

Universidade do Algarve

Utilização de células estaminais no tratamento de doenças neurodegenerativas

Mariana Duarte Conduto Silva

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Trabalho efetuado sob a orientação da Doutora Liliana Mendonça
e da Professora Doutora Isabel Júlio da Silva

2024

Universidade do Algarve

Utilização de células estaminais no tratamento de doenças neurodegenerativas

Mariana Duarte Conduto Silva

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Trabalho efetuado sob a orientação da Doutora Liliana Mendonça
e da Professora Doutora Isabel Júlio da Silva

2024

Utilização de células estaminais no tratamento de doenças neurodegenerativas

Declaração de autoria de trabalho

Declaro ser a autora deste trabalho, que é original e inédito. Autores e trabalhos consultados estão devidamente citados no texto e constam da listagem de referências incluída.

(Mariana Duarte Conduto Silva)

Copyright © 2024 Mariana Duarte Conduto Silva

A Universidade do Algarve tem o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicitar este trabalho através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, de o divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Agradecimentos

Primeiramente, deixo um reconhecimento especial à Dra. Liliana Mendonça que aceitou orientar esta dissertação, que me acompanhou sempre durante a realização da mesma, transmitindo-me conhecimentos, conselhos e motivação. Agradeço-lhe muito a dedicação, empenho e disponibilidade constante.

Agradecer à Prof. Dra. Isabel Júlio da Silva por ter também aceitado orientar esta dissertação e por todo o apoio, disponibilidade e confiança.

Aos meus pais, por acreditarem sempre em mim e me incentivarem a lutar pelos meus sonhos.

Em especial à minha irmã, por estar sempre ao meu lado em todas as decisões e me ajudar em todos os momentos. *“Sempre assim, sempre assim será”*.

Às amigas que a universidade me deu e que levo no coração.

Aos colegas e professores do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas da Universidade do Algarve, os quais contribuíram para o meu crescimento académico.

A todos o meu sincero obrigada!

Resumo

Em todo o mundo, as doenças neurodegenerativas são uma causa prevalente e crescente de mortalidade e morbidade, especialmente entre a população idosa, sendo caracterizadas pela morte de neurónios e células da glia do cérebro e da medula espinal.

As terapias de base celular com recurso às células estaminais têm potencial para ser usadas no tratamento das doenças neurodegenerativas. Deste modo, ao longo desta dissertação foram abordados diferentes tipos de células estaminais nomeadamente as células estaminais fetais, embrionárias e adultas, bem como estratégias para as obter por reprogramação celular. Foram também discutidos os mecanismos terapêuticos da terapia celular, nomeadamente a substituição celular, *redução* da neuroinflamação, estimulação da neurogénese e aumento dos níveis de fatores neurotróficos. Foram igualmente abordados os métodos de avaliação do efeito terapêutico destas células assim como a segurança versus riscos do uso da terapia celular.

A importância da aplicação da terapia celular em doenças neurodegenerativas como a doença de Alzheimer, doença de Huntington e doença de Parkinson foi avaliada e discutida. Alguns dos ensaios pré-clínicos e clínicos desenvolvidos para estas doenças foram abordados. Os estudos pré-clínicos apresentados utilizaram maioritariamente células estaminais embrionárias, adultas (nomeadamente neurais e mesenquimatosas), mas também precursores neurais derivados de células estaminais pluripotentes induzidas. Para cada ensaio foram descritos os principais resultados obtidos, tendo sido abordados vinte ensaios clínicos.

De uma forma geral, podemos concluir que os transplantes de precursores neuronais derivados das células estaminais mostraram promover melhorias na função cognitiva, plasticidade sináptica, efeito neuroprotetor, mas também promoção da neurogénese. Em suma, embora ainda existam grandes desafios no desenvolvimento de fontes de células seguras e eficientes e na padronização e regulamentação dos ensaios a desenvolver durante os ensaios pré-clínicos e clínicos é bastante claro que a terapia celular tem um elevado potencial terapêutico no tratamento de doenças neurodegenerativas.

Termos-chave: Doenças neurodegenerativas; Terapia celular; Transplante de células estaminais; ensaios pré-clínicos; ensaios clínicos

Abstract

Worldwide, neurodegenerative diseases are a prevalent and growing cause of mortality and morbidity, especially among the elderly population, and are characterized by the death of neurons and glial cells in the brain and spinal cord.

Cell-based therapies using stem cells have the potential to be used in the treatment of neurodegenerative diseases. Therefore, throughout this dissertation, different types of stem cells were addressed, namely fetal, embryonic, and adult stem cells, as well as strategies to obtain them through cell reprogramming. The therapeutic mechanisms of cell therapy were also discussed, namely cell replacement, reduction of neuroinflammation, stimulation of neurogenesis, and increase in levels of neurotrophic factors. Methods for evaluating the therapeutic effect of these cells as well as the safety versus risks of using cell therapy were also discussed.

The importance of applying cell therapy in neurodegenerative diseases such as Alzheimer's disease, Huntington's disease, and Parkinson's disease was evaluated and discussed. Some of the pre-clinical and clinical trials developed for these diseases were covered. The pre-clinical studies presented used embryonic and adult stem cells (namely neural and mesenchymal), but also neural precursors derived from induced pluripotent stem cells. For each trial, the main results obtained were described, with twenty clinical trials covered.

In general, we can conclude that transplants of neuronal precursors derived from stem cells have been shown to promote improvements in cognitive function, synaptic plasticity, neuroprotective effect, but also promotion of neurogenesis. In short, although there are still major challenges in the development of safe and efficient cell sources and the standardization and regulation of assays to be developed during pre-clinical and clinical trials, it is quite clear that cell therapy has a high potential in the treatment of neurodegenerative diseases.

Keywords: Neurodegenerative diseases; Cellular therapy; Stem cell transplantation; pre-clinical trials; clinical trials

Índice

Índice de tabelas	xi
Índice de figuras	xiii
Lista de abreviaturas	xv
Capítulo I	1
1.1. Contexto histórico	1
1.2. Células Estaminais	2
1.2.1. Células Estaminais Fetais	4
1.2.2. Células Estaminais Embrionárias	6
1.2.3. Células Estaminais Adultas	8
1.2.3.1 Células Estaminais Neurais	9
1.3 Reprogramação celular	9
1.3.1 Células estaminais pluripotentes induzidas (iPSCs)	10
1.3.2 Reprogramação celular direta.....	13
1.3.3 Reprogramação celular utilizando pequenas moléculas.....	16
1.3.3.1 Pequenas moléculas que regulam as vias de sinalização dos fatores de transcrição	16
1.3.3.2 Pequenas moléculas que provocam alterações epigenéticas envolvidas na reprogramação	17
1.3.3.3 Pequenas moléculas que regulam alterações metabólicas.....	18
Capítulo II.....	22
2.1 Mecanismos terapêuticos de ação das células estaminais	22
2.1.1 Substituição celular	22
2.1.2 Efeito espectador (Bystander Effect)	27
2.1.2.1. Aumento dos fatores neurotróficos	28
2.1.2.2. Redução da neuroinflamação	29
2.1.2.3 Estimulação da neurogênese	33
2.2 Métodos de avaliação dos mecanismos terapêuticos	35
2.3 Segurança e riscos.....	37
Capítulo III	40
3.1. Doença de Alzheimer.....	40
3.1.1 Ensaios pré-clínicos com terapia de base celular	41
3.1.2 Ensaios clínicos com terapias de base celular	42
3.2 Doença de Huntington	45
3.2.1 Ensaios pré-clínicos com terapias de base celular	46

3.2.2 Ensaio Clínicos com terapias de base celular	49
3.3 Doença de Parkinson	50
3.3.1 Ensaio pré-clínicos com terapias de base celular	51
3.3.2 Ensaio Clínicos com terapias de base celular	53
3.4 Resultados, limitações e observações gerais da aplicação das terapias de base celular em doenças neurodegenerativas	58
Capítulo IV	62
4.1 Discussão e Conclusões	62
Referências bibliográficas	71

Índice de tabelas

Tabela 1.1- Pequenas moléculas que regulam as vias de sinalização dos fatores de transcrição envolvidos na reprogramação celular	17
Tabela 1.2-Pequenas moléculas que provocam alterações epigenéticas e efeito associado.....	17
Tabela 1.3 - Pequenas moléculas que provocam alterações metabólicas e efeito associado.	19
Tabela 1.4- Pequenas moléculas usadas na reprogramação celular e seus mecanismos.	19
Tabela 3.1 - Estudos pré-clínicos de terapias de base celular publicados no âmbito da doença de Alzheimer	41
Tabela 3.2 -Estudos clínicos de terapias de base celular na doença de Alzheimer, consultados no site clinicaltrials.gov em março 2024.	43
Tabela 3.3 -Estudos pré-clínicos com terapias de base celular na doença de Huntington	46
Tabela 3.4- Estudos clínicos com terapias de base celular no âmbito da doença de Huntington, consultados no site clinicaltrials.gov.....	49
Tabela 3.5 -Estudos pré-clínicos com terapias de base celular no âmbito da doença de Parkinson.	51
Tabela 3.6 -Estudos clínicos com terapias de base celular realizados no âmbito da doença de Parkinson, consultados no site clinicaltrials.gov.	54

Índice de figuras

Figura 1.1- Camadas germinativas embrionárias e tecidos originados a partir destas.	3
Figura 1.2- O princípio da neurotransplantação em doenças neurodegenerativas.	4
Figura 1.3- Scan da topografia por emissão de positrões que ilustra o aumento progressivo da fluorlevodopa na zona putaminal do cérebro, antes e após o transplante.....	5
Figura 1.4- Diferentes fontes de células estaminais a serem usadas na regeneração cerebral	7
Figura 1.5- Densidade de fibras positivas para VMAT2 no putâmen cerebral do tecido transplantado (B) em comparação com o tecido cerebral do doente não transplantado (A). (C) A diferença na inervação positiva para VMAT2, conforme avaliado por densitometria.	8
Figura 1.6- Representação esquemática da reprogramação de fibroblastos em células estaminais pluripotentes induzidas utilizando os 4 fatores de reprogramação identificados por Yamanaka.	10
Figura 1.7 - A pluripotência observada das células estaminais induzidas a partir dos fibroblastos embrionários de murganho. Análise histológica.	11
Figura 1.8- Reprogramação direta e Reprogramação indireta.....	13
Figura 1.9- Reprogramação celular direta: mecanismos de reprogramação e avaliação das células obtidas.	16
Figura 1.10 - Representação esquemática dos passos envolvidos na reprogramação celular usando pequenas moléculas.....	20
Figura 2.1- Abordagem do uso de células estaminais neurais na substituição celular no sistema nervoso.	23
Figura 2.2- Ilustração do desenvolvimento de oligodendrócitos a partir de células estaminais embrionárias.	24
Figura 2.3- Ilustração de um protocolo de diferenciação in vitro de células estaminais embrionárias humanas e células estaminais pluripotentes humanas induzidas em neurónios	26

Figura 2.4- Ilustração do processo utilizado para gerar astrócitos derivados de células estaminais embrionárias humanas e células estaminais pluripotentes induzidas humanas	27
Figura 2.5- Ilustração dos diferentes recetores dos fatores neutróficos.	29
Figura 2.6- Representação esquemática das vias de sinalização celular que regulam as interações entre o enxerto de células estaminais e o sistema imune do hospedeiro em doenças inflamatórias cerebrais.....	31
Figura 2.7- Esquema da neurogénese dividido por duas zonas cerebrais, a zona subgranular e a zona subventricular.	33

Lista de abreviaturas

- 2-Me-5HT:** 2-metil-5-hidroxitriptamina
- AAV2:** vírus adeno-associado 2
- Allo-hMSC:** Células estaminais mesenquimatosas alogénicas
- APCs:** moléculas apresentadoras de antígeno
- ATMPs:** medicamentos de terapia avançada
- BDNF:** fator neutrófico derivado do cérebro
- BMP:** proteína morfogénica óssea
- CAG:** sequência de nucleótidos de citosina, adenina e guanina
- ChAT:** Enzima colina acetiltransferase
- CNTF:** fator neutrófico ciliar
- COMT:** catecol-o-metiltransferase
- CRISPR/Cas9:** conjunto de repetições palindrómicas curtas regularmente interespaçadas associadas à nuclease Cas9
- D2R:** recetores de dopamina D2
- DARPP-32:** Fosfoproteína regulada por dopamina e AMP cíclico de peso molecular 32.000 Da
- DNA:** ácido desoxirribonucleico
- ELISA:** ensaio de imunoabsorção enzimática
- EMA:** Agência Europeia do Medicamento
- ESC:** células estaminais embrionárias
- Fbxo15:** proteína Fbox 15
- FDA:** *Food and Drug Administration*
- FGF:** fator de crescimento fibroblástico
- FGF-2:** fator de crescimento do fibroblasto tipo 2
- FSK:** Forscolina
- G418:** aminoglicosídeo de estrutura semelhante à gentamicina
- GDNF:** fator neutrófico derivado da linhagem de células gliais
- GFAP:** promotor da proteína glial fibrilar ácida
- HB-adMSCs:** células estaminais mesenquimatosas derivadas do adipócito humano

hESCs: células estaminais embrionárias humanas

hIDPSCs: células estaminais da polpa dentária imatura humana

hNGF: fator de crescimento neural humano

HTT: proteína Huntingtina

iba1: molécula adaptadora de ligação ao cálcio ionizado 1

ICH: Conselho Internacional para Harmonização de Requisitos Técnicos para Produtos Farmacêuticos para Uso Humano

Id: reguladores da via inibitória

IGF1: fator de crescimento semelhante à insulina

IL1B: interleucina 1b

IL6: interleucina 6

INF γ : interferon γ

iPSCs: células estaminais pluripotentes induzidas

LIF: fator de inibição para a leucemia

LSD1: inibidor de desmetilase específica para a lisina tipo I

MAO-B: inibidores da monoamina oxidase B

MAPK/ERK: proteínas quinases associadas a microtúbulos/ proteínas quinases reguladas por sinal extracelular

MEFs: fibroblastos embrionários de murganho

MenSCs: células estaminais endometriais derivadas do sangue menstrual humano

MHC: complexo principal de histocompatibilidade

MLR: reação linfocitária mista

MSCs: células estaminais mesenquimatosas

MSK-DA01: células progenitoras de neurónios dopaminérgicos do mesencéfalo derivadas de células estaminais embrionárias humanas

NE: progenitores da neuroectoderme

NGF: fator de crescimento neural

NO: óxido nítrico

NPCs: células precursoras neurais

NSCs: células estaminais neurais

NT3: proteína neutrofina humana recombinante do tipo3

PBD-VSEL: células derivadas de sangue periférico muito pequenas semelhantes a embrionárias

PCR: reação em cadeia da polimerase

PDGF: fator de crescimento derivado de plaquetas

PD-L1: proteína da morte celular programada

PET/CT: tomografia por emissão de positrões/tomografia computadorizada

PGE2: prostaglandinas E2

PRP: plasma autólogo rico em plaquetas

Q-PCR: reação em cadeia da polimerase em tempo real

RA: ácido retinoico

RNA: ácido ribonucleico

SAM: mediador de ativação sinérgica

SeV: vírus *Sendai*

SGZ: zona subgranular

SHH: Sonic Hedgehog

SHH-C: SHH com mutação na cisteína

SNC: sistema nervoso central

SPION: nanopartículas de óxido de ferro superparamagnético

SVZ: zona subventricular

TGF β : fator transformador de crescimento beta

TNF α : fator de necrose tumoral α

VEGF: fator de crescimento endotelial vascular

VMAT2: transportador da monoaminase vesicular tipo 2

VPA: ácido valpróico

Capítulo I

1.1. Contexto histórico

Em 1868, o termo “*stammzelle*” (célula estaminal) foi utilizado pela primeira vez na literatura científica *Natürliche Schöpfungsgeschichte* (História da Criação Natural) definido pelo biólogo alemão Haeckel que, considerava que todos os organismos multicelulares evoluíram a partir de uma única célula ancestral [1]. Desde a introdução do termo de “células estaminais” outros autores tiveram um papel importante no crescente conhecimento deste campo de conhecimento que culminou na utilização deste tipo de células em terapia celular.

Em 1890, W. Gilman Thompson desenvolveu estudos sobre o transplante de tecido cerebral e, para tal, transplantou tecido do córtex do cérebro de cão no cérebro de gato e, vice-versa. Através da análise microscópica este tecido após sete semanas, Thompson concluiu que o tecido cerebral tem capacidade de sobreviver até sete semanas sem que seja perdida a sua identidade como tecido cerebral, que no caso tem bastante interesse para melhorar a investigação na área, sendo esta a primeira experiência que relata o transplante de tecido do sistema nervoso central adulto no cérebro [2].

Após vinte e sete anos de estudos e avanços científicos, foi possível testemunhar o primeiro transplante bem-sucedido de tecido do SNC no cérebro de mamífero adulto, com alguma sobrevivência do tecido do córtex neonatal transplantado, realizado por E. Dunn, em 1917 [2,3].

Outros contributos relevantes, na área da transplantação cerebral, são os estudos de Ranson (1914), Tidd (1932), Le Gros Clark (1940) e Glees (1955) em que foi questionado o desenvolvimento, crescimento e diferenciação do tecido do SNC de mamífero em condições adversas ao contexto normal. Os estudos provaram que, após transplantação de gânglios periféricos anexados a pequenos fragmentos de nervos periféricos, estes últimos sofrem alterações degenerativas mais rapidamente quando comparadas à dos gânglios, devido ao tecido conjuntivo que encapsula os gânglios, conseguir retardar estas alterações [2,4].

Durante muitos anos, a comunidade científica defendeu que o cérebro era um órgão incapaz de renovação celular, sendo, portanto, desprovido de plasticidade. Em 1969, Altam e, posteriormente, em 1983, Goldman e Nottebohm, desenvolveram estudos com foco na neurogênese, confirmando assim, que os neurónios do cérebro adulto

poderiam ser formados *de novo* [5]. Esta descoberta permitiu alavancar a terapia celular, porque demonstrou que era possível promover regeneração do cérebro adulto.

O trabalho científico, desenvolvido por Perlow em 1979, teve grande impacto no campo da transplantação de células estaminais, uma vez que evidenciou os primeiros resultados positivos em termos de recuperação funcional, através da transplantação de tecido cerebral de rato no cérebro adulto de rato, onde neurónios dopaminérgicos no núcleo caudado haviam sido destruídos [3].

Outros estudos importantes reportaram melhorias na função motora observados em doentes com doença de Parkinson, na década de 1990, por Lindvall e colaboradores, promovidas pelo transplante de enxertos de neurónios dopaminérgicos fetais [6,7].

1.2. Células Estaminais

Em termos gerais, as células estaminais podem ser definidas como células indiferenciadas que retém a capacidade de autorrenovação e, através de mecanismos de divisão celular, dão origem a células diferenciadas, que expressam um fenótipo diferente da célula que lhe deu origem, ou seja, a célula estaminal tem a capacidade de dar origem a células de diferentes tipos de tecidos do organismo, dependendo do tipo de estímulos a que esta está exposta [8]. Deste modo, as células estaminais podem migrar e assumir morfologia e funções típicas do ambiente/tecido em que se encontram.

Existem também diferentes tipos de células estaminais presentes nos nichos de células estaminais a partir das quais um organismo pode gerar células estaminais diferenciadas. Os fatores de crescimento, a matriz extracelular, o meio envolvente, bem como fatores de diferenciação têm influência na diferenciação celular e na função que a célula estaminal irá adquirir [5].

A divisão celular das células estaminais pode ocorrer de forma simétrica, em que a célula inicial dá origem a duas células-filha semelhantes para que haja autorrenovação ou pode ocorrer de forma assimétrica com a geração de células-filha diferenciadas, possibilitando assim a especialização para os diferentes tecidos do organismo [9].

As células estaminais distinguem-se consoante a sua origem e o tipo de células nas quais se diferenciam (potência celular). De acordo com a origem, são classificadas

como sendo células fetais, embrionárias ou adultas. De acordo com a potência celular, são classificadas como totipotentes, pluripotentes e multipotentes.

As células totipotentes são células que dão origem à linhagem germinativa endoderme, ectoderme e mesoderme, mas também a células que dão o suporte para o desenvolvimento fetal e embrionário, como as células da placenta. As células pluripotentes, apenas originam células das três camadas germinativas, mencionadas anteriormente. Finalmente as multipotentes apenas originam células de uma das linhas germinativas [10].

A camada endoderme contribui para a formação dos tecidos do trato respiratório e digestivo; a ectoderme está na base do desenvolvimento neural e das células da derme; finalmente a mesoderme suporta a produção das células sanguíneas, ósseas, musculares, da cartilagem e do tecido adiposo (*Figura 1.1*) [11].

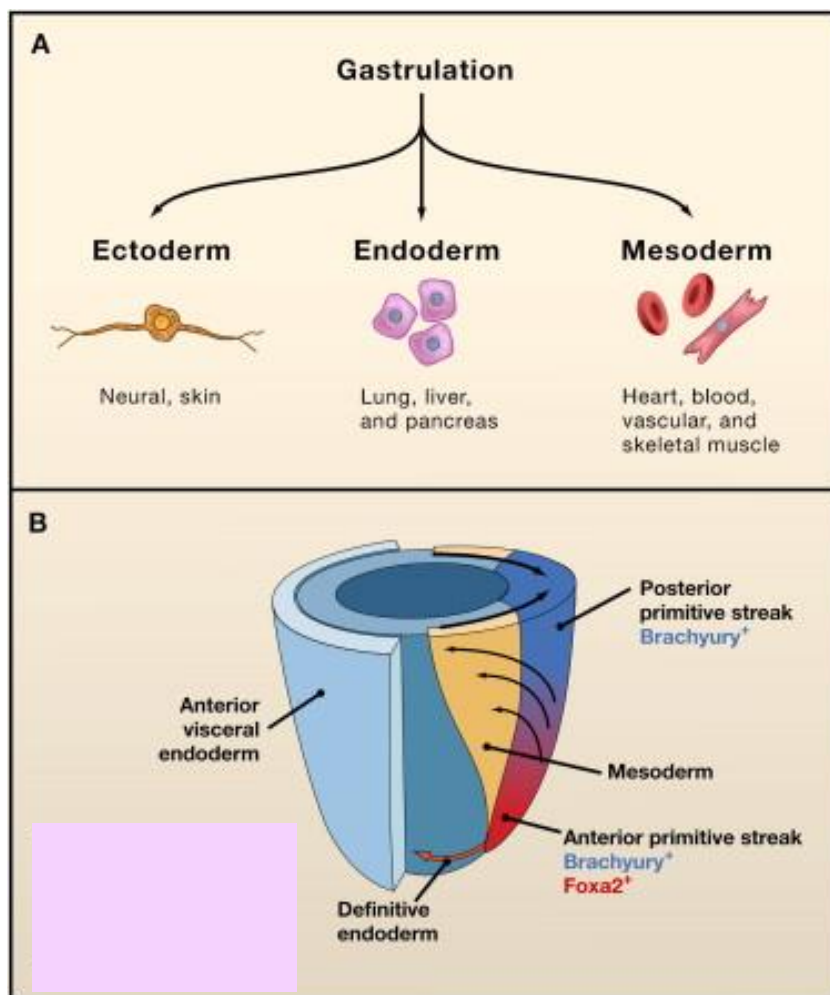


Figura 1.1- Camadas germinativas embrionárias e tecidos originados a partir da mesma. Adaptado de [12].

1.2.1. Células Estaminais Fetais

As células estaminais fetais utilizadas no tratamento de doenças neurodegenerativas são isoladas por disseção de parte do sistema nervoso do feto. Estas células são utilizadas em transplantação pelas suas vantagens, nomeadamente a fácil manipulação e possibilidade de armazenar as células fetais *in vitro* ou por congelação, antes da transplantação [13].

O processo de transplantação é realizado da seguinte forma, as células neuronais fetais em pequenos fragmentos de tecido ou numa suspensão celular são colocados no cérebro do doente, onde se deseja suplementar neurónios que estejam disfuncionais. O tecido fetal utilizado contém o tipo particular de progenitores neuronais dos neurónios afetados pela doença no doente como tal, estas células imaturas devem integrar o cérebro do hospedeiro para a restituição da funcionalidade neuronal (*Figura 1.2*). O material fetal para o transplante é obtido de fetos de abortos espontâneos ou induzidos (interrupção voluntária da gravidez), sendo proibida a utilização de técnicas de fertilização *in vitro* para a obtenção de tecido fetal humano para fins de investigação/intervenções clínicas [13].

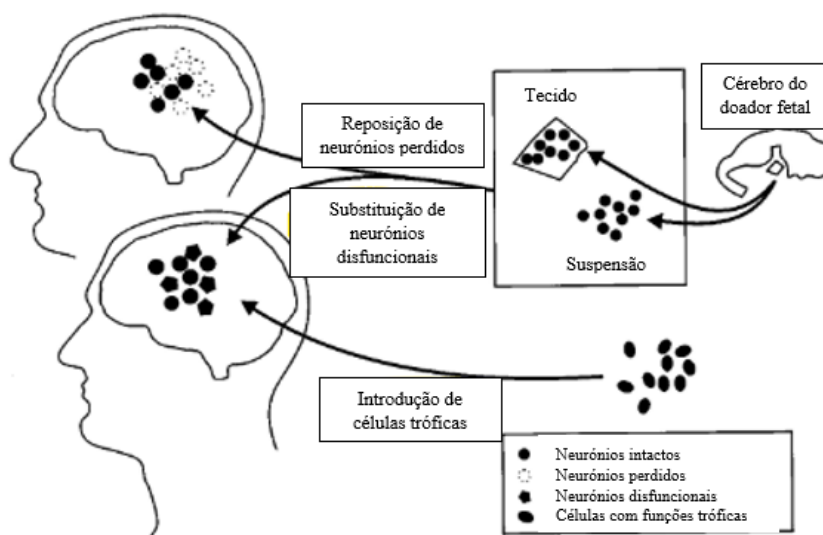


Figura 1.2- O princípio da neurotransplantação em doenças neurodegenerativas. Adaptado de [13].

O transplante de células estaminais fetais desencadeia mecanismos de regulação da proliferação celular e neuroprotecção e intervém também na reparação ou na substituição de neurónios danificados. Por outro lado, a utilização de tecido fetal levantou questões éticas em relação à utilização de material obtido de fetos humanos na transplantação, bem como problemas a nível da segurança devido aos riscos induzidos pela transplantação, como a exacerbação do crescimento do tecido transplantado ou pelo desenvolvimento de quistos e a ocorrência de hematomas subdurais [13].

No entanto, estas células já foram utilizadas com sucesso em ensaios clínicos, nomeadamente, nos estudos de Lindvall O. *et al* (1990) e Jeffrey H. *et al* (1995) que tiveram grande influência no desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas, com base na terapia celular, a adotar na doença de Parkinson. Após transplante do tecido mesencefálico de origem fetal, o doente apresentou melhorias tanto na função motora (a insuficiência de dopamina no estriado provocada pela degeneração de neurónios dopaminérgicos causa disfunção motora, sendo um dos sintomas mais característicos da doença), como no aumento progressivo da captação de fluorodopa (captada pelos neurónios dopaminérgicos, o seu efeito) no cérebro (*Figura 1.3*). Ou seja, o quadro clínico de melhoria do doente e o aumento da captação de F-dopa, na topografia por emissão de positrões (PET), foram associadas à sobrevivência do tecido transplantado [6,14].

