10 de março de 2009.
- Paese J (2007) Controvérsias na Tecnociência: O Caso da Lei de Biossegurança no Brasil. Tese de Doutorado. Centro de Filosofia e Ciências Humanas da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 298p.
- Pereira LV (2008). A importância do uso das células-tronco para a saúde pública. *Ciência e Saúde Coletiva*, 3: 7-14.
- Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S & Marshak DR (1999) Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 284: 143-147.
- Sukoyan MA, Kerkis AY, Mello MRB, Kerkis IE, Visintin JA & Pereira LV (2002) Establishment of new murine embryonic stem cell lines for the generation of mouse models of human genetic diseases. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 35: 535-542.
- Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K & Yamanaka S (2007) Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*, 131: 1-12.
- Takahashi K & Yamanaka S (2006) Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 126: 663-676.
- Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS & Jones JM (1998) Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*, 282: 1145-1147.
- Zago MA & Covas DT (2004) Pesquisas com células-tronco: aspectos científicos, éticos e sociais. *Seminário Instituto Fernando Henrique Cardoso*, 1: 1-20.
- Zuk A, Zhu M, Ashjian P, DeUgarte DA, Huang JI, Mizuno HH, Alfonso ZC, Fraser JK, Benhaim P & Hedrick MH (2002). Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Molecular and Biology of the Cell*, 13: 4279-4295.
- Yu J & Thomson JA (2008). Pluripotent stem cell lines. *Genes and Development*, 22: 1987-1997.