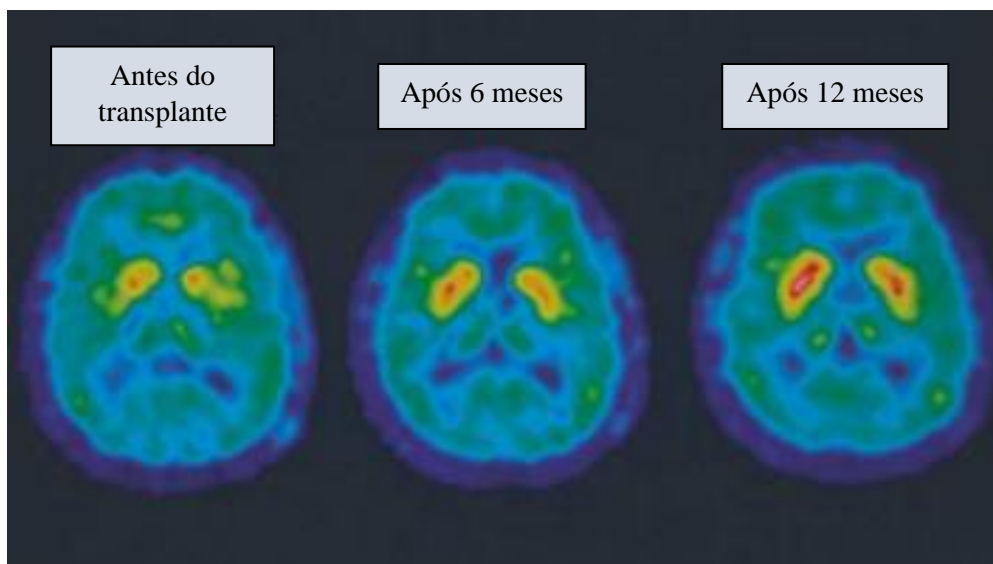


Figura 1.3- Scan da topografia por emissão de positrões (PET) que ilustra o aumento progressivo da fluorlevodopa na zona putaminal do cérebro, antes e após o transplante. Adaptado de [14].

1.2.2. Células Estaminais Embrionárias

A linhagem celular do carcinoma embrionário foi a primeira linhagem celular pluripotente a ser estabelecida, a partir de células germinativas de murganhos e também de humanos, mediante estudos realizados por Finch BW, Ephrussi B. (1967). Estas células podem proliferar e serem mantidas indefinidamente em meio de cultura, mas podem também ser induzidas a processos de diferenciação, dando origem a células das três camadas germinativas embrionárias, a endoderme, ectoderme e mesoderme (*Figura 1.1*) [15]. No entanto, como se trata de células com origem cancerígena, não têm aplicabilidade clínica.

Em 1981, foram isoladas pela primeira vez células estaminais embrionárias (ESC) de murino, com base nos estudos anteriormente desenvolvidos para a linhagem do carcinoma embrionário [16,17].

As ESC derivam do blastocisto pré-implantado que, se caracteriza por uma “esfera oca” de células contendo uma camada externa de células trofoblásticas que originam a placenta e a camada interna da massa celular. Esta camada interna é responsável pela formação do embrião [18]. É a partir destas células da camada da massa celular interna do blastocisto que as ESC são isoladas do embrião (*Figura 1.4*). Estas células são colocadas em cultura e em condições apropriadas, mantêm-se indiferenciadas, podendo multiplicar-se indefinidamente *in vitro* e, mostrando competência na formação de diferentes tipos celulares adultos (células diferenciadas) [19].

As ESC têm desencadeado bastante interesse para o seu uso no tratamento de algumas doenças como a doença de Parkinson, diabetes e lesão da medula espinhal [20].

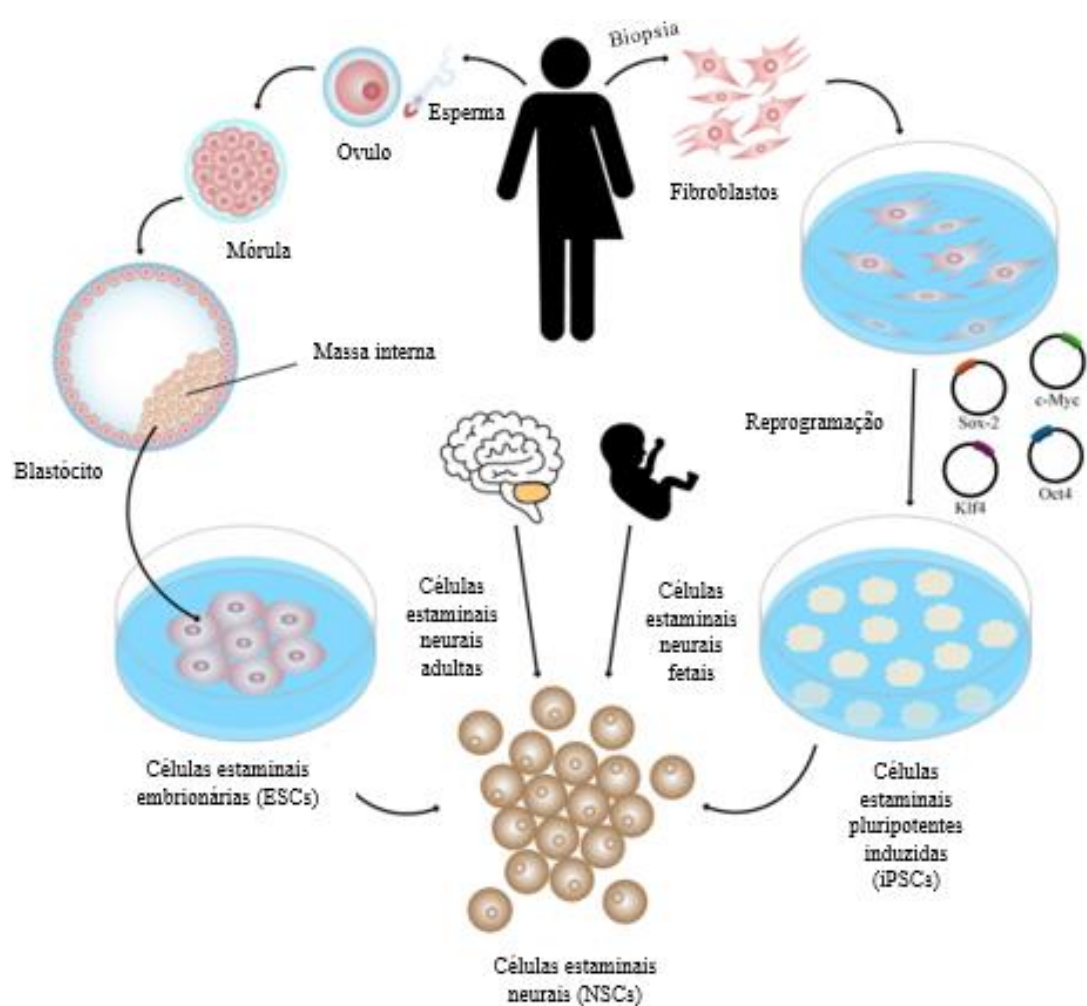


Figura 1.4- Diferentes fontes de células estaminais a serem usadas na regeneração cerebral. Células estaminais pluripotentes, como ESC, obtidas a partir da massa celular interna do embrião blastocisto e iPSC obtidos por reprogramação celular de células somáticas por expressão dos fatores de reprogramação Sox-2, Klf4, c-Myc e Oct4, pode ser padronizado e diferenciado em diferentes tipos de células neurais a serem transplantadas, como células estaminais neurais, que também podem ser isoladas do sistema nervoso em diferentes estádios de desenvolvimento (células estaminais neurais fetais e adultas). Legenda: O, fator de transcrição de ligação ao octâmero 4 (Oct4); S, SRY (sexo determinação da região Y) box 2 (Sox2); K, fator 4 semelhante a Kruppel (Klf4); M, homólogo do oncogene viral da mielocitomatose aviária (c-Myc). Adaptado de [3].

O estudo de Li e colaboradores (2016) demonstrou que ocorreu com sucesso o transplante de células estaminais derivadas do mesencéfalo ventral embrionário humano em um doente que sofria de Doença de Parkinson. É possível observar a sobrevivência do tecido transplantado e a reinervação dopaminérgica densa no putâmen cerebral, através

da análise com o transportador da monoaminase vesicular tipo 2 (VMAT2), que funciona como marcador da dopamina (*Figura 1.5*) [21]. Ao longo dos anos, após o transplante, o doente apresentou melhorias no quadro clínico, não manifestando praticamente rigidez muscular, hipocinesia e tremores significativos.

Apesar do sucesso deste transplante, a viabilidade do tecido transplantado não excedeu os quatorze anos, ocorrendo perda gradual da densidade dopaminérgica do estriado, bem como o aparecimento de inclusões positivas para a ubiquitina e a alfa-sinucleína em 11 a 12% dos neurónios dopaminérgicos do tecido transplantado, refletindo a propagação da proteína responsável pela doença no cérebro do doente e o respetivo comprometimento dos neurónios transplantados [21].

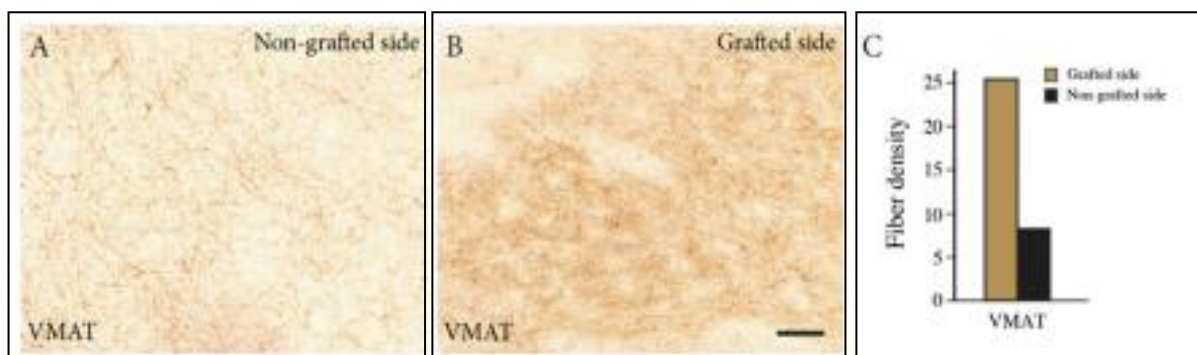


Figura 1.5- Densidade de fibras positivas para VMAT2 no putâmen cerebral do tecido transplantado (B) em comparação com o tecido cerebral do doente não transplantado(A). (C) Quantificação da diferença na inervação positiva para VMAT2, avaliado por densitometria. Adaptado de [21].

1.2.3. Células Estaminais Adultas

O desenvolvimento celular é realizado através de eventos pré-programados no genoma do organismo, como a proliferação celular, expressão de marcadores específicos de uma linhagem celular, progressão ou comprometimento dessa mesma linhagem celular, bem como processos de inibição celular e apoptose programada, que irão influenciar o tipo de células, tecidos e órgãos que constituem o organismo [22].

As células estaminais adultas estão presentes em praticamente todos os tecidos e órgãos do organismo adulto como a pele, o tecido adiposo, o músculo esquelético, o fígado, os rins, o cérebro, o coração, a medula óssea, entre outros, bem como em fluídos corporais (sangue e urina).

Normalmente, as células estaminais adultas são caracterizadas como multipotentes, embora em alguns casos, como na medula óssea, podem ser detetadas

baixas percentagens de células estaminais pluripotentes. É também possível detetar células bipotentes (diferenciam-se em dois tipos de células) ou unipotentes (diferenciam-se em apenas num tipo de células), por exemplo, o caso das células basais na epiderme, células estaminais espermatogónios e células satélites presente no músculo esquelético, respetivamente [23].

1.2.3.1 Células Estaminais Neurais

As células estaminais neurais (NSC) são células estaminais multipotentes isoladas a partir das células estaminais neurais fetais ou adultas que são capazes de se autorrenovar, mantendo a capacidade de originar células progenitoras que, a partir de um estado indiferenciado, se dividem e especializam, dando origem a células diferenciadas do sistema nervoso, os neurónios, astrócitos e oligodendrócitos [8].

Estas células podem ser isoladas diretamente do sistema nervoso, mas também podem ser obtidas a partir de outras células, consideradas precursoras de células progenitoras neurais como as células estaminais embrionárias (ESC) que são células pluripotentes, obtidas a partir da massa celular interna do blastocisto do embrião e as células estaminais pluripotentes induzidas (iPSC), obtidas por reprogramação celular (*Figura 1.4*) [3].

1.3 Reprogramação celular

No século XIX, o biólogo alemão August Weismann, acreditava que a informação genética passava apenas das células germinativas (espermatozoides e óvulos) para as células somáticas, ou seja, a informação hereditária era apenas transmitida das células germinativas e separada das restantes células do corpo que, apesar de sofrerem alterações durante a vida do indivíduo, não afetavam o material genético transmitido à geração. Surgiu assim o conceito da barreira de Weismann [24]. Com o avanço da ciência a teoria de Weismann foi refutada. De facto, os estudos de Gurdon e Wilmut, no âmbito da clonagem, revelaram que as células diferenciadas são flexíveis e podem ser reprogramadas para assumir uma nova identidade celular [25].

1.3.1 Células estaminais pluripotentes induzidas (iPSCs)

Em 2006, Kazutoshi Takahashi e Shinya Yamanaka demonstraram que era possível a indução de células estaminais pluripotentes a partir de fibroblastos embrionários ou de adulto de murganhos através da introdução de quatro fatores de transcrição, Oct3/4, Sox2, c-Myc e Klf4 (*Figura 1.6*) [20, 26].

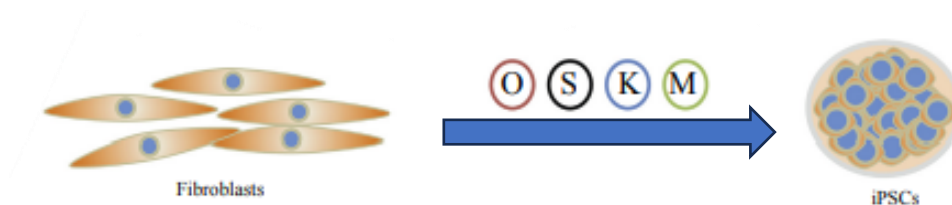


Figura 1.6- Representação esquemática da reprogramação de fibroblastos em iPSCs utilizando os 4 fatores de reprogramação identificados por Yamanaka. O, fator de transcrição de ligação ao octâmero 4 (Oct4); S, SRY-box transcription factor 2: SRY (região determinante do sexo do gene do cromossoma Y) fator de transcrição 2 (Sox2); K, fator 4 semelhante a Kruppel (Klf4); M, homólogo do oncogene viral da mielocitomatose aviária (c-Myc); iPSCs, células estaminais pluripotentes induzidas. Adaptado de [26].

Este estudo teve um enorme impacto na comunidade científica, pois foi comprovada a possibilidade de reversão do estado diferenciado das células a um estado de pluripotência, com grande potencial para originar qualquer tipo celular (das três camadas germinativas) apresentando, assim, uma nova fonte de obtenção de células para a medicina e terapêuticas regenerativas. Em 2012, Shinya Yamanaka e John Gurdon ganham o prêmio Nobel da Medicina pela descoberta das células maduras poderem ser reprogramadas para se tornarem pluripotentes [27].

Para este estudo, foram selecionados 24 genes candidatos a fatores com capacidade de induzir a pluripotência nas células somáticas. Para tal, foi desenvolvido um sistema de ensaio, no qual a indução do estado pluripotente pode ser detetada como resistência ao G418 (aminoglicosídeo de estrutura semelhante à gentamicina) [20].

Inicialmente, foi realizada a transdução destes 24 genes, utilizando um sistema de entrega retroviral, nos fibroblastos embrionários de murganho (MEFs) a reprogramar. Nestes MEFs foi inserido uma cassete *bgeo* (uma fusão dos genes de *β*-galactosidase e gene de resistência à neomicina) no gene *Fbx15* de murganhos por recombinação homóloga. Era espectável que a ativação parcial do *locus* *Fbx15* resultasse

em resistência em concentrações normais de G418. A expressão de Fbx15 é restrita ao desenvolvimento embrionário inicial e às células ES [20].

Em suma, os MEFs gerados a partir da fusão do *locus* do gene da proteína 15 (Fbxo15) com o gene de resistência à neomicina e o gene da beta-galactosidase (em que a sua expressão revela a resistência das células ao G418, porque em células somáticas normais o *locus* Fbxo15 não é expresso) foram usados para analisar o potencial dos 24 fatores de transcrição em estudo para induzir a pluripotência. Várias combinações destes genes foram testadas, avaliando sempre a resistência ao tratamento com G418. Ao longo da análise, foram eliminados vários fatores e o estudo culminou na identificação dos quatro fatores indispensáveis para a reprogramação celular e obtenção de células estaminais pluripotentes induzidas. A pluripotência das iPSCs é avaliada através da capacidade destas células formarem tumores das três camadas germinativas (*Figura 1.7*) [20].

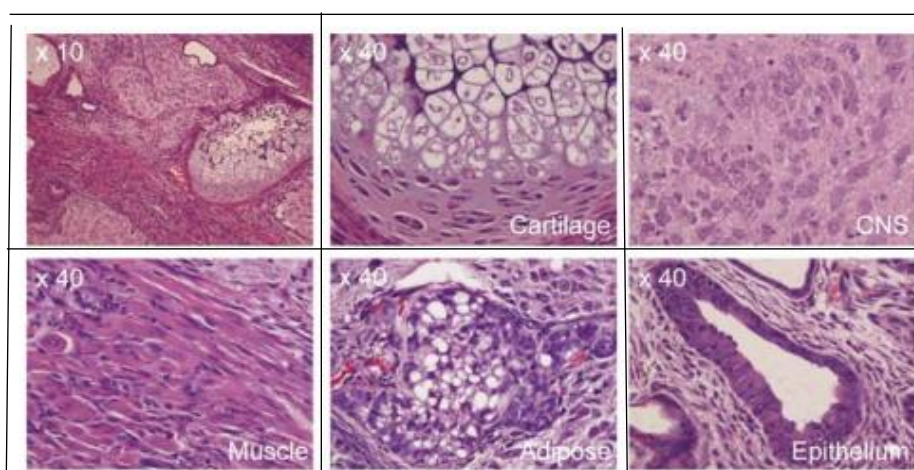


Figura 1.7 - A pluripotência observada das células estaminais induzidas a partir dos fibroblastos embrionários de murganho. Análise histológica. Adaptado de [20].

Deste modo, para a produção de iPSCs, são necessários os fatores de transcrição Oct3/4 e Sox2 que, atuam na preservação da pluripotência e, Klf4 e c-Myc, componentes cruciais associados a células “imortais” [20].

O fator de transcrição 3/4 de ligação ao octâmero, Oct 3/4, também conhecido como POU5F, garante que as células permaneçam pluripotentes ao reprimir os genes envolvidos na diferenciação celular. O fator de transcrição nuclear de exão único, Sox 2, também conhecido como SRY-box2, é um marcador mitótico que regula a manutenção

fenotípica das células estaminais durante o processo mitótico. O fator de transcrição homólogo do oncogene viral da mielocitomatose, c-Myc, atua no aumento da proliferação, pelo que a exacerbação do c-Myc conduz a um aumento dos níveis da proteína p53 que provoca apoptose celular. O p53 atua como supressor tumoral, uma vez que provoca a paragem do ciclo celular, responsável pelo processo de reparação do DNA e da morte celular programada. Por outro lado, o fator de transcrição 4 do tipo kruppel, Klf4, demonstrou inibir diretamente a proteína p53 regulando, assim, a apoptose induzida por c-Myc. Em contrapartida, o Klf4 possui também capacidade para estimular a proteína p21CIP1 que inibe o crescimento celular. Esta capacidade do Klf4 de restringir a proliferação celular pode ser afetada pelo c-Myc que inibe a produção de p21CIP1. Logo, o desenvolvimento de iPSCs depende do equilíbrio entre c-Myc e Klf4 [20,28,29].

Existem mais sítios de ligação c-Myc do que sítios de ligação Oct3/4 e Sox2 previstos no genoma de mamíferos. A proteína c-Myc pode associar-se ao complexo de histona acetiltransferase, o que permite então que, Oct3/4 e Sox2 se liguem aos seus *loci* específicos, facilitando a reprogramação celular [20].

As células estaminais pluripotentes induzidas possuem morfologia, potência celular, propriedades de proliferação, marcadores de pluripotência e padrões de metilação da cromatina semelhante às células estaminais embrionárias, mas também partilham a capacidade para formar corpos embrionários (estruturas multicelulares semelhantes no desenvolvimento embrionário), quimeras viáveis (células originadas de duas fontes distintas com capacidade para se desenvolver em todos os tipos celulares) e teratomas que são tumores que apresentam células das três camadas germinativas. Apesar disto, a obtenção das células embrionárias causa muitos problemas éticos, sendo a utilização destas células proibida em vários países, como já mencionada anteriormente, mas também podem causar reações imunológicas no indivíduo transplantado. Surge assim a necessidade de uma alternativa às células estaminais embrionárias, sendo a utilização de iPSC e outras células obtidas por reprogramação celular, a estratégia mais estudada atualmente e a que detém maior potencial para resultar numa fonte de células mais segura e sem problemas éticos associados e que possam, por isso, ser usadas na prática clínica [30].

1.3.2 Reprogramação celular direta

A reprogramação celular direta pode também ser denominada de transdiferenciação, sendo o processo de mudança do destino celular sem que seja necessário a célula passar pelo estado de pluripotência. Na reprogramação celular direta, é possível cruzar a barreira da camada germinativa, ou seja, pode-se alterar o destino celular pela conversão de uma célula de uma linhagem germinativa noutra célula de camada germinativa diferente (*Figura 1.8*) [31].

Em comparação com a reprogramação de células estaminais pluripotentes induzidas (iPSCs), a reprogramação direta é um processo mais rápido, visto que nas iPSCs ocorre isolamento das células somáticas, seguida de reprogramação para obter pluripotência e só depois ocorre a diferenciação celular (*Figura 1.8*). Constitui também um processo mais eficiente, pois pode ser realizado *ex vivo* no tecido alvo ou *in vivo*. Por outro lado, devido à capacidade de autorrenovação das células estaminais pluripotentes, a reprogramação indireta pode induzir a formação de célula em maior escala quando comparada à reprogramação direta [31].

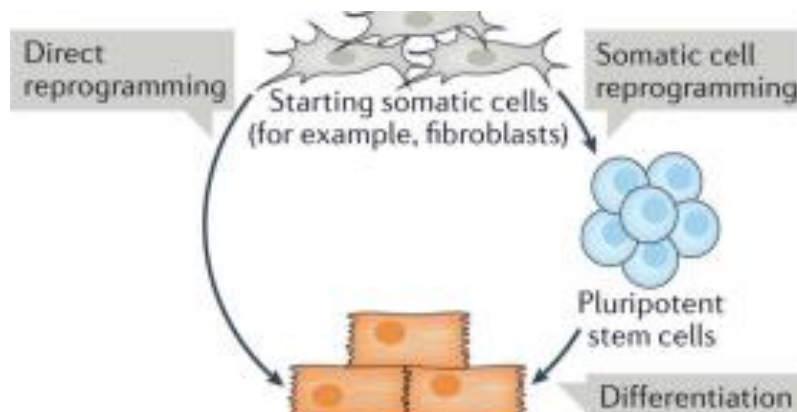


Figura 1.8- Reprogramação direta e Reprogramação indireta. Adaptado de [31].

No caso da reprogramação direta, foi demonstrado que a indução de neurónios gerados a partir de fibroblastos de doadores idosos, tinham a capacidade de reter características transcricionais associadas à idade. Comparando a reprogramação direta com as células estaminais pluripotentes induzidas, as iPSCs não demonstram esta limitação, uma vez que os neurónios derivados de iPSCs são “jovens”, independentemente da idade do doador, sendo, por isso, considerada uma vantagem em relação a esta técnica [32].

A maioria dos estudos realizados com reprogramação celular direta recorreu a vetores virais, retrovírus e lentivírus que, têm a capacidade de integrar transgenes no genoma do hospedeiro, o que aumenta o risco de proliferação celular anormal que potencia a oncogénese.

Atualmente, são várias as tecnologias utilizadas em reprogramação celular direta, por exemplo, a transdução genética sem integração do genoma, a utilização de pequenas moléculas, a reprogramação parcial com condições de cultura específicas e o recurso a microRNAs ou CRISPR/Cas9 [33].

O aumento da expressão dos fatores de transcrição (como Oct4, Sox2, c-Myc e klf4) é uma ferramenta essencial na reprogramação, como tal a transdução genética para expressar os fatores de transcrição sem integração do genoma tem sido estudado como uma das alternativas ao recurso a vetores virais que integram, por exemplo, lentivírus e retrovírus, para a introdução destes nas células do hospedeiro sem que haja risco oncogénico. Os sistemas de vetores que utilizem o vírus Sendai (SeV), um vírus de RNA que não integra o núcleo e se replica no citoplasma, são uma boa alternativa ao uso de vetores virais que integram [34].

Pequenas moléculas podem ser usadas como agonistas ou antagonistas de mecanismos celulares e modularem deste modo as vias dos fatores de transcrição, originando a reprogramação celular. Estas moléculas apresentam diversas vantagens como a estabilidade, penetração celular, não provocam risco de integração no genoma, e são de fácil manipulação [33].

Na reprogramação celular com recurso à transdução dos quatro fatores de transcrição de Yamanaka, o Oct4, Klf4, Sox2 e c-Myc, estes foram inicialmente veiculados com retrovírus para serem introduzidos nas células a reprogramar (fibroblastos de murganho) [20]. Estas células são posteriormente cultivadas, por exemplo, com o fator de inibição para a leucemia (LIF, usado para manter as células num estado indiferenciado) e o fator de crescimento do fibroblasto tipo 2 (FGF-2), para promoverem a formação das células estaminais neurais [35].

Embora alguns artigos sugiram que estas células não são geradas a partir de iPSCs, mas sim de estados intermediários, é difícil excluir a possibilidade de que algumas células possam passar transitoriamente por um estado de pluripotência, durante o processo de reprogramação. Neste caso, através da expressão negativa de um marcador de

crescimento de células cancerígenas, comprovou-se que as células estaminais neurais obtidas não derivavam de um estado de pluripotência [36].

Os MicroRNAs são RNAs de 23 nucleotídeos que regulam a expressão gênica pós-tradução e devido ao seu pequeno tamanho são mais eficientes que o DNA ou o mRNA, no que diz respeito à integração de fatores de transcrição nas células [37]. O *cluster* miR302/367 que contém cinco microRNAs diferentes (miR302a/b/c/d e miR367), destaca-se dos restantes microRNAs, pois apresenta maior expressão nas ESC e iPSCs. No estudo desenvolvido por Frederick Anokye-Danso e colaboradores (2011), avaliou-se o papel da expressão do miR302/367 na reprogramação direta. Para isso, recorreram a um sistema viral que continha uma região de 690 pares de bases que codificavam para as sequências do miR302/367 de murganho, que foi, posteriormente, incorporado em MEFs. Após infecção, observou-se a formação de clones que apresentavam morfologia e expressão de genes de pluripotência semelhantes às ESC, observados através da análise dos níveis de mRNA dos genes de pluripotência por intermédio da técnica de reação em cadeia de polimerase em tempo real (Q-PCR). Para aprofundar a pluripotência destas células, os investigadores geraram teratomas nos murganhos imunodeficientes com múltiplos clones de iPSCs miR302/367 que apresentaram tumores nas três camadas germinativas, nomeadamente, nas fibras musculares, nas células queratinizadas da epiderme e no tecido do epitélio intestinal [38].

Atualmente, os sistemas de edição do genoma em uso provocam a quebra da dupla hélice de DNA, o que pode levar à ocorrência de mutações indesejadas. O sistema CRISPR/Cas9, constituído por um conjunto de repetições palindrômicas curtas regularmente espaçadas (CRISPR) associadas à nuclease Cas9, é uma tecnologia de edição genética que corta sequências de nucleótidos específicas das cadeias de DNA, permitindo assim corrigir erros no genoma [39]. O sistema CRISPR/Cas9 acoplado a um complexo de domínios de ativação transcricional (como o sistema ativador tripartido [dCas9-vpr], mediador de ativação sinérgica [SAM], dCas9-Suntag e o ativador VP64) com substituição da Cas9 por uma enzima sem atividade de nucleasse (dCas9), permite a ativação de genes alvo sem que se seja necessário o corte da dupla hélice de DNA. Este sistema funciona usando RNAs guia modificados para recrutar a nucleasse Cas9 e os complexos de ativação transcricional para atingir *loci* específicos. Por exemplo, quando ativados os genes endógenos Brn2, Ascl1 e Myt11 (fatores de transcrição BAM) ocorre

remodações na estrutura da cromatina que permite a conversão dos fibroblastos embrionários de murganhos em células neurais induzidas [40,41].

Para que a reprogramação celular direta seja realizada de forma segura e eficiente, são necessárias análises dos mecanismos moleculares e celulares da expressão gênica envolvidos, a transição do transcriptoma, a avaliação do comportamento dos fatores de transcrição (compreender o seu efeito singular, mas também a sua capacidade de recrutar outros fatores de transcrição), a remodelação epigenética envolvida na obtenção das células alvo que provocam alterações rápidas no estado da cromatina das células reprogramadas, e estudo da heterogeneidade da população celular (*Figura 1.9*) [33].

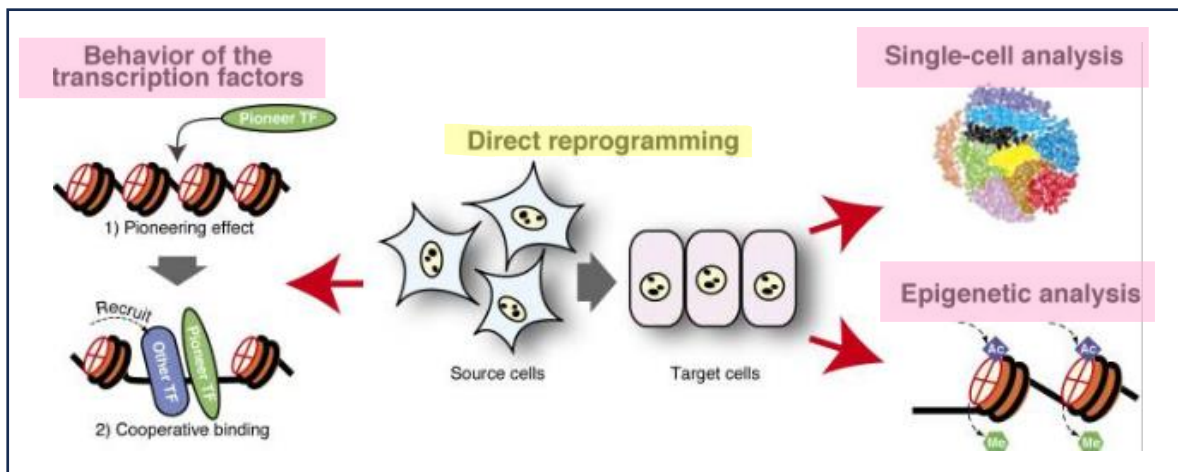


Figura 1.9- Reprogramação celular direta: mecanismos de reprogramação e avaliação das células obtidas. Adaptado de [33].

1.3.3 Reprogramação celular utilizando pequenas moléculas

A combinação de pequenas moléculas pode induzir a reprogramação celular sem que seja necessária a introdução de genes no genoma das células.

As pequenas moléculas são compostos bioativos que modulam as vias celulares envolvidas na sinalização, mas provocam também alterações de transcrição, epigenéticas e metabólicas [42, 43].

1.3.3.1 Pequenas moléculas que regulam as vias de sinalização dos fatores de transcrição

A manutenção da pluripotência e autorrenovação celular envolve várias vias de sinalização. Portanto, pequenas moléculas que ativem estas vias, podem auxiliar a

promover a reprogramação celular (dependendo do cocktail de pequenas moléculas usadas). Está descrito que a ativação da via de sinalização Wnt, a inibição das vias de sinalização do TGF- β e MAPK/ERK estão envolvidas neste processo (*Tabela 1.1*) [44, 45].

Tabela 1.1- Pequenas moléculas que regulam as vias de sinalização dos fatores de transcrição envolvidos na reprogramação celular. Adaptado de [42].

Vias de sinalização	Pequenas moléculas	Efeito
Ativação da via Wnt	CHIR99021 Kenpaullone	Pode induzir a expressão de genes associados à pluripotência.
Inibição da via TGF- β	SB431542 Repsox A83-01	Facilita a transição entre o tecido mesenquimal e epitelial e promove o estadió inicial da reprogramação celular.
Inibição da via MAPK/ERK	PD0325901	Suprime a diferenciação das células estaminais pluripotentes e promove o estadió final da reprogramação celular.

1.3.3.2 Pequenas moléculas que provocam alterações epigenéticas envolvidas na reprogramação celular

A superação das barreiras epigenéticas estabelecidas no desenvolvimento celular é necessária para a reprogramação das células somáticas, como tal, se as pequenas moléculas tiverem como alvo os genes modificadores epigenéticos, irão conseguir direcionar a reprogramação (*Tabela 1.2*) [46].

Tabela 1.2-Pequenas moléculas que provocam alterações epigenéticas e efeito associado. Adaptado de [42].

Alterações epigenéticas	Pequenas moléculas	Efeito
Inibição da metilação do DNA	5-azacitidina, RG108, 3-deazaneplanocina A	Ativa os genes de pluripotência e promove a reprogramação
Inibição da desacetilação das histonas	Ácido valpróico, tricostatina A, butirato de sódio, ácido suberanilohidroxâmico	Aumenta a expressão de genes associados à pluripotência e a eficácia da reprogramação
Modulação da metilação e acetilação das histonas	Vitamina C, BIX-01294, EPZ004777, Tranilcipromina	Pode ocorrer ativação ou repressão dos genes.

As pequenas moléculas podem ser combinadas com os fatores de transcrição Oct4, Sox2, Klf4 e c-Myc (OSKM), facilitando a reprogramação das iPSCs, através da inibição dos reguladores da cromatina ou das vias de sinalização da proteína quinase [47].

A metilação do DNA (modificação química que resulta da ligação de um grupo metil ao carbono 5 da citosina) é um processo que pode suprimir a transcrição de alguns genes, bloqueando o acesso dos fatores de transcrição aos promotores dos genes, devido a promoverem a alteração da estrutura da cromatina para formas mais condensadas. No caso dos genes de pluripotência, como possuem promotores hipermetilados, não conseguem ser transcritos. Portanto, para reprogramar de forma eficiente estes genes é necessário inibir a metilação do DNA [48].

As histonas são proteínas estruturais que organizam o DNA na cromatina, também desempenham um papel crucial na regulação da expressão genética. Ao modificarem o grau de condensação da cromatina, as histonas determinam o quão acessível à transcrição os genes se encontram. Isto torna a metilação e a acetilação das histonas essenciais para modular a expressão do DNA e, conseqüentemente, conduzir a reprogramação celular. Compreender a importância destes processos na regulação genética é fundamental para auxiliar a reprogramação celular mediada por pequenas moléculas [48].

1.3.3.3 Pequenas moléculas que regulam alterações metabólicas

Um grande número de células estaminais neurais e células com elevado ritmo de proliferação dependem em grande parte da glicólise aeróbica para a promoção do seu crescimento, uma vez que os estados de hipoxia promovem a sobrevivência de células da crista neural bem como das células estaminais hematopoiéticas e impede a diferenciação das ESC humanas. Logo promovem a reprogramação e formação de células estaminais pluripotentes [49]. Pequenas moléculas que melhorem a transição de estados de fosforilação oxidativa para processos de glicólise promovem a reprogramação celular (*Tabela 1.3*).

Foi ainda evidenciado que pequenas moléculas que induzam o processo de autofagia, melhoram a reprogramação celular, pois ocorre uma rápida renovação de organelos celulares e moléculas citoplasmáticas importantes para o crescimento da célula [50] (*Tabela 1.3*).

Tabela 1.3 - Pequenas moléculas que provocam alterações metabólicas e efeito associado. Adaptado de [42].

Alterações metabólicas	Recetores	Efeito
Glicólise	PS48, Frutose 2,6-bifosfato Quercetina	Aumentam a eficiência da reprogramação
Autofagia	Rapamicina e PP242	

Em 2013, foi desenvolvido o primeiro estudo usando apenas pequenas moléculas em reprogramação celular (*Figura 1.10*). Recorreram para tal a uma combinação de ácido valpróico sódico, CHIR99021, 616452, tranilcipromina e forskolina, cujos mecanismos celulares estão indicados na Tabela 1.4 [51-55].

Tabela 1.4- Pequenas moléculas usadas na reprogramação celular e seus mecanismos. Adaptado de [51].

Pequenas moléculas	Mecanismo
Ácido valpróico sódico	Inibidor da histona desacetilase e promove a proliferação das células estaminais
CHIR99021	Derivado da aminopirimidina, inibe a síntese de glicogénio quinase 3 α (envolvido na manutenção da célula estaminal)
RepSox (E-616452)	Inibidor do Recetor do fator de crescimento beta; antagoniza a função da quinase do recetor I/II de TGF- β
Tranilcipromina	Inibidor da monoaminoxidase inibidor de desmetilase específica para a lisina tipo I (LSD1) (envolvido na manutenção da célula estaminal)
Forskolina	ativador da adenilil ciclase, envolvia no ciclo celular
TTNPB	Análogo do ácido retinoico, que atua como <i>booster</i> da reprogramação celular
DZNep	Modulador epigenético

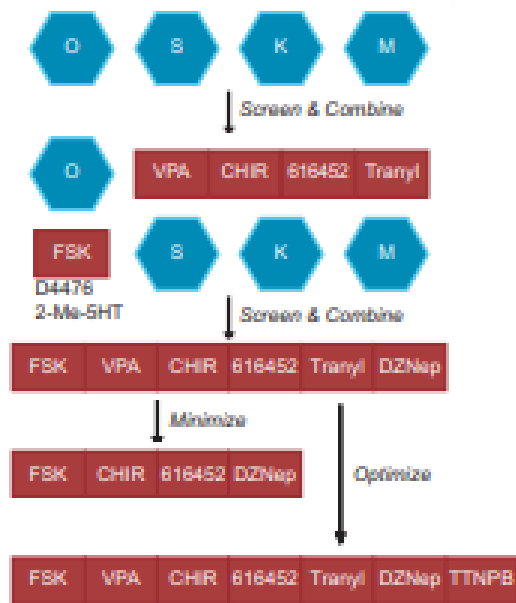


Figura 1.10 - Representação esquemática dos passos envolvidos na reprogramação celular usando pequenas moléculas. Adaptado de [51]).

Neste estudo, investigaram-se moléculas que potenciassem a reprogramação na ausência dos fatores OSKM. Efetuaram um *screen* de moléculas e identificaram a Forscolina (FSK), a 2-metil-5-hidroxitriptamina (2-Me-5HT) e o D4476, como moléculas que podem substituir o fator OCT4. Estas foram combinadas com o ácido valpróico (VPA), CHIR99021 (CHIR), E-616452, Tranilcipromina (Tranyl) e DZNep para a reprogramação da linhagem de fibroblastos embrionários de murganhos (Figura 1.10). Nas células somáticas, o fator OCT4 é reprimido por modificações epigenéticas, mas na reprogramação é desbloqueado pelo modulador epigenético DZNep. Por fim, foi adicionado o TTNPB que atua como *booster* da reprogramação celular [51].

Em suma, este estudo mostrou ser possível alcançar a pluripotência das células somáticas, recorrendo apenas a pequenas moléculas pela modulação das vias moleculares de pluripotência ao invés da introdução de genes/fatores de reprogramação. Esta descoberta fez aumentar o conhecimento relativo à identidade celular e a possibilidade de alteração funcional das células para fins medicinais, sem que seja necessário recorrer, por exemplo, à introdução de genes nas células, o que está associado a instabilidade genómica e pode constituir um problema de segurança das células manipuladas geneticamente [51].

Capítulo II

2.1 Mecanismos terapêuticos de ação das células estaminais

2.1.1 Substituição celular

Nos últimos vinte anos, surgiu a necessidade de procurar novos protocolos de tratamento para doenças cerebrais como, por exemplo, a doença de Parkinson, Alzheimer e Huntington, nomeadamente, a introdução de células no SNC que possam substituir componentes celulares em falta ou disfuncionais, designadamente, neurónios, astrócitos e oligodendrócitos, restaurando a função cerebral [56].

Com o objetivo de substituir as células disfuncionais resultantes das doenças cerebrais, é possível recorrer às células estaminais que possuem grande potencial para estimular a neurogênese, pois existem nichos de células estaminais, localizados em todo o organismo, que são ativadas quando há lesão celular. Por “nichos” compreende-se um microambiente, ou seja, um conjunto de estruturas celulares nos tecidos e órgãos que têm capacidade de suportar as células estaminais através do fornecimento de sinais extrínsecos (por exemplo, sinalização por moléculas intercelulares, comunicação entre células, interação com a matriz celular, entre outros) que, em combinação com fatores intrínsecos, conseguem modular o comportamento destas células, quer na autorrenovação quer na diferenciação [57, 58].

Foi demonstrado que as células estaminais adultas, presentes nos nichos do sistema nervoso, permanecem em estado quiescente até serem estimuladas por sinais intrínsecos do nicho e fatores extrínsecos à migração tecidual. As células estaminais adultas são dos poucos tipos celulares que retêm capacidade de migrar sob estímulos apropriados, permitindo-lhes manter a homeostase dos tecidos e mediar a reparação e regeneração cerebral [59].

A diferenciação das células estaminais do SNC em oligodendrócitos, astrócitos e neurónios é facilitada pela presença de citocinas e fatores de crescimento que atuam em etapas específicas do processo de diferenciação [60,61].

Existem diferentes abordagens para a aplicação de tecnologias emergentes com células estaminais neurais na substituição celular no sistema nervoso (SN) (*Figura 2.1*), que se encontram abaixo descritas:

1) As células estaminais neurais podem ser isoladas do SN em desenvolvimento e cultivadas *in vitro*. As células estaminais embrionárias (ESC) fornecem uma alternativa de gerar culturas de células estaminais neurais, dada a possibilidade de induzir a diferenciação das ESC em precursores neurais, os quais podem ser selecionados a partir destas culturas diferenciadas [62].

2) A identificação de células estaminais neurais no sistema nervoso central (SNC), permite que através da administração de fatores de crescimento como FGF e EGF, ou citocinas, se possam estimular as células dos nichos de células estaminais a ativarem processos endógenos de reconstrução e reparação celular, mas também potenciar a diferenciação das células estaminais do SNC em oligodendrócitos, astrócitos e neurónios [60-62].

3) O isolamento celular e posterior reprogramação celular em precursores neuronais e crescimento *ex vivo* das células estaminais do próprio doente, aumentariam o número de células disponíveis para a substituição celular, evitando quaisquer problemas imunológicos associados à abordagem clínica [62].

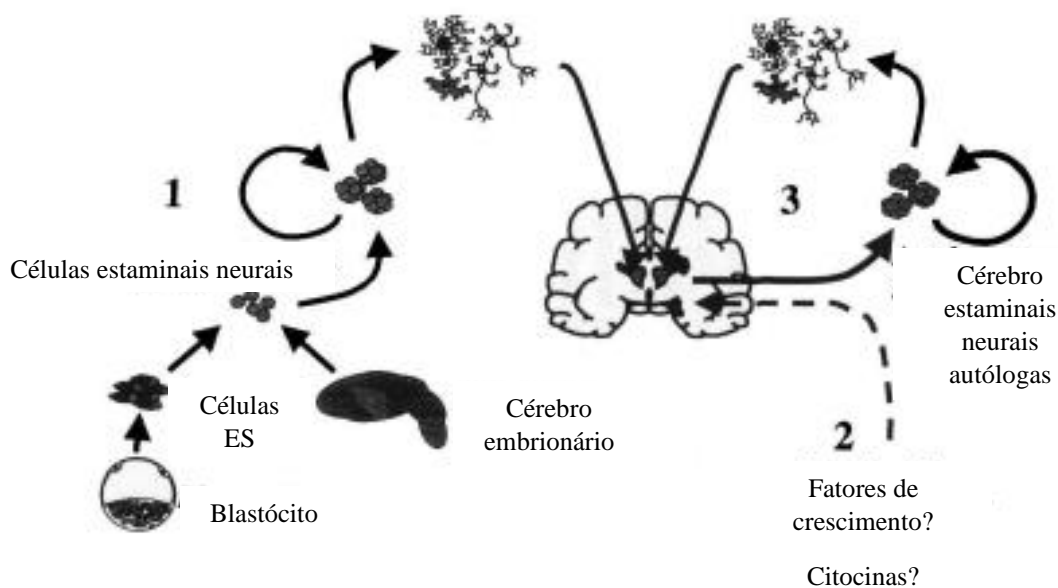


Figura 2.1- Abordagem do uso de células estaminais neurais na substituição celular no sistema nervoso. (1) As células estaminais neurais podem ser isoladas do sistema nervoso em desenvolvimento e cultivadas *in vitro*. (2) Através da administração de fatores de crescimento como FGF e EGF, ou citocinas, pode-se estimular as células dos nichos de células estaminais a ativarem processos endógenos de reconstrução e reparação celular. (3) O isolamento celular e posterior reprogramação celular em precursores neuronais e crescimento *ex vivo* das células estaminais do próprio doente. Adaptado de [62].

Os oligodendrócitos são células do sistema nervoso cuja principal função é a síntese e manutenção das bainhas de mielina que isolam o axônio no SNC, responsáveis pela condução dos impulsos elétricos ao longo da fibra nervosa [63]. Para utilizar ESC na diferenciação em oligodendrócitos, é necessário que estas células sejam orientadas por vias de sinalização para a obtenção dos progenitores dos oligodendrócitos para posterior diferenciação em células maduras e especializadas (*Figura 2.2*).

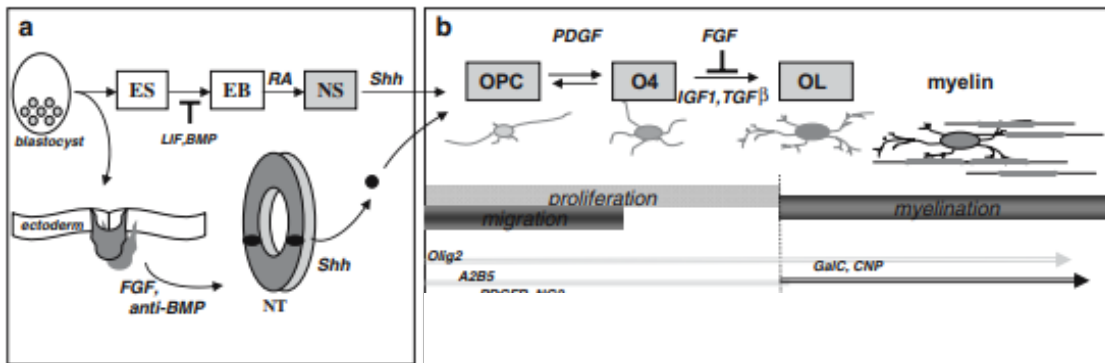


Figura 2.2- Desenvolvimento de oligodendrócitos a partir de células estaminais embrionárias. Células estaminais embrionárias (ES); Corpos embrionários (EB); Células estaminais neurais (NS); Tudo neural (NT); Ácido retinóico (RA); via de sinalização Sonic Hedgehog (Shh); fator de crescimento de fibroblastos (FGF); proteína morfogénica óssea (BMP); fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF); fator de crescimento de fibroblastos (FGF); precursor de oligodendrócitos (OPC); progenitor do oligodendrócitos (O4); oligodendrócitos (OL). Adaptado de [64].

As ESC, isoladas a partir da massa celular interna do embrião, dão origem aos corpos embrionários na presença do fator de inibição para a leucemia e da proteína morfogénica óssea (BMP). A BMP está envolvida na diferenciação da ectoderme através dos reguladores da via inibitória (Id) que bloqueiam o processo de neurogênese. Seguidamente, os corpos embrionários originam células estaminais neurais na presença de ácido retinóico [20,65,66]. As células estaminais neurais podem depois serem induzidas em neurónios ou glia.

O processo de gliogénese, formação de células da glia (oligodendrócitos, astrócitos, células endimárias e células de Schwann) no sistema nervoso central e periférico, é promovido pelo fator da via de sinalização Sonic Hedgehog (SHH) que promove indução ventral [60,67,68] induzindo as células a OPC (células precursoras de oligodendrócitos). Posteriormente, as culturas são transferidas para um meio com o fator

de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) que promove a proliferação e sobrevivência do precursor dos oligodendrócitos, mas também com a presença de FGF, IGF1 (fator de crescimento semelhante à insulina) e TGF β (fator transformador de crescimento β) para induzir e direcionar a diferenciação em oligodendrócitos, bloqueando assim a formação de outras células [60-64].

Um estudo desenvolvido por Mi-Yoon Chang e colaboradores em 2003, revela quais os fatores que tendem a estimular a diferenciação de células estaminais em neurónios ou astrócitos, através do estudo dos mecanismos moleculares subjacentes à diferenciação destas células, identificando assim proteínas e genes específicos que regulam estas vias de diferenciação. O estudo demonstrou que os neurónios adultos segregam o fator neutrófico derivado do cérebro (BDNF) e a proteína neutrofina humana recombinante do tipo3 (NT3) que direcionam as células estaminais do SNC a se diferenciarem em neurónios enquanto os astrócitos segregam o fator neutrófico ciliar (CNTF) para induzir a diferenciação. Ambas as células segregam BMP, mas o efeito da molécula é dependente da concentração da mesma no meio. Os neurónios segregam níveis baixos de BMP ao contrário dos astrócitos que induzem a diferenciação das células estaminais ao segregarem níveis elevados de BMP [61].

Num estudo desenvolvido por Andrea Comella-Bolla e colaboradores, foi realizada a caracterização passo a passo da expressão génica e dos níveis funcionais da diferenciação das linhas hiPSCs e hESC, para obtenção de neurónios ventrais do prosencéfalo funcionalmente maduros (*Figura 2.3*). A diferenciação neural *in vitro* pode ser dividida em três fases, a indução neural, a regionalização de progenitores neurais e por fim, a diferenciação e maturação neural terminal. A indução neural de hiPSCs e hESC requer a inibição da via de sinalização Wnt/ β -catenina e da proteína morfogenética óssea (BMP), as vias implicadas na manutenção da pluripotência. Todas as hPSCs foram cultivadas em soro que contém bFGF humano recombinante e TGF β humano recombinante. Após 8 dias, as hPSCs tornam-se células progenitoras da neuroectoderme (NE) [69].

Os progenitores NE são regionalizados para o mesencéfalo e prosencéfalo pela contínua inibição da sinalização Wnt/ β -catenina e da proteína morfogenética óssea, respetivamente. As células neuroepiteliais foram especificadas com sucesso para uma identidade NPC do prosencéfalo. Durante a terceira fase, estão envolvidas várias

pequenas moléculas que estimulam a saída do ciclo celular seguida de neurogênese e sinaptogênese atingindo a maturação neural, necessária para a sobrevivência, integridade e funcionamento cerebral [69].

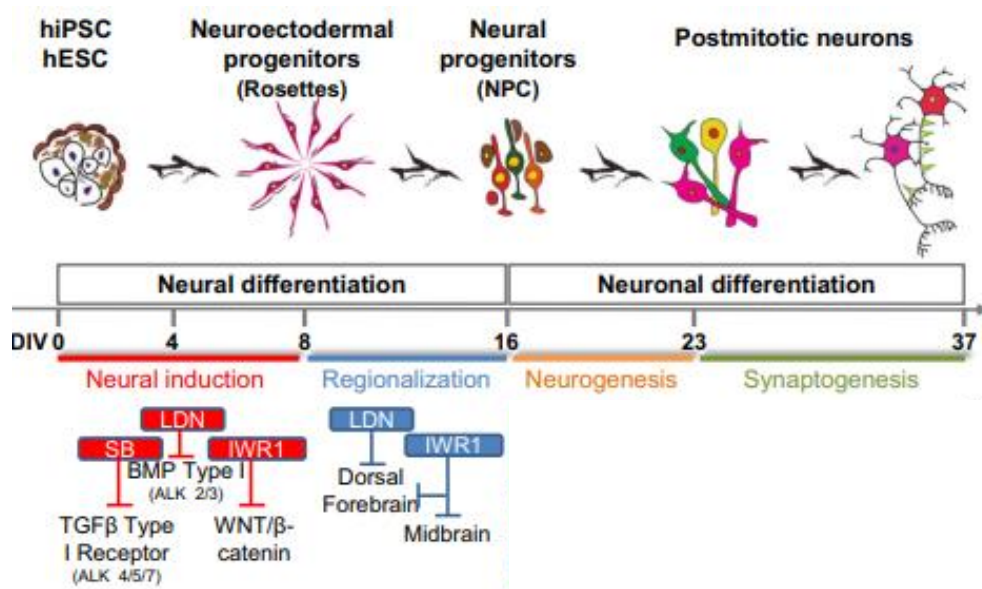


Figura 2.3- Protocolo de diferenciação *in vitro* de células estaminais embrionárias humanas (hESCs) e células estaminais pluripotentes humanas induzidas (hiPSCs) em neurônios. Dias *in vitro* (DIV); inibidor seletivo do recetor do fator de crescimento transformador beta tipo I (TGF β) (ALK4/5/7) (SB); inibidor do recetor da proteína morfogénica óssea tipo I (ALK2/3) (LDN); via de sinalização WNT; Inibidor da via de sinalização WNT (IWR1); RA: ácido retinoico; CHIR: CHIR99021 / GSK3 Inibidor / WNT Ativador; DPT: (GSI-IX) γ -Secretase inibidor; AA: ácido ascórbico; FK: forskolina (ativador da adenilil ciclase). Adaptado de [69].

Os astrócitos são um tipo importante de células glial, presente em todo o sistema nervoso e que desempenham funções como reguladores da formação e função de sinapses durante o desenvolvimento neural. Embora a neurogênese preceda a astrogênese no córtex cerebral, as sinapses neuronais só se começam a formar após a formação dos astrócitos, o que demonstra o seu importante envolvimento na manutenção do sistema nervoso [70]. No estudo de Laurent Roybon e colaboradores é relatado que através do uso de fatores de sinalização, os astrócitos da medula espinal de murganhos ou humanos gerados a partir de ESCs ou hiPSCs, podem ser induzidos a adotar fenótipos que correspondem aos de astrócitos maduros *in vivo*. Para acelerar a produção de astrócitos, inibiu-se sinalização SMAD (com ação do inibidor SB431542 juntamente com LDN193189 que atuam no fator de crescimento transformador beta do tipo I (TGF β) e na proteína morfogenética óssea (BMP), respetivamente). Por forma a direcionar as células para as zonas caudal e ventral foi adicionado ácido retinóico (RA) e a proteína SHH com

mutação na cisteína (SHH-C), também foram adicionados fatores neurotróficos derivados do cérebro (BDNF) para promover a sobrevivência neural. Posteriormente, foi adicionado um suplemento ao meio (B27) e outros fatores neurotróficos como o fator neurotrófico ciliar (CNTF), fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-1) e fator neurotrófico derivado da linhagem de células gliais (GDNF). Os autores também observaram que a exposição curta ao FGF1 e FGF2 (fator de crescimento de fibroblastos 1 e 2, respectivamente) foi suficiente para direcionar esses astrócitos seletivamente para um fenótipo maduro, gerando assim astrócitos da medula espinal humana com capacidade para serem aplicados em doenças que envolvem perda da ação dos astrócitos nos neurónios motores (*Figura 2.4*) [71].

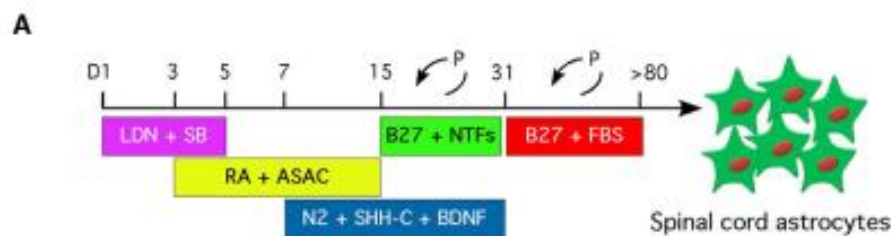


Figura 2.4- Processo utilizado para gerar astrócitos derivados de células estaminais embrionárias humanas e células estaminais pluripotentes induzidas humanas. (Legenda: Passagem (P); LDN193189 (LDN); SB431542 (SB); ácido ascórbico (ASAC); fatores neurotróficos como CNTF, BDNF, IGF-1, GDNF (NTFs); ácido retinóico (RA); via de sinalização sonic hedgehog cisteína mutada (SHH-C); suplemento N2 e B27; soro bovino fetal (FBS); fator neurotrófico ciliar (CNTF); fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-1); fator neurotrófico derivado da linhagem de células gliais (GDNF). Adaptado de [71].

A substituição celular não resolve o problema subjacente à doença, apenas soluciona temporariamente a disfunção neural. Existe também o problema de rejeição imunológica em transplantação alogênica, para além da utilização de ESC acarretar riscos carcinogénicos. Apresentando, por isso, esta técnica limitações na prática clínica [64].

2.1.2 Efeito espectador (Bystander Effect)

As células estaminais neurais transplantadas possuem também capacidade para induzir o efeito *Bystander* que se refere à resposta biológica das células resultante de um evento que ocorre no ambiente envolvente ou de uma célula próxima. Tal efeito depende da comunicação intercelular entre as células estaminais e as células do hospedeiro

[72,73]. O efeito espectador compreende o aumento dos níveis de fatores neurotróficos, redução da neuroinflamação e aumento da neurogênese.

2.1.2.1. Aumento dos fatores neurotróficos

Em 2014, Liang e colaboradores desenvolveram um estudo onde utilizaram meio de cultura condicionado de células estaminais neurais para estudarem o mecanismo de neuroproteção destas células. Os resultados demonstraram que a administração contínua de meio condicionado diminui a apoptose dos neurónios, aumenta a ligação entre o trato cortico-espinal e os neurónios intermédios e auxilia na recuperação da função motora de murganhos com lesões na medula espinal. Este efeito está associado à presença de fatores neutróficos que controlam o desenvolvimento e manutenção de células neuronais e gliais, como o fator nutriente derivado de células glia (GDNF), fator neutrófico ciliar (CNTF), fator de crescimento nervoso (NGF), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), neutrofina 3 (NT3) e fator neutrófico derivado do cérebro (BDNF) libertados no meio de cultura pelas células estaminais neurais [74,75].

Após ligação dos fatores neutróficos EGF, FGF, neurotrofinas (a que pertence o BDNF, NT3) e VEGF aos recetores, forma-se um dímero e os domínios intracelulares de tirosina quinase são ativados. A mesma ativação ocorre após as GDNF, pertencentes ao grupo do fator transformador de crescimento beta (TGF β), se ligar ao recetor GFR alfa e c-ret formando um monómero. O CNTF, pertencente ao grupo das citosinas, liga-se ao recetor dimérico ou trimérico e ativa a proteína tirosina quinase intracelular como a JAK [74]. Os fatores neutróficos, através da ligação aos recetores, promovem a ativação das três vias de sinalização principais, a cascata de sinalização MAPK/ERK, PI3-K e PLC γ , que estão envolvidas na neurotransmissão, neuroplasticidade, sobrevivência, crescimento e diferenciação neuronal, desencadeando assim os mecanismos de neuroproteção (*Figura 2.5*) [76].

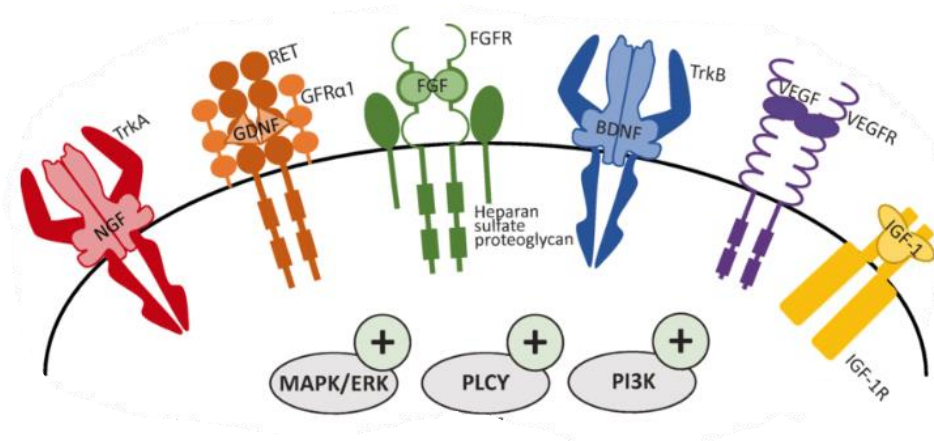


Figura 2.5- Diferentes receptores dos fatores neurotróficos. Legenda: fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF); receptor B de quinase relacionado à tropomiosina (TrkB); fator de crescimento de fibroblastos (FGF); receptor do fator de crescimento de fibroblastos (FGFR); fator de crescimento endotelial vascular (VEGF); receptor do fator de crescimento endotelial vascular (VEGFR); fator neurotrófico derivado de linhagem de células gliais (GDNF); receptor- α da família GDNF (GFR α 1); fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-1); receptor do fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-1R); fator de crescimento nervoso (NGF); receptor A de quinase relacionado à tropomiosina (Trka). Adaptado de [76].

2.1.2.2. Redução da neuroinflamação

A sinalização celular é a base da comunicação e a troca de informação entre as células. A comunicação demonstrada a longo prazo entre o tecido transplantado e o hospedeiro leva à ocorrência de efeitos tróficos essenciais nas células cerebrais endógenas/do hospedeiro e à modulação de processos regidos pelo sistema imunitário na resposta imune inata e adaptativa, promovendo, deste modo, a restauração do SNC danificado. Ao longo do tempo, a comunicação das células estaminais neurais com o sistema imune tem vindo a ser discutido, por forma a definir o mecanismo e potencial efeito terapêutico [77].

Antes de entrar em detalhe no processo de redução da neuroinflamação desempenhado pelas células estaminais, é importante explicar a imunogenicidade associado ao processo de transplante de células estaminais. A rejeição do organismo ao tecido transplantado está associada ao reconhecimento direto das células que expressam o complexo principal de histocompatibilidade (MHC) do doador, pelos linfócitos T (TCD8 e TCD4) do recetor ou indiretamente através da degradação dos péptidos derivados do MHC do doador por mecanismo de processamento de antígeno e apresentação por moléculas apresentadoras de antígeno (APCs) [78].

Existe evidência de que as células estaminais possuem alguma propriedade de imunotolerância que lhes permita “escapar” do reconhecimento como substância “estranha” pelo organismo. De facto, foi provado que as células estaminais mesenquimais humanas (MSCs) possuem uma expressão mínima de antígenos de MHC II e moléculas co-estimuladoras das células T (CD80, CD86 e CD40), o que dificulta o seu reconhecimento pelo sistema imune. Para além desta característica, foi também avaliado se as MSCs suprimiam a ação dos linfócitos T. As MSCs foram adicionadas a culturas de reação linfocitária mista (MLR que contém uma mistura de linfócitos) e constatou-se que as MSCs suprimem a proliferação celular, ou seja, concluiu-se que as MSCs podem iniciar a ativação de linfócitos T, mas não provocam respostas proliferativas devido a mecanismos supressivos ativos [79].

Como mencionado anteriormente, a comunicação entre as células estaminais do tecido transplantado e o cérebro do hospedeiro envolve várias via de sinalização que possibilitam a transmissão da informação através do contacto célula-célula (*via juxtacrine*), formação de gradientes moleculares que circulam no sangue e fluídos corporais que atuam localmente (*via parácrina*) ou de forma sistémica (*via endócrina*) e, através de vesículas extracelulares que transportam as moléculas sinalizadoras/quimiotáticas (*Figura 2.6*) [77].

Na via de sinalização *juxtacrine*, a transmissão de informação pode ser feita pelo contacto direto membrana-membrana, mediado pela ligação do recetor ao ligando como no caso do ligando PD-1 e recetor PD-L1. O interferão γ (INF γ) estimula propriedades imunossupressoras da MSCs através da regulação da ligação do ligando PD-1 à proteína da morte celular programada (PD-L1) que reduz a ativação das células Th1 e Th17 que expressam o ligando PD1, mediante modelação da expressão de recetores de citocinas como a interleucina 12R e de transdutores de sinal (STAT5a e STAT5b). A sinalização celular pode também ser gerada pelo acoplamento celular juncional onde as membranas de duas células vizinhas se tornam muito próximas (*via conexas*). Este processo foi descrito no tecido transplantado de células estaminais precursoras neurais (NPCs), onde se observava transferência de pequenas moléculas. Foi demonstrado que o contacto celular de conexas entre os macrófagos do hospedeiro e as NPCs do exerto, provoca uma redução pró-inflamatória nos macrófagos, diminuindo, assim, a neuroinflamação provocada por este tipo celular [77].

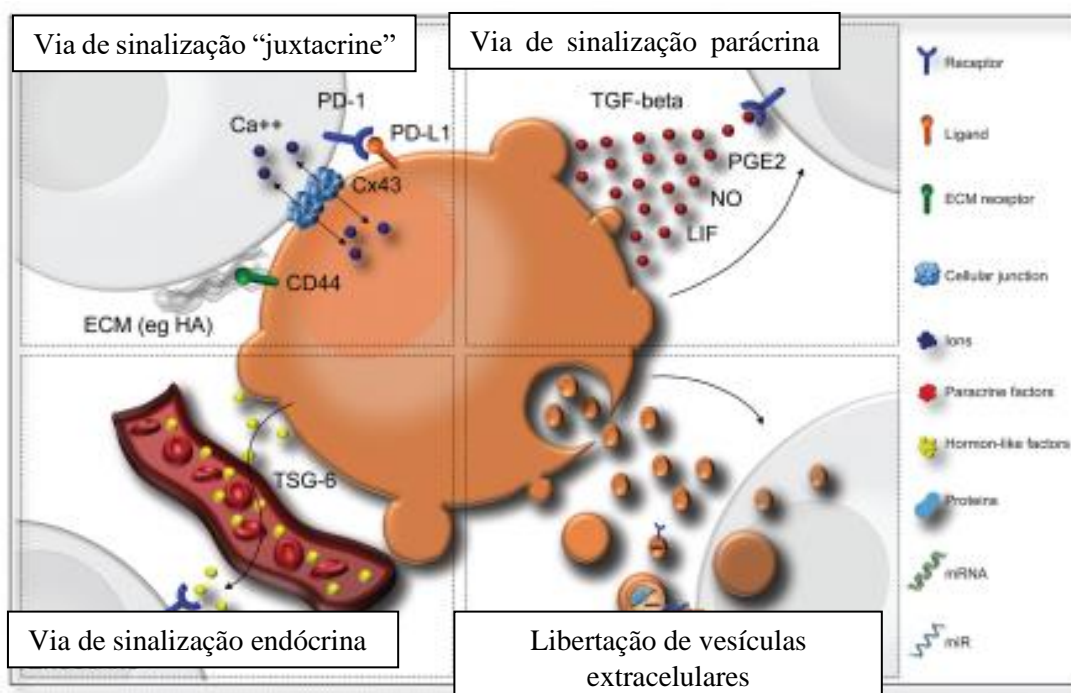


Figura 2.6- Representação esquemática das vias de sinalização celular que regulam as interações entre o enxerto de células estaminais e o sistema imune do hospedeiro em doenças inflamatórias cerebrais. (A) Vias de sinalização “juxtacrine” (contacto célula-célula) que incluem (i) interação recetor-ligando, como PD-L1/PD-1; (ii) ligação do recetor a componentes da matriz extracelular (MEC) libertadas por células vizinhas (tais como CD44 para HA); e (iii) formação de junções comunicantes (via conexinas); (B) Sinalização parácrina com libertação de fatores que formam um gradiente (por exemplo, TGF- β , LIF, NO, PGE2); (C) Sinalização endócrina (sinalização à distância) que implica na libertação de fatores semelhantes a hormonas, como TSG-6; e (D) libertação de vesículas extracelulares (EV) com a possibilidade de entregar moléculas bioativas, como mRNAs, microRNAs e proteínas a células significativamente longe das células que deram origem às vesículas.

Legenda: Cluster de diferenciação (CD); ácido hialurónico (HA); matriz extracelular (MEC); Conexina-43 (Cx43); cálcio (Ca^{2+}); fator transformador de crescimento beta (TGF- β); Prostaglandina E2 (PGE2); óxido nítrico (NO); Fator inibitório da leucemia (LIF); gene/proteína 6 estimulado por TNF- α (TSG6); morte programada-1 (PD-1); Ligando 1 de morte celular programada 1 (PD-L1); vesículas extracelulares (EVs). Adaptado de [77].

A via de sinalização parácrina resulta da difusão no meio de fatores segregados por uma célula doadora que afetam as células vizinhas. Na terapia regenerativa, as células estaminais transplantadas segregam uma variedade de fatores parácrinos como interleucinas, fatores de estimulação de proliferação, fatores de crescimento entre outros que, regulam a interação entre o tecido transplantado e o hospedeiro. Por exemplo, através da secreção de óxido nítrico (NO) e prostaglandinas E2

(PGE2), ocorre comprometimento da proliferação dos linfócitos T induzidos pelo enxerto de células estaminais, conseguindo, assim, as NPCs modular a resposta imune do hospedeiro. Na via de sinalização endócrina, as moléculas são libertadas na corrente sanguínea e a transmissão da informação é realizada à distância. Num estudo realizado em murganhos com hemorragia intracerebral, foi possível observar a ação das NPCs injetadas por via intravenosa que migraram até ao baço e se acumularam (não exercendo ação direta no SNC), inibindo a ativação de macrófagos e reduzindo a ativação de TNF- α , IL6 e células *natural killer* [77-79].

Em 2022, Lin Zhang e Pengbo Han desenvolveram um estudo onde avaliaram o papel dos microRNAs inseridos em vesículas extracelulares, derivadas de células estaminais precursoras. Observaram que o microRNA 374, expresso nas células NSCs, pode ser incluído em vesículas extracelulares e desempenhar um papel protetor na lesão medular, suprimindo a apoptose de células neuronais e ativando a autofagia [80]. A indução do processo autofágico pode ser considerada uma terapia promissora em doenças neurodegenerativas, uma vez que muitas destas doenças apresentam propensão para a agregação de proteínas e a acumulação destes agregados a nível celular resulta em morte neuronal. Vários trabalhos têm demonstrado que, através da indução autofágica, é possível reduzir os níveis de agregados proteicos promovendo assim neuroproteção e reduzindo a morte neuronal [81].

A neuroinflamação crónica é comum nas doenças neurodegenerativas, contribuindo para o quadro patológico, nomeadamente, estando envolvida na morte neuronal e impedimento do bom funcionamento da comunicação sináptica. Deste modo, é importante reduzir os níveis de interleucinas pró-inflamatórias no tecido cerebral. Foi demonstrado, num estudo desenvolvido por Liliana Mendonça e colaboradores [82], que o cerebelo de murganhos transgénicos com uma doença neurodegenerativa, a doença de Machado-Joseph, após transplante com NSCs cerebelares, os níveis de mRNA do cerebelo encontravam-se significativamente diminuídos para os mediadores pró-inflamatórios como o fator de necrose tumoral α (TNF- α), a interleucina 1b (IL1B) e a interleucina 6 (IL6). Estes resultados sugerem, então, que o transplante de NSCs cerebelares reduz os níveis de mediadores pró-inflamatórios no cerebelo em doenças neurodegenerativas. Sendo esta redução significativa dos níveis de mRNA de mediadores inflamatórios, obtida após o transplante das células estaminais neurais, foi acompanhada

pelo aumento da sobrevivência neuronal no cerebelo destes murganhos com a doença de Machado-Joseph [82].

2.1.2.3 Estimulação da neurogênese

De uma forma geral, o cérebro apresenta algumas áreas neurogênicas, nomeadamente a zona subgranular (SGZ) e a zona subventricular (SVZ). A zona subgranular comporta vários tipos celulares e estadios da neurogênese ilustrados na *Figura 2.7*. [83].

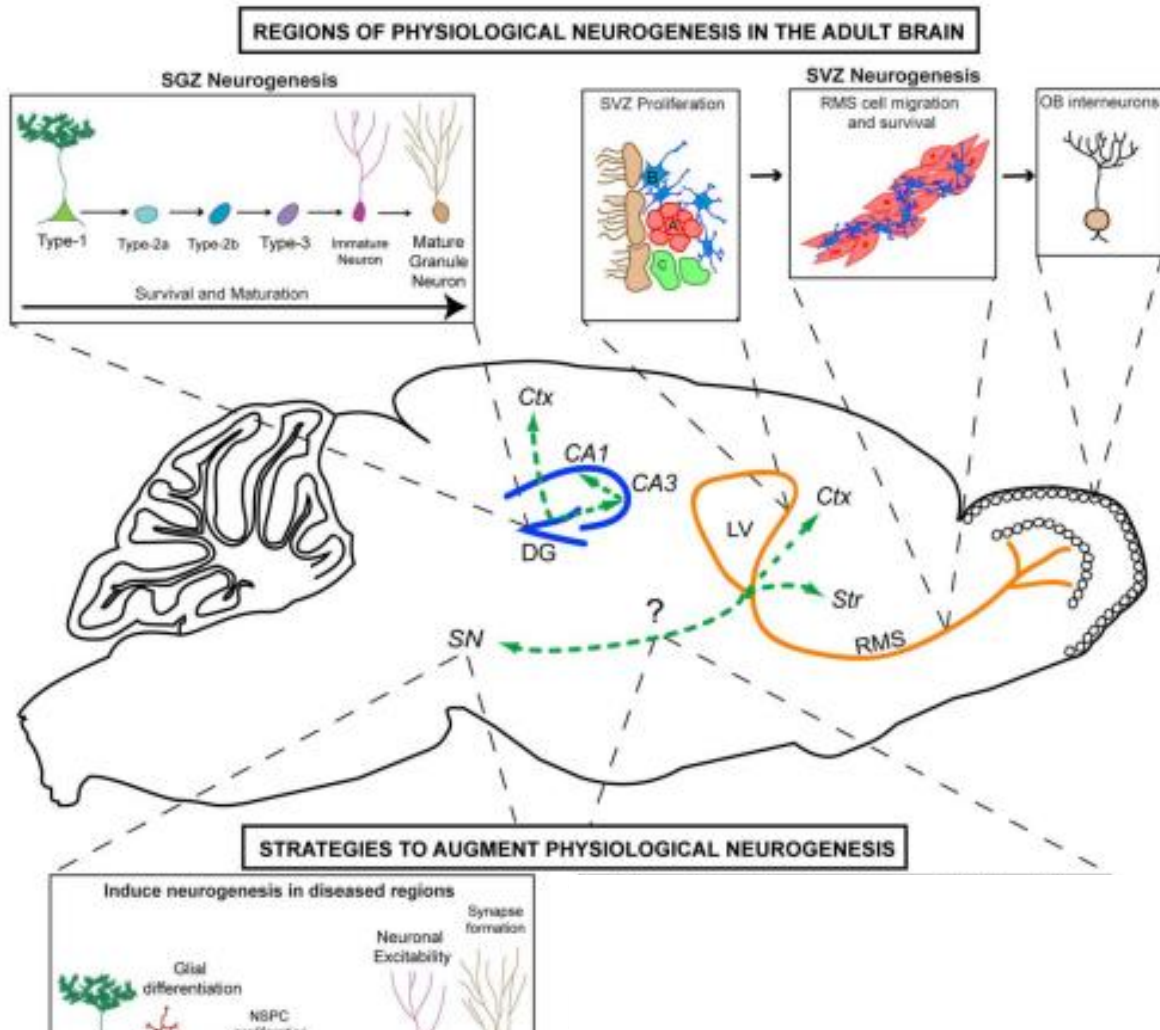


Figura 2.7- Esquema da neurogênese dividido por duas zonas cerebrais, a zona subgranular (SGZ) e a zona subventricular (SVZ). Painéis superiores: A neurogênese continua durante toda a vida adulta, com as rotas na SGZ do giro denteado do hipocampo (azul) e na SVZ em torno dos ventrículos laterais (laranja). Os NSPCs gerados na SVZ migram ao longo do RMS (linha laranja) em direção ao OB e diferenciam-se em interneurónios no bulbo olfatório. Painéis inferiores: NSPCs com vários graus de maturação podem ser direcionadas para aumentar o número de neurónios maduros disponíveis a serem incorporados na rede de neurónios locais. Legenda: ventrículo lateral (VE); giro denteado (GD); córtex (Ctr); estriado (Str); substância negra (SN); corrente migratória rostral (RMS); zona subventricular (ZVS); zona subgranular (SGZ); bulbo olfatório (OB). Adaptado de [83].

As células do tipo 1, localizadas na área do giro denteado do hipocampo, são as chamadas células estaminais, que após divisão celular dão origem às células tipo 2, conhecidas como células progenitoras neuronais que, após diferenciação dão origem aos neurónios imaturos, células tipo 3. Estes sofrem maturação e integram a rede de neurónios já existentes no SNC. As células estaminais também se encontram presentes na zona subventricular que reveste as paredes dos ventrículos laterais, composta por precursores de amplificação transitória (células tipo C), semelhantes às células tipo 2 da SGZ, que se dividem e diferenciam em neuroblastos (células tipo A). Posteriormente, sofrem reorganização em cadeia envolvida por astrócitos (células tipo B). Ocorre migração dos neuroblastos pela corrente migratória rostral, atingindo o bulbo olfatório [83]. Para além da perda ou disfunção dos neurónios, as células da glia também podem ser afetadas nas doenças neurodegenerativas.

É possível induzir a diferenciação em linhagens celulares maduras de neurónios e células da glia, através do transplante de células estaminais, embora seja necessário aperfeiçoar o processo migratório destas células para atingirem a zona cerebral afetada e promoverem a sua regeneração. Acredita-se que a solução passa pela integração de fatores de crescimento e citocinas que potenciam a sobrevivência celular, a remodelação da matriz extracelular, remodelação da vasculatura, sinalização quimioatrativa e quimiorrepulsiva e regulação de progenitores gliais (DCX, PSA-NCAM) e outras moléculas neurogénicas envolvidas na migração [84].

Num estudo, desenvolvido, em 2009, por Farshad Moghadam e colaboradores, foi investigada a capacidade de produção de neurónios colinérgicos, a partir de células estaminais embrionárias, na restauração celular em murgos com doença de Alzheimer. Para potenciar a diferenciação dos neurónios colinérgicos, foi modulada a via de sinalização Sonic Hedgehog (SHH) e usados o ácido retinóico (AR), o fator inibitório de leucemia (LIF), o fator de crescimento nervoso (NGF) e a interleucina-6 (IL6), selecionados com base na evidência do seu efeito positivo no sistema colinérgico. Foi testada a capacidade do enxerto para gerar novas sinapses com os neurónios hospedeiros e, assim, perceber se houve formação de neurónios dopaminérgicos funcionais, e constatou-se que as ESC transplantadas contribuíam positivamente para a melhoria do sistema colinérgico, uma vez que possibilitavam a formação de novas sinapses e a secreção de acetilcolina [85].

2.2 Métodos de avaliação dos mecanismos terapêuticos

A Agência Europeia do Medicamento (EMA) e a *Food and Drug Administration* (FDA) são as entidades responsáveis pelo desenvolvimento dos regulamentos e diretrizes impostas na Europa e Estados Unidos da América, respetivamente, que garantem o cumprimento da segurança, eficácia e qualidade dos medicamentos introduzidos no mercado, tendo sempre em vista a proteção da saúde pública.

O Regulamento (CE) n.º 1394/2007 do Parlamento e do Conselho Europeu, de 13 de novembro de 2007, tem por objetivo regular os medicamentos de terapia avançada, como a terapia genética, a terapia com células somáticas e a engenharia de tecidos, destinados a serem colocados no mercado dos Estados-Membros e a serem preparados industrialmente, de acordo com o âmbito geral de aplicação da legislação farmacêutica comunitária consagrada no título II da Diretiva 2001/83/CE. Este regulamento prevê a necessidade de criação de um comité de terapias avançadas, responsável pela avaliação destes medicamentos com elaboração de pareceres sobre a qualidade, segurança e eficácia de cada medicamento, para aprovação final pelo Comité dos Medicamentos para Uso Humano da Agência. Assim estes medicamentos têm também por regulamento base o Regulamento n.º 1394/2007, embora sejam abrangidos por regulamentos e diretivas específicas, o que demonstra a complexidade desta terapia [86].

A principal *guideline* destes medicamentos, emitida pela EMA, é a diretriz n.º 410869/2006 da Agência Europeia do Medicamento, de 1 de setembro de 2008, relativo aos medicamentos baseados em células humanas (EMEA/CHMP/410869/2006). Diretrizes sobre medicamentos baseados em células humanas que abrangem aspetos como análise de risco, qualidade e fabrico, caracterização (identidade, pureza celular, impurezas, potência, tumorigenicidade), controle de qualidade, validação do processo de fabrico (por exemplo, critérios de libertação, testes de estabilidade), entre outros.

Para além disso, o documento “Supervisão regulatória de marketing de medicamentos de terapia avançada (ATMPs), na Europa: A perspetiva EMA/ comité para terapias avançadas (CAT)” descreve a importância de selecionar o modelo animal mais adequado que deve apresentar características físicas, mecânicas, químicas e biológicas, mais próximas do ser humano. Explica também a necessidade e importância dos estudos farmacodinâmicos que devem demonstrar os efeitos do medicamento no doente / modelo animal. Quando os medicamentos de base celular são usados para regeneração de tecidos, uma forma de avaliar o seu efeito é através de análises histológicas dos tecidos, existindo,

também, a necessidade de se realizarem estudos farmacocinéticos que preveem a biodistribuição e persistência do medicamento no organismo [87].

Segundo a diretriz 6QB29 do Conselho Internacional para Harmonização de requisitos técnicos de produtos farmacêuticos para uso humano (ICH), a potência é a medida quantitativa da atividade biológica baseada no produto, sendo, portanto, a base da avaliação da capacidade celular. O ensaio clínico que demonstra a atividade biológica deve basear-se no efeito biológico pretendido que se encontra, normalmente, associado à resposta clínica desejada. A diretriz sobre medicamentos baseados em células humanas estabelecida pelo comitê de medicamentos para uso humano [88], descreve a necessidade de criação de um ensaio de potência antes do decorrer do ensaio clínico. Existem dois tipos de ensaios que podem ser aplicados, ensaios *in vitro* que utilizam sistemas celulares e ensaios *in vivo* que utilizam modelos animais. Devem, também, ser monitorizadas as funções celulares como a viabilidade, autorrenovação, morte e diferenciação celular, comprovando a qualidade, função e sustentabilidade do medicamento de base celular em desenvolvimento. Essa monitorização é realizada através da expressão de marcadores que demonstram a correlação (direta ou indiretamente) da atividade biológica pretendida, como por exemplo, no caso dos marcadores de superfície celular, marcadores de ativação e padrão de expressão de genes específicos. São utilizadas para o efeito tecnologias como a reação em cadeia de polimerase (PCR), ensaio imunoenzimático (ELISA), perfis de expressão genética, clonagem celular, entre outros. Também é possível recorrer à resposta fisiológica do organismo para avaliar a potência do ensaio, como por exemplo, através da caracterização dos tipos celulares decorrentes da diferenciação [88].

Num artigo publicado, em 2013, acerca do progresso tecnológico e desafios na terapia celular baseados em células estaminais pluripotentes humanas é mencionada a dificuldade de desenvolver um sistema de controle de qualidade para a produção de produtos medicinais derivados de células estaminais pluripotentes humanas, pois ao contrário dos produtos farmacêuticos ditos tradicionais, os produtos medicinais de terapia avançada não podem ser avaliados através das normas de pureza dos produtos baseados em células já definidos. Isto acontece porque na terapia avançada, em alguns casos, pode-se recorrer a uma mistura de células para alcançar o efeito desejado. Logo, propõem que a avaliação da qualidade do produto e a classificação de pureza sejam determinados, caso a caso. Assim, em cada objetivo terapêutico, o controle de qualidade é personalizado e desenvolvido para cada tipo de terapia à base de células [89].

O potencial oncogénico também deve ser tido em conta nas terapias com recurso às células estaminais. As diretrizes S1A do ICH que regem os estudos convencionais de tumorigenicidade não são considerados apropriados para todas as terapias baseadas em células. Têm vindo a ser desenvolvidas estratégias para contornar este problema, como a avaliação *in vitro* da estabilidade genética, a presença de células mutadas e indiferenciadas, o crescimento celular dependente ou independente de fatores de crescimento, a resposta a estímulos de apoptose, a avaliação da integridade cromossómica e a tumorigenicidade das células são mencionadas na diretriz sobre medicamentos baseados em células humanas de 2008 [88].

Apesar do progresso que tem vindo a ser alcançado com o desenvolvimento destas terapêuticas com base na terapia celular, existe, ainda, espaço para melhoria dos processos de avaliação desta terapêutica. Nomeadamente, devem ser desenvolvidas tecnologias especializadas para gerar linhas celulares estáveis para serem usadas como base celular da terapêutica, tanto para uso alogénico como autólogo; desenvolvimento de métodos de caracterização seletivos e confiáveis como a descoberta de marcadores específicos que garantam a qualidade e eficácia da terapêutica para uso clínico [89].

2.3 Segurança e riscos

A terapia celular trouxe consigo novos desafios para o campo do desenvolvimento destes novos medicamentos, sendo o conhecimento acerca da segurança da terapia celular ainda limitado e necessitando de ser estudado para avaliar os riscos do seu uso. Os riscos, relativos à administração de um medicamento derivado de células, estão associados à origem das células, método de produção, componentes não celulares envolvidos na preparação, modo de aplicação da terapêutica, entre outros [88,90].

A análise do risco deve ser feita para se justificar o desenvolvimento do produto. Recomenda-se que, nos estádios iniciais de desenvolvimento do medicamento, sejam identificados fatores de risco associados à qualidade e segurança do produto, sejam estabelecidas normas que minimizem o risco e sejam desenvolvidas ações de gestão de risco pós-comercialização estabelecidas no plano de farmacovigilância. A origem celular, autóloga ou alogénica, a capacidade de proliferação e/ou diferenciação, capacidade de despoletar uma resposta imune, o nível de manipulação celular (expansão, ativação, diferenciação, genética *in vitro* ou *ex vitro*, manipulação e crioconservação), modo de administração (por exemplo por perfusão *ex vivo*, administração local ou sistémica),

duração da exposição da cultura ou tempo de vida das células, disponibilidade de dados clínicos ou estudos com produtos semelhantes, entre outros, são critérios descritos nas diretrizes sobre medicamentos baseados em células humanas estabelecidos pelo comitê de medicamentos para uso humano [88], que podem ser usados para estimar o risco do produto desenvolvido.

A mesma diretiva refere que, dependendo do tipo de produto em desenvolvimento, pode existir a necessidade de submetê-lo a estudos de toxicidade, por exemplo, quando as células estaminais utilizadas não são do próprio indivíduo (transplante alogénico) é necessário “testar” a sua toxicidade, porque a indução de uma resposta imune pode modular a eficácia do medicamento de base celular e pode desencadear uma reação imunológica que coloque o doente em perigo de vida.

O documento “Supervisão regulatória de marketing de medicamentos de terapia avançada (ATMPs) na europa: A perspetiva EMA/CAT” refere que a toxicidade dos medicamentos de base celular pode surgir de diferentes fatores, como alterações celulares desconhecidas que ocorrem durante o processo de fabrico, nomeadamente, a excreção modificada de quimiocinas ou diferenciação celular específica, o uso alogénico do produto, a interação com componentes que foram utilizados durante o fabrico do produto ou que fazem parte de um componente estrutural do medicamento ou a proliferação das células em quantidade indesejada e/ou num local indesejado. Deste modo, os estudos toxicológicos devem ser realizados com o medicamento finalizado, por forma a identificar algum destes potenciais perigos [87].

A monitorização da distribuição celular é uma dificuldade que deve ser considerada, uma vez que as células estaminais ao serem administradas, podem não ser distinguidas das células hospedeiro. A avaliação do risco associado à tumorigenicidade ou à formação inadequada de células adultas depende da capacidade de rastrear as células administradas. Este processo torna-se difícil quando as células estaminais são administradas via intravenosa ao invés de localmente. O potencial ilimitado de renovação e capacidade de diferenciação em qualquer tipo celular das células estaminais acarreta problemas de segurança para o doente, pois pode ocorrer a formação de teratomas que podem ser malignos, dependendo da maturidade e do tipo celular envolvido, sendo por isto fundamental garantir que as células transplantadas não têm pluripotência / capacidade de originar teratomas [90].

Um estudo que ilustra este problema, foi desenvolvido em 2009, onde se recorreu ao uso de células estaminais neurais fetais para transplante num doente com ataxia telangiectasia, também conhecida como Síndrome de Louis-Bar. Esta doença é causada por uma mutação no gene ATM que tem implicação na resposta celular aos estímulos patogénicos como a radiação ionizante e agentes alquilantes, provocando morte celular em tecidos suscetíveis como o cérebro. Quatro anos após o transplante, o doente foi diagnosticado com um tumor cerebral multifocal. Para avaliar a relação entre as células estaminais e o tumor, os investigadores compararam as células tumorais e as células do sangue periférico através de tecnologias como a hibridização *in situ* fluorescente, PCR e o sistema de MassARRAY, concluindo que o tumor tinha origem não hospedeira, sugerindo que a sua proveniência advinha das células estaminais transplantadas. Esta foi a primeira evidência de tumorigenicidade provocada por células estaminais neurais [91,92].

Em suma, a segurança deve sempre suplantar o risco e, como tal, no desenvolvimento de novas terapias deve ser definido o risco aceitável que permite o efeito terapêutico desejado sem que seja posta em causa a segurança do doente durante o processo.

Capítulo III

3.1. Doença de Alzheimer

A doença de Alzheimer é uma doença neurodegenerativa que afeta, atualmente, mais de cinquenta e cinco milhões de pessoas em todo o mundo, segundo estatísticas da Organização Mundial de Saúde. O doente com Alzheimer sofre de demência, o que inclui perda de memória, dificuldade de pensamento, discurso, processamento de problemas e orientação, resultado de défices no sistema colinérgico. A neurodegeneração observada nestes doentes pode estar associada à acumulação de placas A β , disfunção sináptica, desequilíbrio de níveis de neurotransmissores, degeneração neurofibrilar e neuroinflamação [93,94].

As placas A β também conhecidas como placas senis, são depósitos de péptidos resultantes da clivagem da proteína beta-amilóide, que estão envolvidas na neurotoxicidade e disfunção neural. A acumulação destas placas densas na região do hipocampo, amígdala e córtex cerebral pode levar à indução da resposta imune, ao ativar a microglia e libertação de citocinas que provocam danos nos axónios e dendrites, levando, conseqüentemente, à morte celular [94,95].

Atualmente, existem apenas duas classes terapêuticas de medicamentos usados na Doença de Alzheimer. Os inibidores da acetilcolinesterase a que pertence o donepezilo, a rivastigmina e a galantamina, recomendados na doença ligeira a moderada. E a memantina que atua como antagonista não competitivo do recetor N-metil-D-aspartato do glutamato, usada na doença moderada a severa [96].

Sendo uma doença progressiva e irreversível, a terapêutica farmacológica disponível não tem propriedades curativas, mas é utilizada a fim de evitar o agravamento de complicações cerebrais com o avançar da doença bem como, melhorar a qualidade de vida do doente, diminuindo a sintomatologia associada à doença. Assim, surge a necessidade de terapias eficazes no tratamento desta doença com foco no potencial terapêutico das células estaminais.

3.1.1 Ensaios pré-clínicos com terapia de base celular

Na doença de Alzheimer, os estudos pré-clínicos desenvolvidos até à data utilizaram maioritariamente células estaminais embrionárias de murganho, células estaminais adultas derivadas da medula óssea e do cordão umbilical humano (nomeadamente neurais e mesenquimatosas), mas também precursores neurais derivados de células estaminais pluripotentes induzidas (*Tabela 3.1*).

Tabela 3.1 - Estudos pré-clínicos de terapias de base celular publicados no âmbito da doença de Alzheimer.

Referência	Modelo animal	Tipo de Células estaminais	Objetivo	Outcomes observados
[97]	murganho	Células estaminais embrionárias de murganhos	Elucidar o efeito das células na demência, em murganhos com lesões do núcleo basal de Meynert.	- Presença de neurónios para síntese de acetilcolina (ChAT); - Melhoria da perda de memória resultante da doença.
[98]	rato	Células estaminais neurais	Investigar se as células estaminais neurais com expressão transgénica do fator de crescimento neural humano (hNGF) transplantadas no cérebro poderiam oferecer uma opção terapêutica para o tratamento da doença de Alzheimer.	- Gene hNGF transferido conferiu níveis estáveis e elevados de expressão proteica nas células estaminais neurais <i>in vivo</i> .
[99]	murganho	Células estaminais mesenquimatosas derivadas de tecido adiposo	Investigar se o transplante de células estaminais mesenquimatosas derivadas de tecido adiposo, no hipocampo poderia exercer efeitos benéficos em murganhos transgénicos para doença de Alzheimer e se a neurogénese é afetada pelo transplante destas células.	- Redução do stress oxidativo; - Melhoria do comprometimento cognitivo; - Promove a neurogénese na zona SGZ do hipocampo; -Aumenta o número de neuroblastos na zona SVZ do hipocampo.
[100]	murganho	Células estaminais mesenquimatosas do cordão umbilical humano	Investigar os efeitos das células estaminais mesenquimatosas do cordão umbilical humano num transplante intravenoso em murganhos com doença de Alzheimer.	-Melhoria da função cognitiva; -Atenuação do stress oxidativo; -Promoção da proliferação celular e sobrevivência das novas células; -Promoção da neurogénese.
[101]	murganho	Células estaminais mesenquimais do	Explorar o potencial terapêutico de xenoenxertos de células estaminais	- Redução significativa das placas amiloides observadas no córtex e no hipocampo;

		cordão umbilical humano	mesenquimatosas do cordão umbilical humano num murganho transgênico no modelo da doença de Alzheimer.	-Diferença significativa na imunorreatividade da microglia no córtex e hipocampo dos murganhos tratados versus o controlo;
[102]	murganho	Células estaminais neurais humanas	Avaliar se o transplante de células estaminais neurais humanas melhora a cognição num modelo murino da doença de Alzheimer.	- A quantidade de placa amilóide foi significativamente reduzida; -Aumento do recrutamento de microglia e fagocitose amilóide, sugerindo capacidade imunomoduladora.
[103]	murganho	Precursores neurais derivados de células estaminais pluripotentes induzidas	Avaliar os potenciais benefícios dos precursores neurais derivados das iPSCs na progressão da doença de Alzheimer.	- Melhoria da perda de memória resultante da doença; - Plasticidade sináptica melhorada; - Redução dos depósitos beta amiloides;
[104]	murganho	Células estaminais mesenquimatosas da medula óssea	Avaliar se os exossomas derivados de células estaminais mesenquimatosas da medula óssea aliviam o declínio cognitivo em murganhos com doença de Alzheimer.	- Inibição da hiperatividade da microglia e astrócitos no hipocampo dos murganhos com doença Alzheimer; -Aumento dos níveis de BDNF.

Abreviaturas da tabela: hNGF: *Human nerve growth factor* (fator de crescimento neural humano); ChAT: Enzima colina acetil-transferase; SGZ: *the subgranular zone* (zona subgranular); SVZ: *The subventricular zone* (zona subventricular); iPSC: *Induced pluripotent stem cells* (células pluripotentes induzidas); BDNF: *Brain-derived neurotrophic factor* (fator neutrófico derivado do cérebro).

3.1.2 Ensaios clínicos com terapias de base celular

Os ensaios clínicos desenvolvidos no âmbito da doença de Alzheimer avaliaram a segurança, tolerabilidade e eficácia celular, nomeadamente de células estaminais mesenquimatosas derivadas do sangue do cordão umbilical humano (NEUROSTEM®), células estaminais mesenquimatosas isoladas da medula óssea (Lomecel-B) e células estaminais mesenquimatosas derivadas de tecido adiposo autólogo (Astrostem) (Tabela 3.2).

Tabela 3.2 -Estudos clínicos de terapias de base celular na doença de Alzheimer.

Número NCT	Ano	País	Título	Células	Fase do estudo clínico	Resultados
NCT01297218 [105]	2011	Coreia	“Ensaio clínico de fase I, aberto, de centro único para avaliar a segurança e eficácia do NEUROSTEM®-AD em doentes com Alzheimer”	NEUROSTEM®-AD Células estaminais mesenquimatosas derivadas do sangue do cordão umbilical humano	Fase I Concluído	-O estudo demonstrou segurança, uma vez que não houve relatos de eventos adversos graves nos indivíduos tratados com as células estaminais; - A eficácia não foi comprovada por falta de controles e pelo pequeno tamanho de amostra; [106]
NCT02054208 [107]	2014	Coreia	“Ensaio clínico duplamente cego, de fase I/IIa para avaliar a segurança e eficácia após administração intraventricular de NEUROSTEM®-AD versus placebo em doentes com Alzheimer	NEUROSTEM®-AD	Fase I e II Concluído	Não publicados
NCT02600130 [108]	2016	USA	“Estudo de fase I, randomizado, duplamente cego, controlado por placebo para avaliar a segurança, eficácia e potencial da infusão de Lomecel-B versus placebo em doentes com Alzheimer”	Lomecel-B Células estaminais mesenquimatosas isoladas da medula óssea	Fase I Concluído	Não publicados

NCT03117738 [109]	2017	USA	“Estudo de fase I e II, duplamente cego e controlado por placebo, para avaliar a segurança e eficácia de <i>Astrostem</i> em doentes com Alzheimer”	<i>Astrostem</i> Células estaminais mesenquimatosas derivadas de tecido adiposo autólogo	Fase I e II Concluído	Não publicados
NCT03172117 [110]	2017	Coreia	“Estudo de acompanhamento de segurança e eficácia em indivíduos que completaram o ensaio clínico NEUROSTEM® Fase-I/IIa.	NEUROSTEM® Células estaminais mesenquimatosas derivadas do cordão umbilical humano	Fase I e II Concluído	Não publicados
NCT04040348 [111]	2019	USA	“Ensaio fase I, prospetivo e aberto para avaliar a segurança, tolerabilidade e resultados exploratórios de múltiplas infusões de células estaminais mesenquimatosas humanas alogénicas em doentes com Alzheimer”	Infusão de células estaminais mesenquimatosas	Fase I, Concluído	Não publicados

3.2 Doença de Huntington

A doença de Huntington é uma doença neurodegenerativa autossômica dominante causada pela perda significativa de neurónios nos gânglios da base. Esta doença afeta a capacidade psíquica (mudança de humor, ansiedade, depressão, apatia, irritabilidade), cognitiva (pensamento, concentração, memória) e equilíbrio emocional do doente, mas também o seu desempenho motor [112].

A doença de Huntington foi identificada, em 1993, e expressa-se normalmente a partir da meia-idade, entre os 35 e 55, embora possa apresentar manifestações mais cedo [113]. A nível mundial, a prevalência da doença de Huntington é de 4,88 casos por 100.000 habitantes [114].

Esta doença resulta de uma mutação no gene que codifica a proteína Huntingtina (HTT), presente no cromossoma 4 que provoca a repetição da sequência de nucleótidos de citosina, adenina e guanina (CAG), sendo este CAG traduzido no aminoácido glutamina. Deste modo, na doença de Huntington ocorre expressão exagerada de glutaminas na proteína HTT e, por isso, esta doença faz parte do grupo das doenças de poliglutaminas. No gene HTT, aquando da mutação que se manifesta, se houver mais de trinta e nove repetições do triplete CAG, ocorre ligação de uma extensa cadeia de resíduos de glutamina ligados à cadeia NH₂-terminal que modifica a capacidade de interação com outras proteínas e, conseqüentemente, com várias funções celulares, como o transporte axonal e a autofagia [115,116]. Com a progressão da doença, a disfunção da proteína huntingtina mutada que leva à sua acumulação de inclusões nos neurónios, desencadeia mau funcionamento neuronal e a sua morte [117].

Atualmente, no tratamento desta patologia são usados diferentes fármacos pertencentes ao grupo dos antidepressivos (como a amitriptilina, fluoxetina, sertralina e mirtazapina) para controlar a depressão, irritabilidade, agressividade e disforia dos doentes e antagonistas dopaminérgicos (levodopa) ou agonistas dopaminérgicos (pramipexole) para melhoria do desempenho motor. Podem, também, ser utilizados antiepiléticos (como o ácido valpróico) em casos que se justifique, por exemplo, aquando de episódios convulsivos, mais frequentes na fase infantil do que em idade adulta ou fármacos antipsicóticos (haloperidol, risperidona, olanzapina, tetrabenazina) para controlo da coreia que consiste em movimentos involuntários (origem do latim *choreus*, que se refere a dança) [118,119]. Não existe cura para a doença, tendo a terapêutica

farmacológica como objetivo melhorar a sintomatologia associada à doença, bem como deter o avanço da mesma, melhorando a qualidade de vida dos doentes [120].

3.2.1 Ensaios pré-clínicos com terapias de base celular

Na doença de Huntington, os estudos pré-clínicos desenvolvidos até à data utilizaram maioritariamente células estaminais embrionárias humanas, células estaminais adultas derivadas da medula óssea ou do cordão umbilical humano (nomeadamente neurais e mesenquimatosas), mas também precursores neurais derivados de células estaminais pluripotentes induzidas (*Tabela 3.3*).

Tabela 3.3 -Estudos pré-clínicos com terapias de base celular na doença de Huntington

Referência	Modelo animal	Tipo de células estaminais	Objetivo	Outcomes observados
[121]	Rato	Células estaminais neurais isoladas do corpo estriado do embrião de murganho	Avaliar se o transplante de células estaminais responsivas ao fator de crescimento epidérmico (EFG) derivadas de rato transgênicos, nos quais o promotor da proteína glial fibrilar ácida (GFAP) direciona a expressão do fator de crescimento neural humano (hNGF) poderiam prevenir a degeneração dos neurónios do estriado num roedor com doença de Huntington.	-Indução de crescimento de fibras colinérgicas de neurónios no prosencéfalo basal subjacente;
[122]	Rato	Células estaminais neurais humanas isoladas do telencéfalo embrionário humano	Estudar a capacidade migratória e o efeito neuroprotetor das células estaminais neurais humanas em ratos que apresentam degeneração do estriado mimetizando a doença de Huntington	-As células estaminais injetadas migraram para a lesão do estriado: diminuição da atrofia e indução de melhoria funcional no estriado;
[123]	Murganho	Células estaminais pluripotentes induzidas humanas	Avaliar após correção genética da mutação responsável pela doença de Huntington em células estaminais pluripotentes induzidas, estas células possam originar neurónios após transplante no cérebro de murganhos	- As células estaminais pluripotentes induzidas derivadas de fibroblastos de doentes com doença de Huntington, podem ser corrigidas pela substituição da repetição CAG expandida por uma repetição normal através de recombinação homóloga, e que a

				correção persiste na diferenciação de iPSC em neurónios DARPP-32 positivos do estriado, <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> ;
[124]	Rato	Precursores neurais derivados de células estaminais pluripotentes induzidas humanas	Analisar as propriedades neurais de uma linha de células estaminais pluripotentes induzidas de um doente com doença de Huntington, de forma juvenil, portador de 72 repetições de CAG	- As iPSCs transplantadas podem formar neurónios GABAérgicos e promoverem melhorias funcionais <i>in vivo</i> .
[125]	Rato	Células estaminais mesenquimatosas da matriz do cordão umbilical	Avaliar a eficácia <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> de células estaminais da matriz do cordão umbilical e o seu efeito parácrino contra o stress oxidativo com foco específico na doença de Huntington	-As células estaminais da matriz do cordão umbilical contribuem para a diminuição dos efeitos desfavoráveis do stress oxidativo, bem como na melhoria da função motora e atrofia do estriado;
[126]	Murghano	Células estaminais mesenquimatosas derivadas da medula óssea	Avaliar a administração intranasal, não invasiva, da entrega de células estaminais mesenquimatosas como uma via de administração alternativa eficaz para a terapia celular na doença de Huntington	-As MSCs migraram até ao bulbo olfativo mesencéfalo e corpo estriado; -Melhoria da função motora, bem como distúrbio do sono; -Efeito neuroprotetor das MSCs foi potenciado com o aumento da expressão da iba1 (marcador de microglia) no estriado e restauração da morfologia da microglia presente no estriado.
[127]	Rato	Células estaminais embrionárias humanas após ativação partenogénica dos embriões	Observar se o transplante de hESCs marcados com nanopartículas de óxido de ferro superparamagnético (SPION) poderia migrar à área degenerada neural e melhorar a disfunção motora num modelo de rato Huntington transfectado com AAV2-Htt171-82Q	-As hESCs sobreviveram e substituíram os neurónios degenerados do estriado e restabeleceram a atividade motora do cérebro do rato;

[128]	Rato	Precursores neurais derivados de células estaminais embrionárias humanas	Avaliar se a substituição celular usando precursores neurais derivados de células estaminais embrionárias humanas podem oferecer novas oportunidades terapêuticas para substituir neurónios degenerados e reparar circuitos danificados.	- Os progenitores do estriado sobreviveram até 6 meses após transplante, mostraram morfologia e características neuroquímicas semelhantes aos neurónios médios do estriado humano, mas também conseguiram inervar o corpo estriado do hospedeiro; -Interneurónios derivados do enxerto também foram detetados; -Ao longo do tempo, houve melhoria do desempenho motor afetado pela doença;
-------	------	--	--	--

Abreviaturas da tabela: EFG: *Epidermal growth factor* (fator de crescimento epidérmico); GFAP: *Glial fibrillary acidic protein* (Promotor da proteína glial fibrilar ácida); hNGF: *Human nerve growth factor* (fator de crescimento neural humano); CAG: Codão citosina-adenina-guanina; iPSC: *Induced pluripotent stem cells* (células pluripotentes induzidas); DARPP-32: *Dopamine and cyclic-AMP-regulated phosphoprotein - 32* (Fosfoproteína regulada por dopamina e AMP cíclico de peso molecular 32.000 Da); MSCs: *Mesenchymal stem cell* (células estaminais mesenquimatosas); iba1: *Ionized calcium-binding adaptor molecule 1* (Molécula adaptadora de ligação ao cálcio ionizado 1); hESCs: *Human embryonic stem cells* (Células estaminais embrionárias humanas); SPION: *Superparamagnetic iron oxide nanoparticles* (nanopartículas de óxido de ferro superparamagnético); Htt: proteína Huntigina; AAV2: vírus adeno-associado 2.

3.2.2 Ensaios Clínicos com terapias de base celular

Os ensaios clínicos desenvolvidos no âmbito da doença de Huntington avaliaram a segurança, tolerabilidade e eficácia celular, nomeadamente de células estaminais mesenquimatosas derivadas da polpa dentária humana Cellavita HD e NestaCell® (Tabela 3.4).

Tabela 3.4- Estudos clínicos com terapias de base celular no âmbito da doença de Huntington.

Número NCT	Ano	País	Título	Células	Fase do estudo clínico	Resultados
NCT02728115 [129]	2017	Brasil	“Primeiro estudo em humanos que avaliou a segurança do produto experimental Cellavita HD após aplicação intravenosa em indivíduos que sofrem da doença de Huntington”	Cellavita HD Células estaminais mesenquimatosas derivadas da polpa dentária imatura humana (hIDPSCs)	Fase I Ativo	Não publicados
NCT03252535 [130]	2018	Brasil	“Avaliação dose-resposta do produto experimental Cellavita HD após administração intravenosa em indivíduos que sofrem da doença de Huntington (ADORE-DH)”	Cellavita HD	Fase II Completo	- Apenas doses mais altas de hIDPSCs são capazes de aumentar o número de neurónios positivos para DARPP32 no córtex; -Dose baixa de hIDPSCs aumentou o número de células positivas para BDNF, DARPP32 e D2R no corpo estriado; - As hIDPSCs podem restaurar a expressão de BDNF, DARPP32 e D2R, promovendo neuroproteção e neurogénese; [131]
NCT04219241 [132]	2020	Brasil	“Estudo de extensão clínica para avaliar a segurança e eficácia da administração intravenosa de Cellavita-HD em doentes que participaram no	Cellavita HD	Fase II e III Ativo	Não publicados

			estudo ADORE-DH”.			
NCT06097780 [133]	2023	N/A	“Eficácia e segurança de fase III de NestaCell® na doença de Huntington moderada”	NestaCell® Células estaminais da polpa dentária humana	Fase III Ainda não estão em recrutamento	Não publicados

Abreviaturas da tabela: hIDPSCs: *Human immature dental pulp stem cells* (células estaminais da polpa dentária imatura humana); DARPP-32: *Dopamine and cyclic-AMP-regulated phosphoprotein - 32* (Fosfoproteína regulada por dopamina e AMP cíclico de peso molecular 32 000 Da); BDNF: *Brain-derived neurotrophic factor* (fator neurotrófico derivado do cérebro); D2R: *D2 Dopamine receptors* (recetores de dopamina D2).

3.3 Doença de Parkinson

A doença de Parkinson é uma das doenças neurodegenerativas mais comuns a nível mundial, caracterizada pela acumulação da proteína alfa-sinucleína que se agrega de forma anómala no tecido neuronal, originando os corpos de Lewy, característicos desta doença. A acumulação dos corpos de Lewy conduz a um processo de neurodegenerescência que evolui lentamente e se propaga por diferentes áreas do sistema nervoso, nomeadamente na substância negra, com conseqüente perda de neurónios dopaminérgicos e surgimento dos sintomas motores característicos da doença, como rigidez muscular, tremor em repouso, bradicinesia, alterações posturais e da marcha. Para além dos sintomas motores, a doença de Parkinson é acompanhada por perturbações do sistema nervoso como depressão, ansiedade, psicose, apatia, fadiga, disfunção cognitiva entre outros [134].

Na terapêutica da doença de Parkinson, a levodopa que, sendo o precursor da dopamina, consegue repor os níveis no cérebro, pode ser utilizada em monoterapia, e também pode ser administrada conjuntamente com inibidores da dopa-descarboxilase como a carbidopa e a benserazida que inibem a conversão de dopamina a nível periférico, o que faz aumentar a quantidade disponível para ser convertida em dopamina no cérebro. Outro método para melhorar a biodisponibilidade da levodopa é através inibição da catecol-o-metiltransferase (COMT) que inclui os fármacos tolcapone, entacapone e opicapone) e é responsável pela eliminação da levodopa plasmática. Em estadios ligeiros da doença, podem também ser usados fármacos agonistas dopaminérgicos, inibidores da monoamina oxidase B (MAO-B) como a selegilina, a amantadina e agentes anticolinérgicos [135].

Atualmente, a terapêutica utilizada apenas consegue amenizar os sintomas associados à doença, dado que não existe ainda uma terapêutica capaz de diminuir ou parar o processo neurodegenerativo, nem substituir a perda dos neurónios dopaminérgicos. Como tal, existe a necessidade de desenvolver uma cura que permita a restauração do tecido nervoso, nomeadamente através das terapias de base celular.

3.3.1 Ensaios pré-clínicos com terapias de base celular

Na doença de Parkinson, os estudos pré-clínicos desenvolvidos até à data utilizaram maioritariamente neurónios dopaminérgicos e corticais glutamatérgicos derivados de células estaminais embrionárias, células estaminais adultas derivadas da medula óssea e do cordão umbilical humano (nomeadamente neurais, mesenquimatosas e endometriais), mas também progenitores dopaminérgicos derivados de células estaminais pluripotentes induzidas (*Tabela 3.5*).

Tabela 3.5 -Estudos pré-clínicos com terapias de base celular no âmbito da doença de Parkinson.

Referência	Modelo animal	Tipos de células estaminais	Objetivo	Outcomes observados
[136]	Murganho	Células estaminais neurais derivadas de células estaminais embrionárias	Provar o potencial terapêutico de uma população enriquecida de células estaminais neurais do mesencéfalo derivada de células estaminais embrionária de murganho,	- As ESCs conseguiram gerar eficientemente precursores do mesencéfalo e neurónios dopaminérgicos e formaram conexões sinápticas;
[137]	Rato	Células estaminais neurais	Avaliar se o transplante de NSCs humanas clonadas por transferência do gene v- myc em células HB1.F3 é uma opção terapêutica viável para a doença de Parkinson.	-Sobrevivência das células HB1.F3 no cérebro lesionado; -Neurogénese endógena foi ativada na zona subventricular; - Efeito neuroprotetor contra a depleção dopaminérgica <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> , devido à secreção de fatores tróficos e diferenciação neural
[138]	Rato	Células estromais adultas derivadas do tecido adiposo	Investigar se a indução neural <i>in vitro</i> de células estromais adultas derivadas do tecido adiposo (ADAS) determina a sua capacidade de neuroproteção ou restauração da função dopaminérgica.	-Redução da degeneração da via nigrostriatal e dos déficits comportamentais induzidos por 6-OHDA; - A neuroproteção pelas células ADAS foi alcançada sem que estas se diferenciasssem em neurónios dopaminérgicos <i>in vivo</i> ;

				<ul style="list-style-type: none"> - Ocorreu atenuação da ativação da microglia; - As células ADAS expressam fatores neurotróficos que protegem os neurónios dopaminérgicos e promovem a sua sobrevivência;
[139]	Macaco	Progenitores dopaminérgicos derivados de células iPSC	Avaliar se os progenitores dopaminérgicos derivados de células iPSC humanas são clinicamente aplicáveis para o tratamento de doentes com Parkinson.	<ul style="list-style-type: none"> -Aumento de neurónios dopaminérgicos do macaco; -As células derivadas das iPSCs não formam nenhum tipo de tumor no cérebro, nos dois anos após o transplante; -Estudos histológicos mostraram que os neurónios dopaminérgicos maduros estendem neurites densas no estriado do hospedeiro
[140]	Rato	Progenitores dopaminérgicos derivados de células estaminais pluripotentes induzidas	Avaliar a segurança e eficácia dos progenitores dopaminérgicos derivados de uma linhagem iPSC humana	<ul style="list-style-type: none"> - Os progenitores dopaminérgicos tornaram-se neurónios dopaminérgicos maduros que produziram dopamina, melhorando assim o fenótipo motor do modelo animal; -As iPSCs e o produto final não demonstraram uma hipermetilação superior às células normais, indicativo de segurança. A hipermetilação suprime o supressor tumoral, impedindo o controlo do ciclo celular o que pode provocar o desenvolvimento de tumores.
[141]	Murganho	Neurónios dopaminérgicos do mesencéfalo e neurónios corticais glutamatérgicos derivados de células estaminais embrionárias humanas	Avaliar como os enxertos de células derivadas das células estaminais conseguem reparar a função dos circuitos neurais danificados no cérebro adulto	<ul style="list-style-type: none"> - O uso da estratégia Bi-DREADD, que permite excitação e inibição nas mesmas células enxertadas, demonstra que o circuito <i>nigra</i>-estriado reconstruído é funcional, subjacente à recuperação comportamental dos murganhos com doença de Parkinson; -A restauração do circuito neural por células transplantadas no cérebro.

[142]	Rato	Células estaminais endometriais derivadas do sangue menstrual humano	Investigar se MenSCs poderiam inibir a neuroinflamação em ratos com doença de Parkinson, através da regulação da polarização M1/M2 na microglia e entender os mecanismos subjacentes.	<ul style="list-style-type: none"> - MenSCs suprimiram a ativação de células da microglia, diminuindo significativamente a inflamação <i>in vitro</i>; mostraram evidência de capacidade anti-inflamatória através da regulação da polarização M1/M2; - MenSCs melhoraram a função motora animal; - MenSCs reduziram a perda de neurônios dopaminérgicos;
[143]	Murganho	Células estaminais mesenquimatosas derivadas do tecido adiposo humano	Compreender os efeitos das células estaminais mesenquimatosas que expressam o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) na dor relacionada com a doença de Parkinson e os mecanismos envolvidos.	<ul style="list-style-type: none"> - MSCs que expressam VEGF inibem a expressão potencial vanilóide 1 do recetor transitório (TRPV1), que pode contribuir para as suas propriedades analgésicas;

Abreviaturas da tabela: ESCs: *Embryonic stem cells* (Células estaminais embrionárias); NSCs: *Neural stem cells* (Células estaminais neurais); HB1.F3: Linha celular de células estaminais neurais; iPSCs: *Induced pluripotent stem cells* (células pluripotentes induzidas); MenSCs: *Human menstrual blood-derived endometrial stem cells* (Células estaminais endometriais derivadas do sangue menstrual humano); MSCs: *Mesenchymal stem cell* (células estaminais mesenquimatosas); VEGF: *Vascular endothelial growth factor* (fator de crescimento endotelial vascular).

3.3.2 Ensaios Clínicos com terapias de base celular

Os ensaios clínicos desenvolvidos no âmbito da doença de Parkinson avaliaram a segurança, tolerabilidade e eficácia da terapia celular, nomeadamente de células estaminais mesenquimatosas derivadas da medula óssea e do tecido adiposo, enxertos dopaminérgicos derivados de células estaminais fetais, células estaminais epiteliais amnióticas humanas, células estaminais derivadas de plasma autólogo rico em plaquetas e derivadas do sangue periférico embrionário; células progenitoras de neurónios dopaminérgicos do mesencéfalo derivadas de células estaminais embrionárias humanas, células estaminais pluripotentes alogénicas isoladas de tecido adiposo e progenitores dopaminérgicos derivada de células estaminais embrionárias (*Tabela 3.6*).

Tabela 3.6 -Estudos clínicos com terapias de base celular realizados no âmbito da doença de Parkinson.

Número NCT	Ano	País	Título	Células	Fase do estudo clínico	Resultados
NCT00976430 [144]	2009	Índia	“Para estudar a eficácia e segurança do transplante de células estaminais mesenquimatosas derivadas da medula óssea na doença de Parkinson”	Células estaminais mesenquimatosas derivadas da medula óssea	N/A Terminado devido á falta de participantes	Não publicados
NCT02538315 [145]	2016	Canadá	“Uso de 3,4-dihidroxi-6-[18F] - Fluoro-l-fenilalanina ([18F] FDOPA) com monitorização por PET/CT para avaliar a eficácia de enxertos dopaminérgicos fetais em doentes com Parkinson”	Enxertos dopaminérgicos derivados de células estaminais fetais	Observacional, Terminado por falta de participantes devido ao COVID19	Não publicados
NCT02611167 [146]	2017	USA	“Estudo piloto de fase I da terapêutica com células estaminais mesenquimatosas alogénicas derivadas da medula óssea para a doença de Parkinson”	Células estaminais mesenquimatosas alogénicas derivadas da medula óssea	Fase I Completo	Não publicados
NCT06142981 [147]	2019	Paquistão	“Eficácia da medicina regenerativa (terapêutica com células estaminais PRP e PBD-VSEL) na doença de Parkinson”	Células estaminais derivadas de plasma autólogo rico em plaquetas (PRP) e derivadas do sangue periférico muito pequenas e semelhantes a embrionárias (PBD-VSEL)	N/A	Não publicados
NCT04506073 [148]	2020	USA	“Estudo randomizado, duplamente cego e controlado por placebo, com terapia modificada de células estaminais mesenquimatosas alogénicas derivadas da medula óssea para a doença de Parkinson”	Células estaminais mesenquimatosas alogénicas derivadas da medula óssea (Allo-hMSC)	Fase II Completo	- A infusão de Allo-hMSC é segura, bem tolerada e não imunogénica em doses que variam de 1 a 10×10^6 allo-hMSCs/kg

						em indivíduos com DP leve a moderada; -Os efeitos do Allo-hMSC são provavelmente baseados na imunomodulação e no suporte neurotrófico; [149]
NCT04414813 [150]	2020	China	“Estudo clínico de transplante estereotáxico de células estaminais epiteliais amnióticas humanas no tratamento da doença de Parkinson”	Células estaminais epiteliais amnióticas humanas	Fase I Completo	Não publicados
NCT04928287 [151]	2021	USA	“Estudo randomizado, duplamente cego, de centro único, fase II, de eficácia e segurança de HB-adMSCs autólogos versus placebo para o tratamento de doentes com Parkinson”	Células estaminais mesenquimais derivadas do adipócito humano	Fase II Completo	Não publicados
NCT04802733 [152]	2021	Canada e USA	“Estudo de fase I para avaliar a segurança e tolerabilidade da terapia com células progenitoras de neurónios dopaminérgicos do mesencéfalo, derivadas de células estaminais embrionárias humanas (MSK-DA01) na doença de Parkinson em estado avançado”	Células progenitoras de neurónios dopaminérgicos do mesencéfalo derivadas de células estaminais embrionárias humanas (MSK-DA01)	Fase I Ativo	Não publicados
NCT06141317 [153]	2023	Costa Rica	“Regeneração tecidual e recuperação da função em doentes com Parkinson usando células estaminais pluripotentes isoladas de tecido adiposo: ensaio clínico randomizado de fase I/IIa (REPOSE)”	Células estaminais pluripotentes alogénicas isoladas de tecido adiposo	Fase I e II Ativo	Não publicados

NCT05 887466 [154]	2023	Coreia	“Estudo de centro único, aberto, de dosagem única, escalagem de dose, fase I e IIa para avaliar a segurança e eficácia da terapêutica com as células progenitoras da dopamina A9 derivadas de células estaminais embrionárias em doentes com Parkinson”	Células progenitoras da dopamina A9 derivadas de células estaminais embrionárias	Fase I e II Ativo	Não publicados
--------------------------	------	--------	---	--	-------------------	----------------

Abreviaturas da tabela: PET/CT: *Positron emission tomography/computed tomography* (tomografia por emissão de positrões/tomografia computadorizada); PRP: *Autologous Platelet Rich Plasma* (plasma autólogo rico em plaquetas); PBD-VSEL: *Peripheral blood derived very small embryonic like* (células derivadas de sangue periférico muito pequenas semelhantes a embrionárias); Allo-hMSC: *Allogeneic bone marrow-derived mesenchymal stem cell* (Células estaminais mesenquimatosas alogénicas); HB-adMSCs: *Human adipose-derived mesenchymal stem cells* (Células estaminais mesenquimatosas derivadas do adipócito humano); MSK-DA01: *Human Embryonic Stem Cell-Derived Midbrain Dopamine Progenitor Neuron Cell* (Células progenitoras de neurónios dopaminérgicos do mesencéfalo derivadas de células estaminais embrionárias humanas).

Em 2013, foram publicados os *outcomes* de um estudo clínico realizado em dois doentes com doença de Parkinson que receberam enxertos de tecido mesencefálico ventral fetal humano, rico em neuroblastos dopaminérgicos. Para avaliar a eficácia dos enxertos, estes doentes foram acompanhados durante 15 e 18 anos pós-transplante, respetivamente. A melhoria da função motora, em ambos os doentes, tonou-se mais evidente a partir do quarto ano pós transplante, tendo sido observado leve rigidez muscular, bradicinesia, marcha normal e reflexos posturais intactos. Estudos de acompanhamento pós-transplante sugerem que, com o avançar do tempo, alguns neurónios enxertados passam a expressar níveis reduzidos do transportador de dopamina e de tirosina hidroxilase (sinais de neurotransmissão comprometida), o que apoia a tese que o avançar da doença possui também impacto negativo nas células enxertadas, comprometendo o efeito terapêutico das mesmas. Apesar desta limitação, os resultados deste estudo, são o incentivo para o desenvolvimento de terapias celulares baseadas em células estaminais fetais, no tratamento da doença de Parkinson, demonstrando o seu potencial terapêutico [155].

Para além destes ensaios clínicos, é também necessário salientar a importância de um dos estudos realizados na universidade de Lund, na Suécia (reconhecida pelos seus contributos na medicina regenerativa), que comprova a eficiência do transplante de neurónios dopaminérgicos embrionários em doentes com doença de Parkinson. Neste estudo, foi demonstrado que a extensa inervação dopaminérgica derivada do enxerto transplantado é mantida até vinte e quatro anos após o transplante, com evidência na melhoria da função motora e recuperação da função dopaminérgica do estriado sem evidências de resposta imunológica do hospedeiro. Apesar dos benefícios atingidos pelo transplante, verificou-se uma perda gradual após quatorze anos ao transplante, ocorrendo perda da densidade dopaminérgica do estriado, bem como o aparecimento de inclusões positivas para ubiquitina e alfa-sinucleína em 11 a 12% dos neurónios dopaminérgicos do tecido transplantado, o que reflete a propagação da proteína responsável pela doença no cérebro do doente, acabando também por comprometer os neurónios transplantados. Este estudo forneceu evidência significativa do potencial das células estaminais embrionárias em gerar neurónios dopaminérgicos capazes de aumentar a inervação dopaminérgica e promover recuperação do fenótipo motor [21].

Atualmente, está a ser desenvolvido um ensaio com STEM-PD, uma nova terapia experimental à base de células que visa substituir os neurónios dopaminérgicos mortos em doentes com doença de Parkinson, por neurónios dopaminérgicos saudáveis derivados de células estaminais embrionárias (desenvolvidas na universidade de Lund). Espera-se que após o transplante no cérebro dos doentes de progenitores de neurónios dopaminérgicos derivados de células estaminais embrionárias, estas células se tornem maduras e se diferenciem em neurónios dopaminérgicos maduros e funcionais [156].

3.4 Resultados, limitações e observações gerais da aplicação das terapias de base celular em doenças neurodegenerativas

O uso de células estaminais no tratamento de doenças neurodegenerativas visa dar resposta à falta de terapêuticas que efetivamente desempenhem ação curativa da doença opondo-se às terapêuticas atuais que apenas amenizam os sintomas associados às doenças neurodegenerativas. Deste modo o desenvolvimento de abordagens terapêuticas, nomeadamente o estabelecimento do tipo de células estaminais e progenitoras das células neurais e gliais necessárias para a terapia de base celular em doenças neurodegenerativas como a doença de Alzheimer, Parkinson e Huntington, tem avançado continuamente nos últimos anos.

Na doença de Alzheimer, os estudos pré-clínicos desenvolvidos até à data utilizaram maioritariamente células estaminais embrionárias, células estaminais adultas (nomeadamente neurais e mesenquimatosas), mas também precursores neurais derivados de células estaminais pluripotentes induzidas. As células estaminais embrionárias foram isoladas de embriões, as adultas foram derivadas de tecido adiposo, da medula óssea ou do cordão umbilical humano e as células estaminais pluripotentes induzidas são estabelecidas em laboratórios por reprogramação celular, a partir de células especializadas como as células da pele. Dos trabalhos publicados relativos aos ensaios pré-clínicos em que se utiliza células estaminais para o tratamento de doenças neurodegenerativas, podemos retirar algumas conclusões. Em algumas situações / ensaios pré-clínicos, a expressão de fatores neurotróficos como o NGF concomitantemente com o transplante de células estaminais neurais, permitiu a sua integração no cérebro do hospedeiro melhorando o desempenho cognitivo promovido pelas células. Foi observado que o transplante de células estaminais mesenquimatosas, derivadas do tecido adiposo, no hipocampo, promove a neurogênese na zona subgranular e subventricular do cérebro através do aumento do número de precursores nervosos, os neuroblastos. Já as células estaminais mesenquimatosas derivadas do cordão umbilical, demonstraram resultados promissores, comprovando a melhoria da função cognitiva através da promoção da neurogênese com estimulação da proliferação celular e sobrevivência de novas células. O seu transplante não teve implicação no aumento da ativação da microglia, quando comparada com o cérebro do murganho não tratado, isto porque as células estaminais estão associadas à reversão da neuroinflamação microglial exercendo um efeito neuroprotetor através da modulação do estado de ativação microglial, melhorando, assim, a fisiopatologia da doença e revertendo o declínio cognitivo.

O transplante de precursores neurais derivados das células estaminais pluripotentes induzidas mostraram promover melhoria na perda de memória, plasticidade sináptica (promoção no normal funcionamento das sinapses) e ação imunomoduladora pela redução dos depósitos β amilóides através do recrutamento de microglia e processos de fagocitose. Foi também observado que os exossomas derivados de células estaminais inibiram a proliferação e ativação de microglia, associada a processos inflamatórios, no hipocampo dos murganhos bem como o aumento dos níveis de BDNF. Os exossomas têm a vantagem de como não tem capacidade de replicação nem proliferação como tal, não há risco de induzir a formação de tumor.

Os estudos pré-clínicos em modelos animais serviram de suporte para se avançar com os estudos clínicos de fase I e II, onde são avaliadas a segurança e eficácia da administração de células estaminais mesenquimatosas derivadas do cordão umbilical humano, medula óssea ou tecido adiposo. No estudo clínico apresentado, cujos resultados foram publicados, apenas foi comprovada a segurança do transplante uma vez que, pela falta de grupos controle e amostra representativa, não foi demonstrado a eficácia do estudo.

Na doença de Huntington, o tipo de células estaminais usadas nos estudos pré-clínicos é semelhante às dos estudos pré-clínicos desenvolvidos na doença de Alzheimer. Podemos retirar algumas ilações com base nos ensaios pré-clínicos apresentados. As células estaminais neurais após transplante revelam boa capacidade de migração para o local lesado e promovem o crescimento de fibras colinérgicas de neurónios, que estão envolvidos na libertação e acetilcolina nas sinapses, melhorando o funcionamento das conexões nervosas.

As células estaminais mesenquimatosas demonstraram efeito na diminuição do stress oxidativo, através do suporte neurotrófico e diminuição da atrofia do estriado (resultante da disfunção da proteína huntigntina), melhorando assim a função motora. Mas também estão envolvidas na reposição da função microglial, envolvida na modelação da plasticidade cerebral e transmissão sináptica. Foi igualmente demonstrado que as células derivadas de células estaminais embrionárias conseguem sobreviver no hospedeiro após transplante e ainda, se diferenciarem em neurónios, atingindo o propósito de substituição das células neurais degeneradas. Para além destas, os precursores neurais derivados das iPSCs mostraram também evidência na regeneração de neurónios. Além disso, as iPSCs, obtidas de indivíduos com a doença de Huntington, podem ser

submetidas a correção génica da mutação da repetição CAG, no gene da proteína Htt causadora da doença de Huntington, sendo que esta correção génica consegue persistir na diferenciação das iPSCs em neurónios.

Até ao momento, apenas foram desenvolvidos quatro ensaios clínicos em Huntington utilizando terapia celular. Estes utilizaram CellavitaHD, células estaminais mesenquimatosas derivadas da polpa dentária imatura humana, como fonte celular (hIDPSCs), mas apenas um estudo se encontra concluído. Este estudo revela que doses mais baixas de hIDPSCs (1×10^6 células) são capazes de conferir neuroproteção através da restauração da expressão do BDNF, DARPP32 e D2R, no corpo estriado. O enriquecimento de D2R protege contra a excitotoxicidade da dopamina, proporcionando um efeito neuroprotetor.

Na doença de Parkinson, foram feitos estudos com células estaminais embrionárias, células estaminais adultas (nomeadamente neurais e mesenquimatosas), mas também progenitores dopaminérgicos derivados de células estaminais pluripotentes induzidas. Através dos artigos publicados dos ensaios pré-clínicos, podemos retirar algumas conclusões. As células estaminais embrionárias demonstraram potencial terapêutico ao gerar precursores neurais que se diferenciaram em neurónios dopaminérgicos, mas também ao promover a formação de conexões sinápticas. Nos estudos em que foram usados progenitores neurais derivados de iPSCs, ocorreu também diferenciação em neurónios dopaminérgicos e foi também comprovada a segurança dos transplantes pois após dois anos de tratamento, não se observaram quaisquer tumores.

É também possível obter células estaminais a partir do sangue menstrual humano. As células estaminais endometriais, após transplante, possuem capacidade de reprimir a ativação da microglia, modulando a inflamação cerebral pela regulação da polarização da microglia dos fenótipos M1 e M2. Em M1 a microglia superativada liberta fatores neuroinflamatórios como IL1 β , IL6 e TNF α , mas ativa também as via de sinalização MAPKs/NF- κ β /ERK que provocam a apoptose neuronal. Em M2 a microglia liberta fatores anti-inflamatórios como IL4 e IL3, atuando no reparo tecidual e regeneração neuronal. As células estaminais endometriais derivadas do sangue menstrual (MenSCs) chamam a atenção pela sustentabilidade, dado que o sangue menstrual pode ser obtido periodicamente de forma não invasiva e sem trauma [142].

Até à data foram desenvolvidos dez estudos clínicos. No estudo clínico apresentado, cujos resultados foram publicados, utilizaram-se células estaminais mesenquimatosas alogénicas derivadas da medula óssea e, foi, mais uma vez provado, o efeito imunomodulador das células mesenquimatosas através do seu suporte neurotrófico, bem como a tolerabilidade e segurança da dose de 1×10^6 células.

Relativamente ao mecanismo terapêutico destes medicamentos inovadores ainda temos uma compreensão limitada de como é que estes “medicamentos” funcionam, por exemplo, que efeito terapêutico (exemplo, melhoria função motora e redução de morte neuronal) está associado a que mecanismo terapêutico (exemplo, redução neuroinflamação, substituição celular e aumento de fatores neurotróficos). Deste modo, é necessária mais investigação sobre os mecanismos de reparação e regeneração dos tecidos, bem como os métodos de integração, migração, distribuição e diferenciação no doente, e ainda estudos mais exigentes acerca da segurança e eficácia do ensaio clínico a desenvolver. O desenvolvimento de ensaios clínicos com estudos de acompanhamento alargados, nomeadamente, os estudos de fase III e IV são fundamentais para confirmar os avanços na investigação da terapia com células estaminais e, qual a evidência da sua eficácia e eficiência, por forma a poderem ser implementados na clínica num futuro próximo.

Pode-se, pois, concluir que até à data foram obtidos resultados promissores relativos à obtenção e utilização de células neurais e células gliais derivadas de células estaminais embrionárias, mesenquimatosas, neurais e células estaminais pluripotentes induzidas. Contudo, antes que as terapias baseadas em células estaminais possam ser implementadas no tratamento de doenças neurodegenerativas, as preocupações sobre o mecanismo pelo qual estas células promovem a recuperação neuronal e qual o tipo mais apropriado de células estaminais para cada doente/caso clínico devem ser mais bem aprofundadas. Assim é espectável que com o avançar do conhecimento sobre o potencial terapêutico e segurança das células estaminais será possível num futuro próximo introduzirmos a terapia celular no tratamento de algumas doenças neurodegenerativas.

Capítulo IV

4.1 Discussão e Conclusões

Desde a introdução do termo “*stammzelle*” (célula estaminal) na literatura científica até ao seu conhecimento atual, foram vários os autores que contribuíram para o seu desenvolvimento, nomeadamente: Gilman Thompson que concluiu que o tecido cerebral tem capacidade de sobreviver após transplante sem que seja perdida a sua identidade; Elizabeth Dunn que realizou o primeiro transplante bem-sucedido de tecido do SNC no cérebro de mamífero adulto; Forssman que introduziu os conceitos de neurotropismo e quimiotropismo na orientação da regeneração de nervos periféricos; Ranson, Tidd, Le Gros Clark e Glees que trabalharam no conhecimento relativo ao desenvolvimento, crescimento e diferenciação do tecido do SNC de mamífero em condições adversas ao contexto normal; Altam, Goldman e Nottebohm desenvolveram estudos com foco na neurogênese, confirmando que os neurónios do cérebro adulto poderiam ser formados *de novo*; Perlow que demonstrou os primeiros resultados positivos na recuperação funcional através do transplante de tecido cerebral de rato no cérebro adulto de rato, onde os neurónios dopaminérgicos haviam sido destruídos; Lindvall e Jeffrey tiveram grande influência no desenvolvimento das terapias de base celular aplicadas à doença de Parkinson; Finch e Ephrussi estabeleceram a primeira linha celular pluripotente a partir de células germinativas de murganhos e humanos, entre outros tantos investigadores que tem contribuído para os avanços nesta área. De ressaltar ainda o contributo de Shinya Yamanaka e John Gurdon que, em 2012, ganharam o prémio Nobel da Medicina pela descoberta de que as células maduras podem ser reprogramadas a pluripotentes [1-7,15].

As células estaminais podem ser definidas como células indiferenciadas que retém a capacidade de autorrenovação e, através de mecanismos de especialização celular, dão origem a células diferenciadas. A sua diferenciação depende do meio em que estão envolvidas, quais os fatores de crescimento, matriz extracelular e fatores de diferenciação que influenciam a função que a célula irá desempenhar. Como já referido anteriormente, as células estaminais podem ser classificadas consoante a origem, sendo esta fetal, embrionária ou adulta (ex., neural e mesenquimatoso) ou pela sua potência celular, ou seja, o tipo de células nas quais se diferenciação, podendo ser totipotentes (quando dão origem às três linhas germinativas e ainda dão origem às estruturas de suporte no desenvolvimento fetal e embrionário), pluripotentes (quando apenas originam células das

três linhas germinativas) e multipotentes (quando apenas originam células de uma só linha germinativa). As células estaminais fetais são isoladas por disseção de parte do sistema nervoso do feto, obtido por aborto espontâneo ou induzido, que contém o tipo de progenitores neuronais que devem integrar o cérebro do hospedeiro para a restituir a funcionalidade neuronal. Por outro lado, a utilização deste tipo celular levanta algumas questões éticas quanto ao nível da segurança devido aos riscos induzidos pela transplantação como pela obtenção deste material celular. As células estaminais embrionárias derivam da massa celular interna do blastocisto e tem capacidade de originar células das três camadas germinativas. As células estaminais adultas estão presentes na maioria dos tecidos e órgãos de um adulto e normalmente são definidas como multipotentes, mas existe indícios de que na medula óssea possam existir níveis reduzidos de células estaminais pluripotentes. Nas células estaminais adultas podem incluir-se as células estaminais neurais, isoladas diretamente do sistema nervoso ou obtidas a partir de precursoras de células progenitoras neurais, e as células estaminais mesenquimatosas, isoladas maioritariamente da medula óssea e do tecido adiposo [3,157].

Estudos desenvolvidos por Gurdon e Wilmut, no campo da clonagem, revelaram que as células diferenciadas são flexíveis e como tal, podem ser reprogramadas para assumir uma nova entidade. Takahashi e Yamanaka demonstraram, em 2006, que era possível a indução de células estaminais pluripotentes a partir de fibroblastos embrionários ou adultos de murganhos, através da introdução de quatro fatores específicos de transcrição, o Oct3/4, Sox2, c-Myc e Klf4, comprovando assim a possibilidade de reversão do estado diferenciado das células. Em comparação com a reprogramação de células estaminais pluripotentes induzidas (iPSCs), a reprogramação direta, em que as células não passam pelo estado de pluripotência, é um processo mais rápido, visto que nas iPSCs ocorre isolamento das células somáticas, seguida de reprogramação para obter pluripotência e só depois ocorre a diferenciação celular. Por outro lado, a reprogramação de iPSCs possibilita a formação de células em maior escala pela capacidade de autorrenovação das células pluripotentes. A reprogramação direta pode ser alcançada pelo aumento da expressão dos fatores de transcrição BAM, o Brn2, Ascl1 e Myt1L, que reprogramam as células somáticas humanas ou fibroblastos embrionários de murganhos, através da ativação de mecanismos envolvidos na neurogênese e na diferenciação neuronal [20,158].

Pequenas moléculas como o ácido valpróico sódico, CHIR99021, 616452, tranilcipromina e forskolina podem ser usadas também na reprogramação celular, ao atuarem como agonistas ou antagonistas de mecanismos celulares através da modulação das vias envolvidas na sinalização ou provocando alterações de transcrição pela ativação da via tipo Wntless (Wnt) que induz a expressão de genes de pluripotência, pela inibição da via do fator de crescimento transformador beta (TGF- β) que promove o estágio inicial da reprogramação celular e pela inibição da via MAPK/ERK que suprime a diferenciação da células pluripotentes. Estas moléculas bioativas também podem provocar alterações epigenéticas de modo a direcionar a reprogramação celular, quer pela inibição da metilação do DNA ou da modulação da metilação e da acetilação das histonas, como já discutido anteriormente. Existem evidências que estas pequenas moléculas têm capacidade para induzir processos de autofagia que melhoram, indiretamente, a eficiência da reprogramação ao renovar organelos celulares e moléculas citoplasmáticas importantes no desenvolvimento celular, bem como a indução de processos de glicólise, onde as células neurais passam por estados de hipoxia que promovem a sua sobrevivência [42,43,51,52-55].

Os mecanismos de ação através dos quais as células estaminais podem promover a regeneração do tecido cerebral, inclui a substituição celular, o efeito espectador (*Bystander Effects*), a redução da neuroinflamação e a estimulação da neurogênese. Existem diferentes abordagens para a aplicação de tecnologias emergentes com células estaminais neurais na substituição celular no sistema nervoso, como descrito, as células estaminais embrionárias podem gerar precursores neurais, os quais podem ser selecionados a partir de culturas *in vitro* e, serem, posteriormente, introduzidos no SN do hospedeiro [62].

A administração de fatores de crescimento, como FGF e EGF, ou citocinas, pode estimular as células dos nichos de células estaminais a ativarem processos endógenos de reconstrução e reparação celular. O isolamento celular e posterior reprogramação celular em precursores neuronais e crescimento *ex vivo* das células estaminais do próprio doente, aumentariam o número de células disponíveis para a substituição celular e evitariam processos imunológicos, uma vez que eram usadas células autólogas [60,61,62].

O transplante de células estaminais neurais é capaz de induzir o efeito espectador (*Bystander Effect*) que se baseia na resposta biológica das células ao meio envolvente, nomeadamente a redução de neuroinflamação, aumento de fatores neurotróficos e

aumento da neurogênese. Foi demonstrado, por Liang e colaboradores, que a cultura de células estaminais neurais em meio acrescido de fatores neutróficos, como o fator nutriente derivado de células glia, o fator neutrófico ciliar, o fator de crescimento neural, o fator de crescimento endotelial vascular, a neutrofina 3 e o fator neutrófico derivado do cérebro, promovem a ativação das três vias de sinalização principais, a cascata de sinalização MAPK/ERK, PI3-K e PLC γ , os quais estão envolvidos na neurotransmissão, neuroplasticidade, sobrevivência, crescimento e diferenciação neuronal [72-75].

A comunicação entre as células estaminais do tecido transplantado e o cérebro do hospedeiro envolve várias via de sinalização que possibilitam a transmissão da informação, sendo elas a via *juxtacrine*, a via parácrina e a via endócrina. Na via de sinalização *juxtacrine*, a transmissão da informação é feita pelo contacto direto membrana-membrana mediado pela ligação do recetor ao ligando celular, mas também pode gerar o acoplamento celular juncional onde as membranas de duas células vizinhas se tornam muito próximas (via conexinas), o que já foi observado no contacto celular entre os macrófagos do hospedeiro e as NPCs do excerto, provocando uma redução pró-inflamatória nos macrófagos e diminuindo, assim, a neuroinflamação provocada por este tipo celular. A via de sinalização parácrina resulta da difusão no meio de fatores segregados por uma célula doadora que afetam as células vizinhas, um exemplo deste efeito são as células estaminais transplantadas que segregam uma variedade de fatores de estimulação de proliferação, fatores de crescimento, interleucinas entre outros que irão regular a interação entre o tecido transplantado e o hospedeiro. Na via de sinalização endócrina, as moléculas são libertadas na corrente sanguínea e a transmissão da informação é realizada à distância, exemplificado pelas NPCs, injetadas por via intravenosa, que migram até ao baço, onde se acumulam, inibindo a ativação de macrófagos e reduzindo a ativação de TNF- α , IL6 e células *natural killer*, atuando, por esta forma, na redução da neuroinflamação [77].

A comunicação pode também ser atingida através de vesículas extracelulares que transportam as moléculas sinalizadoras/quimiotáticas, como foi demonstrado num estudo desenvolvido por Zhang e Han, onde se observou que o microRNA 374, expresso nas células NSCs, pode ser incluído em vesículas extracelulares e desempenhar um papel protetor na lesão medular, suprimindo a apoptose de células neuronais e ativando a autofagia [80].

Em doenças neurodegenerativas, a neuroinflamação crônica está muito presente comprometendo o bom funcionamento do sistema nervoso do doente. Como tal, torna-se importante reduzir os níveis de interleucinas pró-inflamatórias como fator de necrose tumoral α (TNF- α), interleucina 1b (IL1B) e interleucina 6 (IL6) para que seja garantida a sobrevivência neuronal como demonstrado no estudo desenvolvido por Liliana Mendonça e colaboradores, que recorreram a murganhos com a doença de Machado-Joseph para mostrar que o transplante de NSCs cerebelares reduz os níveis de mediadores pró-inflamatórios [82].

A estimulação da neurogênese é potenciada pelas células estaminais transplantadas como comprovado pelo estudo de Farshad Moghadam e colaboradores [84]. A partir de células derivadas de células estaminais embrionárias transplantadas em murganhos com doença de Alzheimer, ficou demonstrada a diferenciação em neurónios colinérgicos, promovendo melhorias no funcionamento normal do sistema colinérgico ao possibilitar a formação de novas sinapses e secreção de acetilcolina [85].

Os métodos de avaliação dos mecanismos terapêuticos das células estaminais estão sobre a alçada da Agência Europeia do Medicamento (EMA) e a *Food and Drug Administration* (FDA). A principal *guideline* emitida pela EMA para a regulação de medicamentos de terapia avançada, na qual se enquadram as terapias de base celular, é a EMEA/CHMP/410869/2006, que fornece diretrizes sobre medicamentos baseados em células humanas. Esta abrange aspetos como análise de risco, aspetos de qualidade e fabrico, caracterização (por exemplo, identidade, pureza celular, impurezas, potência, tumorigenicidade), controle de qualidade, validação do processo de fabrico (por exemplo, critérios de libertação e testes de estabilidade).

O documento “Supervisão regulatória de marketing de medicamentos de terapia avançada (ATMPs) na europa: A perspetiva EMA/CAT” descreve a importância da escolha do modelo animal mais adequado e explica a necessidade e importância dos estudos farmacodinâmicos que devem demonstrar os efeitos do medicamento no doente / modelo animal e estudos farmacocinéticos que preveem a biodistribuição e persistência do medicamento no organismo [87].

A diretriz sobre medicamentos baseados em células humanas, estabelecida pelo comité de medicamentos para uso humano [88], descreve a necessidade do estabelecimento de um ensaio de potência (*in vitro* e *in vivo*) adequado ao produto

medicinal em desenvolvimento, nos ensaios pré-clínicos. É também importante a monitorização das funções celulares como a viabilidade, autorrenovação, morte e diferenciação celular, comprovando a qualidade, função e sustentabilidade do medicamento em desenvolvimento. A potência do ensaio pode ser avaliada através da expressão de marcadores que demonstram a atividade biológica pretendida e observação da resposta fisiológica do organismo pela caracterização dos tipos celulares decorrentes da diferenciação. Como nas terapias avançadas, alguns medicamentos são vetores virais ou células, estes tipos de medicamentos não podem ser avaliados através das normas de pureza dos produtos farmacêuticos ditos tradicionais [89]. Têm vindo a ser desenvolvidas estratégias para avaliar o potencial oncogénico da terapia de base celular, através da avaliação *in vitro* da estabilidade genética, pela presença de células mutadas e indiferenciadas ou pelo crescimento celular dependente ou independente de fatores de crescimento, e ainda a resposta celular a estímulos de apoptose [88].

O conhecimento relativo à segurança da terapia celular ainda é limitado e necessita de estudos mais aprofundados sobre os riscos associados ao desenvolvimento deste tipo de medicamentos, nomeadamente, a identificação de fatores de risco associados à qualidade e segurança do produto, acompanhado do estabelecimento de normas que minimizem o risco e que sejam desenvolvidas ações de gestão de risco pós comercialização, no âmbito da farmacovigilância. Na diretiva EMEA/CHMP/410869/2006, encontram-se descritos critérios que podem ser usados para estimar o erro como a origem celular, a capacidade de proliferação e/ou diferenciação, a capacidade de despoletar reação imune, o nível de manipulação celular (expansão, ativação, diferenciação, genética *in vitro* ou *ex vitro*, manipulação e criopreservação), o modo de administração (administração local ou sistémica), a duração da exposição da cultura ou tempo de vida das células, a disponibilidade de dados clínicos ou estudos com produtos semelhantes, entre outros. A toxicidade dos medicamentos de base celular pode resultar de diferentes fatores, podendo ser necessário, em alguns casos, submeter o produto final a estudos de toxicidade que vão depender da capacidade de rastrear as células administradas no organismo.

Relativamente à atuação das células estaminais no tratamento de doenças neurodegenerativas, foram abordadas neste trabalho, a doença de Alzheimer, a doença de Huntington e a doença de Parkinson. Para o tratamento destas doenças progressivas e irreversíveis, a terapêutica farmacológica disponível não tem propriedades curativas,

sendo utilizada a fim de reduzir o agravamento de complicações cerebrais com o avançar da doença, bem como melhorar a qualidade de vida do doente, diminuindo a sintomatologia associada à doença. Surge então a necessidade de terapias eficazes no tratamento deste tipo de doenças com foco no potencial terapêutico das células estaminais [159].

Os estudos pré-clínicos, apresentados para cada doença, utilizam maioritariamente células estaminais embrionárias, células estaminais adultas (nomeadamente neurais e mesenquimatosas), mas também precursores neurais derivados de células estaminais pluripotentes induzidas. As células estaminais embrionárias utilizadas, nestes estudos, foram isoladas de embriões, as adultas foram derivadas de tecido adiposo da medula óssea ou do cordão umbilical humano e, as células estaminais pluripotentes induzidas foram estabelecidas em laboratório por reprogramação celular, a partir de células especializadas como as células da pele [160,161].

Relativamente aos ensaios pré-clínicos, apresentados para o tratamento da doença de Alzheimer, é possível concluir que as células estaminais possuem capacidade para promover o aumento dos níveis de fatores neurotróficos, permitindo que a sua integração no cérebro do hospedeiro seja mais bem suportada, evidenciando um desempenho cognitivo positivo por elas originado. O transplante de células estaminais mesenquimatosas derivadas do tecido adiposo e cordão umbilical demonstraram melhoria da função cognitiva através da promoção da neurogênese com estimulação da proliferação celular e sobrevivência de novas células. As células estaminais possuem efeito neuroprotetor, na medida em que possuem a capacidade de reverter a neuroinflamação, nomeadamente, através da modulação do estado de ativação da microglia. Os precursores neurais derivados das iPSCs promovem melhoria na perda de memória, plasticidade sináptica e possuem ação imunomoduladora devido à redução dos depósitos β amilóides, característicos da doença de Alzheimer [97-103].

Nos estudos pré-clínicos, apresentados para o tratamento da doença de Huntington, conclui-se que as células estaminais neurais, após transplante, revelam boa capacidade de migração para o local lesado, promovendo o crescimento de fibras neuronais colinérgicas e, melhorando, assim, o funcionamento das conexões nervosas. As células estaminais mesenquimatosas demonstraram efeito na diminuição do stress oxidativo, através da expressão de fatores neurotróficos, e diminuição da atrofia do estriado, resultante da disfunção da proteína huntigntina. Tanto os precursores derivados

das ESCs como as células derivadas de iPSCs mostraram evidência na regeneração de neurónios, apresentando o potencial de substituição das células neurais degeneradas. Para além disso, as iPSCs obtidas de indivíduos com a doença de Huntington podem ser submetidas a correção génica da mutação (excesso de expressão do codão CAG no gene Htt), sendo que esta correção persiste na diferenciação das iPSCs em neurónios e desta forma, estas células podem ser utilizadas em terapia celular no tratamento dos doentes de Huntington [121-128].

Os ensaios pré-clínicos, apresentados para o tratamento da doença de Parkinson, também evidenciaram o potencial das ESCs e iPSCs para gerar precursores neurais que se diferenciam em neurónios, assim como o potencial das células estaminais endometriais que, após transplante, conseguem reprimir a ativação da microglia, modulando a inflamação cerebral [136-143]. Os estudos clínicos apresentados nesta monografia demonstraram a segurança e tolerabilidade do transplante celular nas doenças neurodegenerativas.

O ensaio clínico apresentado, com resultados publicados, na doença de Alzheimer, revela que o transplante de células estaminais mesenquimatosas, derivadas do sangue do cordão umbilical humano, é seguro para o hospedeiro, pois não houve relatos de eventos adversos nos indivíduos tratados com estas células estaminais.

O ensaio clínico apresentado, com resultados publicados, na doença de Huntington, revela que doses baixas de células estaminais mesenquimatosas, derivadas da polpa dentária imatura humana, são capazes de conferir neuroproteção através da restauração da expressão dos níveis de BDNF, DARPP32 e D2R, no corpo estriado.

Já na doença de Parkinson, para além da evidência de segurança do transplante de células estaminais mesenquimatosas alogénicas derivadas da medula óssea, também foi demonstrada a eficácia do transplante de enxertos de tecido mesencefálico ventral fetal humano, bem como no transplante de progenitores de neurónios dopaminérgicos, derivados de células estaminais embrionárias humanas, onde é demonstrada a melhoria da função motora e recuperação da função dopaminérgica comprometida em doentes com doença de Parkinson [21][155].

Em suma, é espectável que, com o avançar do conhecimento sobre o potencial terapêutico das células estaminais, seja possível desenvolver mais ensaios clínicos que comprovem os efeitos terapêuticos desta terapia, assim como que sejam implementadas

novas linhas orientadoras pelas entidades reguladoras que contribuem para facilitar o desenvolvimento deste tipo de produtos medicinais o que, potencialmente, se traduzirá na introdução no mercado de medicamentos à base de células para o tratamento de doenças neurodegenerativas.

Referências bibliográficas

1. Haeckel E. *Natürliche schöpfungsgeschichte*. Deutsches Textarchiv (Kernkorpus); 1868.
2. Björklund A, Stenevi U. Intracerebral neural grafting: a historical perspective. In *Neural grafting in the mammalian CNS 1985* (Vol. 5, pp. 3-14). Elsevier Amsterdam.
3. Henriques D, Moreira R, Schwamborn J, Pereira de Almeida L, Mendonça LS. Successes and hurdles in stem cells application and production for brain transplantation. *Frontiers in Neuroscience*. 2019 Nov 19; 13:481655.
4. Das GD. Neural transplantation in mammalian brain: some conceptual and technical considerations. In *Neural tissue transplantation research 1983* (pp. 1-64). New York, NY: Springer New York.
5. Blau HM, Brazelton TR, Weimann JM. The evolving concept of a stem cell: entity or function? *Cell*. 2001 Jun 29;105(7):829-41.
6. Lindvall O, Rehnström S, Brundin P, Gustavii B, Åstedt B, Widner H, Lindholm T, Björklund A, Leenders KL, Rothwell JC, Frackowiak R. Neural transplantation in Parkinson's disease: the Swedish experience. *Progress in Brain Research*. 1990 Jan 1; 82:729-34.
7. Lindvall O, Widner H, Rehnström S, Brundin P, Odin P, Gustavii B, Frackowiak R, Leenders KL, Sawle G, Rothwell JC, Björklund AB. Transplantation of fetal dopamine neurons in Parkinson's disease: one-year clinical and neurophysiological observations in two patients with putaminal implants. *Annals of Neurology: Official Journal of the American Neurological Association and the Child Neurology Society*. 1992 Feb;31(2):155-65.
8. Pickard JD, editor. *Advances and technical standards in neurosurgery*. Springer Science & Business Media; 2002 Dec 18. 4-7.
9. Simsek G, Simsek E. Stem Cells, Challenging Era Beyond Debate. *Niche Journal*. 2013; 1:46-48.
10. Mendonça LS, Onofre I, Miranda CO, Perfeito R, Nóbrega C, de Almeida LP. Stem cell-based therapies for polyglutamine diseases. *Polyglutamine Disorders. Advances in experimental medicine and biology*. 2018:439-66.
11. Wagers AJ, Weissman IL. Plasticity of adult stem cells. *Cell*. 2004 Mar 5;116(5):639-648.
12. Murry CE, Keller G. Differentiation of embryonic stem cells to clinically relevant populations: lessons from embryonic development. *Cell*. 2008 Feb 22;132(4):661-80.
13. Boer GJ. Ethical issues in neurografting of human embryonic cells. *Theoretical medicine and bioethics*. 1999 Sep; 20:461-75.
14. Kordower JH, Freeman TB, Snow BJ, Vingerhoets FJ, Mufson EJ, Sanberg PR, Hauser RA, Smith DA, Nauert GM, Perl DP, Olanow CW. Neuropathological evidence of graft survival and striatal reinnervation after the transplantation of fetal mesencephalic tissue in a patient with Parkinson's disease. *New England Journal of Medicine*. 1995 Apr 27;332(17):1118-24.
15. Finch BW, Ephrussi B. Retention of multiple developmental potentialities by cells of a mouse testicular teratocarcinoma during prolonged culture in vitro and their extinction upon hybridization with cells of permanent lines. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1967 Mar;57(3):615-21.

16. Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *nature*. 1981 Jul 9;292(5819):154-6.
17. Martin GR. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1981 Dec;78(12):7634-8.
18. Rippon HJ, Bishop AE. Embryonic stem cells. *Cell proliferation*. 2004 Feb;37(1):23-34.
19. Pereira LD. A importância do uso das células estaminais para a saúde pública. *Ciência & saúde coletiva*. 2008; 13:07-14.
20. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *cell*. 2006 Aug 25;126(4):663-76.
21. Li W, Englund E, Widner H, Mattsson B, van Westen D, Lätt J, Rehn Crona S, Brundin P, Björklund A, Lindvall O, Li JY. Extensive graft-derived dopaminergic innervation is maintained 24 years after transplantation in the degenerating parkinsonian brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2016 Jun 7;113(23):6544-9.
22. Young HE, Black Jr AC. Adult stem cells. *The Anatomical Record Part A: Discoveries in Molecular, Cellular, and Evolutionary Biology: An Official Publication of the American Association of Anatomists*. 2004 Jan;276(1):75-102.
23. Bacakova L, Zarubova J, Travnickova M, Musilkova J, Pajorova J, Slepicka P, Kasalkova NS, Svorcik V, Kolska Z, Motarjemi H, Molitor M. Stem cells: their source, potency and use in regenerative therapies with focus on adipose-derived stem cells—a review. *Biotechnology advances*. 2018 Jul 1;36(4):1111-26.
24. Bline AP, Le Goff A, Allard P. What is lost in the Weismann barrier?. *Journal of developmental biology*. 2020 Dec 16;8(4):35.
25. Srivastava D, DeWitt N. In vivo cellular reprogramming: the next generation. *Cell*. 2016 Sep 8;166(6):1386-96.
26. Brix J, Zhou Y, Luo Y. The epigenetic reprogramming roadmap in generation of iPSCs from somatic cells. *Journal of Genetics and Genomics*. 2015 Dec 20;42(12):661-70.
27. Colman A. Profile of John Gurdon and Shinya Yamanaka, 2012 Nobel laureates in medicine or physiology. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013 Apr 9;110(15):5740-1.
28. Deluz C, Friman ET, Strebinger D, Benke A, Raccaud M, Callegari A, Leleu M, Manley S, Suter DM. A role for mitotic bookmarking of SOX2 in pluripotency and differentiation. *Genes & development*. 2016 Nov 15;30(22):2538-50.
29. Singh VK, Kumar N, Kalsan M, Saini A, Chandra R. Mechanism of induction: induced pluripotent stem cells (iPSCs). *Journal of stem cells*. 2015;10(1):43.
30. Jung DW, Kim WH, Williams DR. Reprogram or reboot: small molecule approaches for the production of induced pluripotent stem cells and direct cell reprogramming. *ACS Chemical Biology*. 2014 Jan 17;9(1):80-95.
31. Wang H, Yang Y, Liu J, Qian L. Direct cell reprogramming: approaches, mechanisms, and progress. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2021 Jun;22(6):410-424.
32. Koch P. Direct conversion provides old neurons from aged donor's skin. *Cell Stem Cell*. 2015 Dec 3;17(6):637-8.

33. Horisawa K, Suzuki A. Direct cell-fate conversion of somatic cells: toward regenerative medicine and industries. *Proceedings of the Japan Academy, Series B*. 2020 Apr 10;96(4):131-58.
34. Fusaki N, Ban H, Nishiyama A, Saeki K, Hasegawa M. Efficient induction of transgene-free human pluripotent stem cells using a vector based on Sendai virus, an RNA virus that does not integrate into the host genome. *Proceedings of the Japan Academy, Series B*. 2009;85(8):348-62.
35. Matsui T, Takano M, Yoshida K, Ono S, Fujisaki C, Matsuzaki Y, Toyama Y, Nakamura M, Okano H, Akamatsu W. Neural stem cells directly differentiated from partially reprogrammed fibroblasts rapidly acquire gliogenic competency. *Stem cells*. 2012 Jun 1;30(6):1109-19.
36. Tropepe V, Hitoshi S, Sirard C, Mak TW, Rossant J, Van Der Kooy D. Direct neural fate specification from embryonic stem cells: a primitive mammalian neural stem cell stage acquired through a default mechanism. *Neuron*. 2001 Apr 1;30(1):65-78.
37. Luginbühl J, Sivaraman DM, Shin JW. The essentiality of non-coding RNAs in cell reprogramming. *Non-coding RNA Research*. 2017 Mar 1;2(1):74-82.
38. Anokye-Danso F, Trivedi CM, Juhr D, Gupta M, Cui Z, Tian Y, Zhang Y, Yang W, Gruber PJ, Epstein JA, Morrissey EE. Highly efficient miRNA-mediated reprogramming of mouse and human somatic cells to pluripotency. *Cell stem cell*. 2011 Apr 8;8(4):376-88.
39. Redman M, King A, Watson C, King D. What is CRISPR/Cas9? *Archives of Disease in Childhood-Education and Practice*. 2016 Aug 1;101(4):213-215.
40. Black JB, Adler AF, Wang HG, D'Ippolito AM, Hutchinson HA, Reddy TE, Pitt GS, Leong KW, Gersbach CA. Targeted epigenetic remodeling of endogenous loci by CRISPR/Cas9-based transcriptional activators directly converts fibroblasts to neuronal cells. *Cell stem cell*. 2016 Sep 1;19(3):406-14.
41. Liao HK, Hatanaka F, Araoka T, Reddy P, Wu MZ, Sui Y, Yamauchi T, Sakurai M, O'Keefe DD, Núñez-Delicado E, Guillen P. In vivo target gene activation via CRISPR/Cas9-mediated trans-epigenetic modulation. *Cell*. 2017 Dec 14;171(7):1495-507.
42. Qin H, Zhao A, Fu X. Small molecules for reprogramming and transdifferentiation. *Cellular and molecular life sciences*. 2017 Oct; 74:3553-3575.
43. Biswas D, Jiang P. Chemically induced reprogramming of somatic cells to pluripotent stem cells and neural cells. *International journal of molecular sciences*. 2016 Feb 6;17(2):226.
44. Tam WL, Lim CY, Han J, Zhang J, Ang YS, Ng HH, Yang H, Lim B. T-cell factor 3 regulates embryonic stem cell pluripotency and self-renewal by the transcriptional control of multiple lineage pathways. *Stem cells*. 2008 Aug 1;26(8):2019-31.
45. Ying QL, Wray J, Nichols J, Batlle-Morera L, Doble B, Woodgett J, Cohen P, Smith A. The ground state of embryonic stem cell self-renewal. *nature*. 2008 May 22;453(7194):519-523.
46. Nashun B, Hill PW, Hajkova P. Reprogramming of cell fate: epigenetic memory and the erasure of memories past. *The EMBO journal*. 2015 May 12;34(10):1296-1308

47. Federation AJ, Bradner JE, Meissner A. The use of small molecules in somatic-cell reprogramming. *Trends in cell biology*. 2014 Mar 1;24(3):179-87.
48. Nóbrega C, Mendonça L, Matos CA. *A handbook of gene and cell therapy*. Basel, Switzerland: Springer; 2020 Jun 27.
49. Yoshida Y, Takahashi K, Okita K, Ichisaka T, Yamanaka S. Hypoxia enhances the generation of induced pluripotent stem cells. *Cell stem cell*. 2009 Sep 4;5(3):237-241.
50. Chen T, Shen L, Yu J, Wan H, Guo A, Chen J, Long Y, Zhao J, Pei G. Rapamycin and other longevity-promoting compounds enhance the generation of mouse induced pluripotent stem cells. *Aging cell*. 2011 Oct;10(5):908-11.
51. Hou P, Li Y, Zhang X, Liu C, Guan J, Li H, Zhao T, Ye J, Yang W, Liu K, Ge J. Pluripotent stem cells induced from mouse somatic cells by small-molecule compounds. *Science*. 2013 Aug 9;341(6146):651-4.
52. Bug G, Gül H, Schwarz K, Pfeifer H, Kampfmann M, Zheng X, Beissert T, Boehrer S, Hoelzer D, Ottmann OG, Ruthardt M. Valproic acid stimulates proliferation and self-renewal of hematopoietic stem cells. *Cancer research*. 2005 Apr 1;65(7):2537-41.
53. Kubickova L, Sedlarikova L, Hajek R, Sevcikova S. TGF- β —an excellent servant but a bad master. *Journal of translational medicine*. 2012 Dec;10:1-24.
54. Han Y, He Y, Jin X, Xie J, Yu P, Gao G, Chang S, Zhang J, Chang YZ. CHIR99021 maintenance of the cell stemness by regulating cellular iron metabolism. *Antioxidants*. 2023 Feb 4;12(2):377.
55. Yang FF, Xu XL, Hu T, Liu JQ, Zhou JZ, Ma LY, Liu HM. Lysine-specific demethylase 1 promises to be a novel target in cancer drug resistance: therapeutic implications. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2023 Apr 4;66(7):4275-93.
56. Müller FJ, Snyder EY, Loring JF. Gene therapy: can neural stem cells deliver? *Nature Reviews Neuroscience*. 2006 Jan 1;7(1):75-84.
57. Malva JO, Bernardino L. Células estaminais neurais: a caminho da reparação cerebral. *Revista da sociedade portuguesa de bioquímica*. 2010:24-9.
58. Mirahmadi M, Rezanejadbardaji H, Irfan-Maqsood M, Mokhtari MJ, Naderi-Meshkin H. Stem cell therapy for neurodegenerative diseases: Strategies for regeneration against degeneration. *Cell Ther. Regen. Med. J*. 2016;1(3).
59. Lucas B, Pérez LM, Gálvez BG. Importance and regulation of adult stem cell migration. *Journal of cellular and molecular medicine*. 2018 Feb;22(2):746-54.
60. Lee JC, Mayer-Proschel M, Rao MS. Gliogenesis in the central nervous system. *Glia*. 2000 Apr;30(2):105-21.
61. Chang MY, Son H, Lee YS, Lee SH. Neurons and astrocytes secrete factors that cause stem cells to differentiate into neurons and astrocytes, respectively. *Molecular and Cellular Neuroscience*. 2003 Jul 1;23(3):414-26.
62. Armstrong RJ, Svendsen CN. Neural stem cells: from cell biology to cell replacement. *Cell Transplantation*. 2000 Mar;9(2):139-52.
63. Kuhn S, Gritti L, Crooks D, Dombrowski Y. Oligodendrocytes in development, myelin generation and beyond. *Cells*. 2019 Nov 12;8(11):1424.

64. Chen CP, Kiel ME, Sadowski D, McKinnon RD. From stem cells to oligodendrocytes: prospects for brain therapy. *Stem Cell Reviews*. 2007 Dec; 3:280-8.
65. Jones-Villeneuve EV, McBURNEY MW, Rogers KA, Kalnins VI. Retinoic acid induces embryonal carcinoma cells to differentiate into neurons and glial cells. *The Journal of cell biology*. 1982 Aug 1;94(2):253-62.
66. Ying QL, Nichols J, Chambers I, Smith A. BMP induction of Id proteins suppresses differentiation and sustains embryonic stem cell self-renewal in collaboration with STAT3. *Cell*. 2003 Oct 31;115(3):281-92.
67. Litingtung Y, Chiang C. Control of Shh activity and signaling in the neural tube. *Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists*. 2000 Oct;219(2):143-54.
68. Barres BA. What is a glial cell? *Glia*. 2003 Jul;43(1):4-5.
69. Comella-Bolla A, Orlandi JG, Miguez A, Straccia M, García-Bravo M, Bombau G, Galofré M, Sanders P, Carrere J, Segovia JC, Blasi J. Human pluripotent stem cell-derived neurons are functionally mature in vitro and integrate into the mouse striatum following transplantation. *Molecular Neurobiology*. 2020 Jun;57(6):2766-98.
70. Farhy-Tselnicker I, Allen NJ. Astrocytes, neurons, synapses: a tripartite view on cortical circuit development. *Neural development*. 2018 Dec; 13:1-2.
71. Roybon L, Lamas NJ, Garcia-Diaz A, Yang EJ, Sattler R, Jackson-Lewis V, Kim YA, Kachel CA, Rothstein JD, Przedborski S, Wichterle H. Human stem cell-derived spinal cord astrocytes with defined mature or reactive phenotypes. *Cell reports*. 2013 Sep 12;4(5):1035-48.
72. Mitchel RE. The bystander effect: recent developments and implications for understanding the dose response. *Nonlinearity in biology, toxicology, medicine*. 2004 Jul 1;2(3), 173–183.
73. Zhang Q, Li J, An W, Fan Y, Cao Q. Neural stem cell secretome and its role in the treatment of neurodegenerative disorders. *Journal of integrative neuroscience*. 2020 Mar 30;19(1):179-185.
74. Abe K. Therapeutic potential of neurotrophic factors and neural stem cells against ischemic brain injury. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. 2000 Oct;20(10):1393-408.
75. Liang P, Liu J, Xiong J, Liu Q, Zhao J, Liang H, Zhao L, Tang H. Neural stem cell-conditioned medium protects neurons and promotes propriospinal neurons relay neural circuit reconnection after spinal cord injury. *Cell transplantation*. 2014 Jan;23(1_suppl):45-56.
76. Levy MJ, Boulle F, Steinbusch HW, van den Hove DL, Kenis G, Lanfumey L. Neurotrophic factors and neuroplasticity pathways in the pathophysiology and treatment of depression. *Psychopharmacology*. 2018 Aug; 235:2195-220.
77. Pluchino S, Cossetti C. How stem cells speak with host immune cells in inflammatory brain diseases. *Glia*. 2013 Sep;61(9):1379-401.
78. Lin CM, Gill RG. Direct and indirect allograft recognition: pathways dictating graft rejection mechanisms. *Current opinion in organ transplantation*. 2016 Feb 1;21(1):40-4.
79. Klyushnenkova E, Mosca JD, Zernetkina V, Majumdar MK, Beggs KJ, Simonetti DW, Deans RJ, McIntosh KR. T cell responses to allogeneic human mesenchymal stem cells: immunogenicity, tolerance, and suppression. *Journal of biomedical science*. 2005 Jan;12:47-57.

80. Zhang L, Han P. Neural stem cell-derived exosomes suppress neuronal cell apoptosis by activating autophagy via miR-374-5p/STK-4 axis in spinal cord injury. *Journal of Musculoskeletal & Neuronal Interactions*. 2022;22(3):411-421.
81. Cherra SJ, Chu CT. Autophagy in neuroprotection and neurodegeneration: a question of balance. *Future neurology* 2008 ;3(3), 309–323.
82. Mendonça LS, Nobrega C, Hirai H, Kaspar BK, Pereira de Almeida L. Transplantation of cerebellar neural stem cells improves motor coordination and neuropathology in Machado-Joseph disease mice. *Brain: a journal of neurology*. 2015 Feb 1;138(2):320-35.
83. Latchney SE, Eisch AJ. Therapeutic application of neural stem cells and adult neurogenesis for neurodegenerative disorders: Regeneration and beyond. *European journal of neurodegenerative disease*. 2012;1(3):335.
84. Cayre M, Canoll P, Goldman JE. Cell migration in the normal and pathological postnatal mammalian brain. *Progress in neurobiology*. 2009 May 1;88(1):41-63.
85. Moghadam FH, Alaie H, Karbalaie K, Tanhaei S, Esfahani MH, Baharvand H. Transplantation of primed or unprimed mouse embryonic stem cell-derived neural precursor cells improves cognitive function in Alzheimerian rats. *Differentiation*. 2009 Sep 1;78(2-3):59-68.
86. Regulamento (CE) n° 1394/2007 do Parlamento Europeu e do Conselho de 13 de novembro de 2007 relativo a medicamentos de terapia avançada. [Consultado a 12 março 2024]. Disponível <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/HTML/?uri=CELEX:32007R1394&from=EN>
87. Salmikangas P, Schuessler-Lenz M, Ruiz S, Celis P, Reischl I, Menezes-Ferreira M, Flory E, Renner M, Ferry N. Marketing regulatory oversight of advanced therapy medicinal products (ATMPs) in Europe: the EMA/CAT perspective. *Regulatory Aspects of Gene Therapy and Cell Therapy Products: A Global Perspective*. 2015:103-30.
88. Diretriz n° 410869/2006 da Agência Europeia do Medicamento de 1 de setembro de 2008 relativo aos medicamentos baseados em células humanas. [Internet] [Consultado a 12 março 2024]. Disponível <https://www.ema.europa.eu/en/human-cell-based-medicinal-products-scientific-guideline>
89. Abbasalizadeh S, Baharvand H. Technological progress, and challenges towards cGMP manufacturing of human pluripotent stem cells based therapeutic products for allogeneic and autologous cell therapies. *Biotechnology advances*. 2013 Dec 1;31(8):1600-23.
90. Goldring CE, Duffy PA, Benvenisty N, Andrews PW, Ben-David U, Eakins R, French N, Hanley NA, Kelly L, Kitteringham NR, Kurth J. Assessing the safety of stem cell therapeutics. *Cell stem cell*. 2011 Jun 3;8(6):618-28.
91. Amariglio N, Hirshberg A, Scheithauer BW, Cohen Y, Loewenthal R, Trakhtenbrot L, Paz N, Koren-Michowitz M, Waldman D, Leider-Trejo L, Toren A. Donor-derived brain tumor following neural stem cell transplantation in an ataxia telangiectasia patient. *PLoS medicine*. 2009 Feb;6(2):e1000029.
92. Riboldi GM, Samanta D, Frucht S. Ataxia telangiectasia. In *StatPearls*. StatPearls Publishing. 2023
93. Dingova D, Fazekas T, Okuliarova P, Strbova J, Kucera M, Hrabovska A. Low plasma cholinesterase activities are associated with deficits in spatial

- orientation, reduced ability to perform basic activities of daily living, and low body mass index in patients with progressed Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease*. 2016 Jan 1;51(3):801-13.
94. Khan S, Barve KH, Kumar MS. Recent advancements in pathogenesis, diagnostics and treatment of Alzheimer's disease. *Current neuropharmacology*. 2020 Nov 1;18(11):1106-25.
 95. Breijyeh Z, Karaman R. Comprehensive review on Alzheimer's disease: causes and treatment. *Molecules*. 2020 Dec 8;25(24):5789.
 96. Weller J, Budson A. Current understanding of Alzheimer's disease diagnosis and treatment. *F1000Research*. 2018;7.
 97. Wang Q, Matsumoto Y, Shindo T, Miyake K, Shindo A, Kawanishi M, Kawai N, Tamiya T, Nagao S. Neural stem cells transplantation in cortex in a mouse model of Alzheimer's disease. *The Journal of Medical Investigation*. 2006;53(1, 2):61-69.
 98. Wu S, Sasaki A, Yoshimoto R, Kawahara Y, Manabe T, Kataoka K, Asashima M, Yuge L. Neural stem cells improve learning and memory in rats with Alzheimer's disease. *Pathobiology*. 2008 Jun 10;75(3):186-94.
 99. Yan Y, Ma T, Gong K, Ao Q, Zhang X, Gong Y. Adipose-derived mesenchymal stem cell transplantation promotes adult neurogenesis in the brains of Alzheimer's disease mice. *Neural Regeneration Research*. 2014 Apr 15;9(8):798-805.
 100. Cui Y, Ma S, Zhang C, Cao W, Liu M, Li D, Lv P, Xing QU, Qu R, Yao N, Yang BO. Human umbilical cord mesenchymal stem cells transplantation improves cognitive function in Alzheimer's disease mice by decreasing oxidative stress and promoting hippocampal neurogenesis. *Behavioural Brain Research*. 2017 Mar 1;320:291-301.
 101. Boutajangout A, Noorwali A, Atta H, Wisniewski T. Human umbilical cord stem cell xenografts improve cognitive decline and reduce the amyloid burden in a mouse model of Alzheimer's disease. *Current Alzheimer Research*. 2017 Jan 1;14(1):104-11.
 102. McGinley LM, Kashlan ON, Bruno ES, Chen KS, Hayes JM, Kashlan SR, Raykin J, Johe K, Murphy GG, Feldman EL. Human neural stem cell transplantation improves cognition in a murine model of Alzheimer's disease. *Scientific reports*. 2018 Oct 3;8(1):14776.
 103. Armijo E, Edwards G, Flores A, Vera J, Shahnawaz M, Moda F, Gonzalez C, Sanhueza M, Soto C. Induced pluripotent stem cell-derived neural precursors improve memory, synaptic and pathological abnormalities in a mouse model of Alzheimer's disease. *Cells*. 2021 Jul 16;10(7):1802.
 104. Liu S, Fan M, Xu JX, Yang LJ, Qi CC, Xia QR, Ge JF. Exosomes derived from bone-marrow mesenchymal stem cells alleviate cognitive decline in AD-like mice by improving BDNF-related neuropathology. *Journal of Neuroinflammation*. 2022 Feb 7;19(1):35.
 105. Clinicaltrial. The Safety and The Efficacy Evaluation of NEUROSTEM®-AD in Patients with Alzheimer's Disease. [Internet] [Consultado a 21 março 2024] Disponível <https://clinicaltrials.gov/study/NCT01297218>
 106. Kim HJ, Seo SW, Chang JW, Lee JI, Kim CH, Chin J, Choi SJ, Kwon H, Yun HJ, Lee JM, Kim ST. Stereotactic brain injection of human umbilical cord blood mesenchymal stem cells in patients with Alzheimer's disease dementia: a phase 1 clinical trial. *Alzheimer's & Dementia: Translational Research & Clinical Interventions*. 2015 Sep;1(2):95-102.

107. Clinicaltrial. Safety and Exploratory Efficacy Study of NEUROSTEM® Versus Placebo in Patients With Alzheimer's Disease [Internet] [Consultado a 21 março 2024] Disponível <https://clinicaltrials.gov/study/NCT02054208>
108. Clinicaltrial. Lomecel-B Infusion Versus Placebo in Patients with Alzheimer's Disease [Internet] [Consultado a 21 março 2024] Disponível <https://clinicaltrials.gov/study/NCT02600130>
109. Clinicaltrial. A Study to Evaluate the Safety and Efficacy of AstroStem in Treatment of Alzheimer's Disease. [Internet] [Consultado a 21 março 2024] Disponível <https://clinicaltrials.gov/study/NCT03117738>
110. Clinicaltrial. Follow-up Study of Safety and Efficacy in Subjects Who Completed NEUROSTEM® Phase-I/IIa Clinical Trial. [Internet] [Consultado a 21 março 2024] Disponível <https://clinicaltrials.gov/study/NCT03172117>
111. Clinicaltrial. Alzheimer's Disease Stem Cells Multiple Infusions. [Internet] [Consultado a 22 março 2024] Disponível <https://clinicaltrials.gov/study/NCT04040348>
112. Mohapel JM, Rego AC. Doença de Huntington: uma revisão dos aspectos fisiopatológicos. *Revista Neurociências*. 2011 Dec 31;19(4):724-34.
113. Ferguson MW, Kennedy CJ, Palpagama TH, Waldvogel HJ, Faull RL, Kwakowsky A. Current and possible future therapeutic options for Huntington's disease. *Journal of Central Nervous System Disease*. 2022 Apr 7; 14:11795735221092517.
114. Medina A, Mahjoub Y, Shaver L, Pringsheim T. Prevalence, and incidence of Huntington's disease: an updated systematic review and meta-analysis. *Movement Disorders*. 2022 Dec;37(12):2327-35.
115. Vonsattel JP, DiFiglia M. Huntington disease. *Journal of neuropathology and experimental neurology*. 1998 May 1;57(5):369.
116. Jurcau A. Molecular pathophysiological mechanisms in Huntington's disease. *Biomedicines*. 2022 Jun 17;10(6):1432.
117. Andhale R, Shrivastava D. Huntington's disease: a clinical review. *Cureus*. 2022 Aug 27;14(8).
118. Adam OR, Jankovic J. Symptomatic treatment of Huntington disease. *Neurotherapeutics*. 2008 Apr 1;5(2):181-97.
119. Cano A, Fonseca E, Ettcheto M, Sánchez-López E, de Rojas I, Alonso-Lana S, Morato X, Souto EB, Toledo M, Boada M, Marquié M. Epilepsy in neurodegenerative diseases: related drugs and molecular pathways. *Pharmaceuticals*. 2021 Oct 18;14(10):1057.
120. Paiva DP, da Silva J, Quaresma ML, de Castro Sant'Anna C. Características gerais da doença de Huntington e os desafios com a vida cotidiana: uma revisão da literatura. *Journal of Health & Biological Sciences*. 2022 Dec 28;10(1):1-1.
121. Kordower JH, Chen EY, Winkler C, Fricker R, Charles V, Messing A, Mufson EJ, Wong SC, Rosenstein JM, Björklund A, Emerich DF. Grafts of EGF-responsive neural stem cells derived from GFAP-hNGF transgenic mice: Trophic and tropic effects in a rodent model of Huntington's disease. *Journal of Comparative Neurology*. 1997 Oct 13;387(1):96-113.
122. Lee ST, Chu K, Park JE, Lee K, Kang L, Kim SU, Kim M. Intravenous administration of human neural stem cells induces functional recovery in Huntington's disease rat model. *Neuroscience research*. 2005 Jul 1;52(3):243-9.

123. An MC, Zhang N, Scott G, Montoro D, Wittkop T, Mooney S, Melov S, Ellerby LM. Genetic correction of Huntington's disease phenotypes in induced pluripotent stem cells. *Cell stem cell*. 2012 Aug 3;11(2):253-63.
124. Jeon I, Lee N, Li JY, Park IH, Park KS, Moon J, Shim SH, Choi C, Chang DJ, Kwon J, Oh SH. Neuronal properties, in vivo effects, and pathology of a Huntington's disease patient-derived induced pluripotent stem cells. *Stem cells*. 2012 Sep 1;30(9):2054-62.
125. Ebrahimi MJ, Aliaghaei A, Boroujeni ME, Khodagholi F, Meftahi G, Abdollahifar MA, Ahmadi H, Danyali S, Daftari M, Sadeghi Y. Human umbilical cord matrix stem cells reverse oxidative stress-induced cell death and ameliorate motor function and striatal atrophy in rat model of Huntington disease. *Neurotoxicity Research*. 2018 Aug; 34:273-84.
126. Yu-Taeger L, Stricker-Shaver J, Arnold K, Bambynek-Dziuk P, Novati A, Singer E, Lourhmati A, Fabian C, Magg J, Riess O, Schwab M. Intranasal administration of mesenchymal stem cells ameliorates the abnormal dopamine transmission system and inflammatory reaction in the R6/2 mouse model of Huntington disease. *Cells*. 2019 Jun 15;8(6):595.
127. Islam J, So KH, Kc E, Moon HC, Kim A, Hyun SH, Kim S, Park YS. Transplantation of human embryonic stem cells alleviates motor dysfunction in AAV2-Htt171-82Q transfected rat model of Huntington's disease. *Stem Cell Research & Therapy*. 2021 Dec; 12:1-4.
128. Schellino R, Besusso D, Parolisi R, Gómez-González GB, Dallere S, Scaramuzza L, Ribodino M, Campus I, Conforti P, Parmar M, Boido M. hESC-derived striatal progenitors grafted into a Huntington's disease rat model support long-term functional motor recovery by differentiating, self-organizing and connecting into the lesioned striatum. *Stem Cell Research & Therapy*. 2023 Jul 28;14(1):189.
129. Clinicaltrial. Safety Evaluation of Cellavita HD Administered Intravenously in Participants with Huntington's Disease (SAVE-DH). [Internet] [Consultado a 25 março 2024] Disponível <https://clinicaltrials.gov/study/NCT02728115>
130. Clinicaltrial. Dose-response Evaluation of the Cellavita HD Product in Patients with Huntington's Disease (ADORE-DH). [Internet] [Consultado a 25 março 2024] Disponível <https://clinicaltrials.gov/study/NCT03252535>
131. Wenceslau CV, de Souza DM, Mambelli-Lisboa NC, Ynoue LH, Araldi RP, da Silva JM, Pagani E, Haddad MS, Kerkis I. Restoration of BDNF, DARPP32, and D2R expression following intravenous infusion of human immature dental pulp stem cells in Huntington's disease 3-NP rat model. *Cells*. 2022 May 17;11(10):1664
132. Clinicaltrial. Clinical Extension Study for Safety and Efficacy Evaluation of Cellavita-HD Administration in Huntington's Patients. (ADORE-EXT). [Internet] [Consultado a 25 março 2024] Disponível <https://clinicaltrials.gov/study/NCT04219241>
133. Clinicaltrial. Efficacy and Safety of NestaCell® in Huntington's Disease (STAR). [Internet] [Consultado a 25 março 2024] Disponível <https://classic.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT06097780>
134. Cabreira V, Massano JJ. Doença de Parkinson: Revisão clínica e atualização [Parkinson's disease: Clinical review and update]. *Acta Med Port*. 2019 Oct 1;32(10):661-70.

135. Salat D, Tolosa E. Levodopa in the treatment of Parkinson's disease: current status and new developments. *Journal of Parkinson's disease*. 2013 Jan 1;3(3):255-69.
136. Kim JH, Auerbach JM, Rodríguez-Gómez JA, Velasco I, Gavin D, Lumelsky N, Lee SH, Nguyen J, Sánchez-Pernaute R, Bankiewicz K, McKay R. Dopamine neurons derived from embryonic stem cells function in an animal model of Parkinson's disease. *nature*. 2002 Jul 4;418(6893):50-6.
137. Yasuhara T, Matsukawa N, Hara K, Yu G, Xu L, Maki M, Kim SU, Borlongan CV. Transplantation of human neural stem cells exerts neuroprotection in a rat model of Parkinson's disease. *Journal of Neuroscience*. 2006 Nov 29;26(48):12497-12511.
138. McCoy MK, Martinez TN, Ruhn KA, Wrage PC, Keefer EW, Botterman BR, Tansey KE, Tansey MG. Autologous transplants of Adipose-Derived Adult Stromal (ADAS) cells afford dopaminergic neuroprotection in a model of Parkinson's disease. *Experimental neurology*. 2008 Mar 1;210(1):14-29.
139. Kikuchi T, Morizane A, Doi D, Magotani H, Onoe H, Hayashi T, Mizuma H, Takara S, Takahashi R, Inoue H, Morita S. Human iPS cell-derived dopaminergic neurons function in a primate Parkinson's disease model. *Nature*. 2017 Aug 31;548(7669):592-6.
140. Doi D, Magotani H, Kikuchi T, Ikeda M, Hiramatsu S, Yoshida K, Amano N, Nomura M, Umekage M, Morizane A, Takahashi J. Pre-clinical study of induced pluripotent stem cell-derived dopaminergic progenitor cells for Parkinson's disease. *Nature communications*. 2020 Jul 6;11(1):3369.
141. Xiong M, Tao Y, Gao Q, Feng B, Yan W, Zhou Y, Kotsonis TA, Yuan T, You Z, Wu Z, Xi J. Human stem cell-derived neurons repair circuits and restore neural function. *Cell Stem Cell*. 2021 Jan 7;28(1):112-126.
142. Li H, Wei J, Zhang Z, Li J, Ma Y, Zhang P, Lin J. Menstrual blood-derived endometrial stem cells alleviate neuroinflammation by modulating M1/M2 polarization in cell and rat Parkinson's disease models. *Stem Cell Research & Therapy*. 2023 Apr 13;14(1):85.
143. Li M, Li J, Chen H, Zhu M. VEGF-expressing mesenchymal stem cell therapy for safe and effective treatment of pain in Parkinson's disease. *Cell Transplantation*. 2023 Jan; 32:09636897221149130.
144. Clinicaltrial. Autologous Mesenchymal Stem Cell Transplant for Parkinson's Disease. [Internet] [Consultado a 26 março 2024] Disponível <https://clinicaltrials.gov/study/NCT00976430>
145. Clinicaltrial. Using [18F] FDOPA PET/CT to Monitor the Effectiveness of Fetal Dopaminergic Grafts in Parkinson Disease Patients. [Internet] [Consultado a 26 março 2024] Disponível <https://www.clinicaltrials.gov/study/NCT02538315>
146. Clinicaltrial. Allogeneic Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cell Therapy for Idiopathic Parkinson's Disease. [Internet] [Consultado a 26 março 2024] Disponível <https://clinicaltrials.gov/study/NCT02611167>
147. Clinicaltrial. PRP and PBD-VSEL Stem Cell Therapy for Parkinson's Disease. [Internet] [Consultado a 26 março 2024] Disponível <https://classic.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT06142981>
148. Clinicaltrial. Phase IIa Randomized Placebo Controlled Trial: Mesenchymal Stem Cells as a Disease-modifying Therapy for iPD. [Internet] [Consultado a 26 março 2024] Disponível <https://clinicaltrials.gov/study/NCT04506073>

149. Schiess M, Suescun J, Doursout MF, Adams C, Green C, Saltarelli JG, Savitz S, Ellmore TM. Allogeneic bone marrow-derived mesenchymal stem cell safety in idiopathic Parkinson's disease. *Movement Disorders*. 2021 Aug;36(8):1825-34.
150. Clinicaltrial. Stereotactic Transplantation of hAESCs for Parkinson's Disease. [Internet] [Consultado a 27 março 2024] Disponível <https://clinicaltrials.gov/study/NCT04414813>
151. Clinicaltrial. Randomized, Double-Blind Clinical Trial for Parkinson's Disease (Early and Moderate) (PD). [Internet] [Consultado a 27 março 2024] Disponível <https://clinicaltrials.gov/study/NCT04928287>
152. Clinicaltrial. Phase 1 Safety and Tolerability Study of MSK-DA01 Cell Therapy for Advanced Parkinson's Disease. [Internet] [Consultado a 27 março 2024] Disponível <https://classic.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04802733>
153. Clinicaltrial. Randomized Clinical Trial in Parkinson's Disease Patients Using Pluripotent Adipose Stem Cells (PASCs). [Internet] [Consultado a 27 março 2024] Disponível <https://classic.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT06141317>
154. Clinicaltrial. Study to Evaluate the Safety and Efficacy of ESC-derived Dopamine Progenitor Cell Therapy in PD Patients. [Internet] [Consultado a 27 março 2024] Disponível <https://classic.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT05887466>
155. Kefalopoulou Z, Politis M, Piccini P, Mencacci N, Bhatia K, Jahanshahi M, Widner H, Rehncrona S, Brundin P, Björklund A, Lindvall O. Long-term clinical outcome of fetal cell transplantation for Parkinson disease: two case reports. *JAMA neurology*. 2014 Jan 1;71(1):83-7.
156. First patient receives milestone stem cell-based transplant for Parkinson's Disease. Lund University. [Internet] [Consultado a 23 de abril de 2024] Disponível <https://www.lunduniversity.lu.se/article/first-patient-receives-milestone-stem-cell-based-transplant-parkinsons-disease>
157. Bragança J, Tavares Á, Belo JA. células estaminais e medicina regenerativa. Um admirável mundo novo. *Revista da Sociedade Portuguesa de Bioquímica*. 2010;4-17.
158. Carter JL, Halmai JA, Fink KD. The iNs and outs of direct reprogramming to induced neurons. *Frontiers in genome editing*. 2020 Sep 4;2:7.
159. Hou L, Hong T. Stem cells and neurodegenerative diseases. *Science in China Series C: Life Sciences*. 2008 Apr;51(4):287-94.
160. Joers VL, Emborg ME. Preclinical assessment of stem cell therapies for neurological diseases. *ILAR journal*. 2010 Jan 1;51(1):24-41.
161. Ahmadian-Moghadam H, Sadat-Shirazi MS, Zarrindast MR. Therapeutic potential of stem cells for treatment of neurodegenerative diseases. *Biotechnology letters*. 2020 Jul;42(7):1073-101.