

Diana Marina Tavares Ferreira

# TRANSPLANTE DE CÉLULAS ESTAMINAIS EM DOENÇAS NEURODEGENERATIVAS

Monografia realizada no âmbito da unidade curricular de Acompanhamento Farmacêutico do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, orientada pelo Professor Doutor Luís Pereira de Almeida, e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Setembro 2013



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Eu, Diana Marina Tavares Ferreira, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o nº 2008009748, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo da Monografia apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade curricular de Acompanhamento Farmacêutico.

Mais declaro que este é um trabalho original e que toda e qualquer afirmação ou expressão, por mim utilizada, está referenciada na Bibliografia desta Monografia, segundo os critérios bibliográficos legalmente estabelecidos, salvaguardando sempre os Direitos de Autor, à exceção das minhas opiniões pessoais.

Coimbra, de Setembro de 2013.

O Orientador,

---

(Professor Luís Pereira de Almeida)

A aluna,

---

(Diana Marina Tavares Ferreira)

# ÍNDICE

RESUMO .....	2
ABSTRACT .....	2
1. INTRODUÇÃO: CÉLULAS ESTAMINAIS.....	3
2. TERAPIA CELULAR.....	5
2.1. A Indústria da Terapia Celular.....	5
2.2. Ensaios Clínicos com terapias baseadas em células estaminais .....	9
3. APLICAÇÃO NAS DOENÇAS NEURODEGENERATIVAS.....	11
3.1. Doença de Parkinson .....	12
3.2. Doença de Alzheimer .....	14
3.3. Doença de Huntington .....	15
3.4. Esclerose Lateral Amiotrófica.....	16
3.5. Doença de Machado-Joseph.....	18
4. PERSPECTIVAS FUTURAS E PRINCIPAIS BARREIRAS.....	19
5. CONCLUSÕES.....	21
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	22

## RESUMO

As células estaminais têm a capacidade de se dividir por longos períodos de tempo mantendo a pluripotência ou a capacidade de se diferenciar em células especializadas. Estas propriedades únicas permitiram demonstrar que o transplante de células estaminais em tecidos danificados do Sistema Nervoso Central (SNC) representa uma abordagem promissora no tratamento de doenças neurodegenerativas. No entanto, antes da disseminação da sua aplicação clínica é necessária uma compreensão científica sólida dos mecanismos que regulam a proliferação, migração, diferenciação, sobrevivência e função dos diferentes tipos de células estaminais, de modo a que os respectivos riscos e actividade terapêutica possam ser rigorosamente controlados.

Neste trabalho abordam-se alguns dos principais progressos no sector da terapia celular, quais as principais barreiras e perspectivas futuras, com particular foco na aplicação das terapias baseadas em células estaminais no tratamento de doenças neurodegenerativas.

**Palavras-chave:** células estaminais, transplante, terapia celular, doenças neurodegenerativas.

## ABSTRACT

Stem cells have the capacity to divide for long periods of time maintaining the pluripotency or the capacity to differentiate into specialized cells. These unique properties have demonstrated that transplantation of stem cells onto the damaged tissue of the Central Nervous System (CNS) represents a promising approach for treating neurodegenerative diseases. However, before clinical translation, a solid scientific understanding of the mechanisms that regulate proliferation, migration, differentiation, survival and function of various types of stem cells, so that they can be better controlled in each specific disease.

In this work, some of the main progresses in the field of the cell therapy are briefly reviewed, together with the main barriers and future prospects, with particular focus on the potential application of stem cells- based therapies in neurodegenerative diseases.

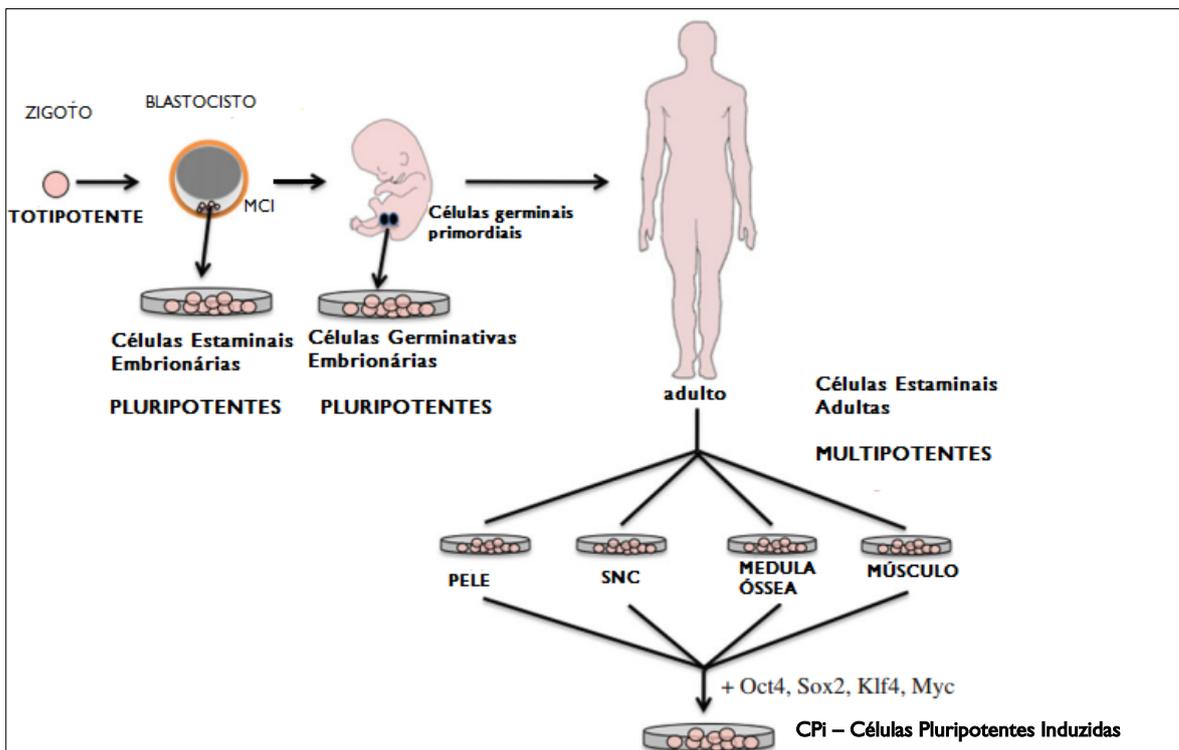
**Keywords:** stem cell, transplantation, cell therapy, neurodegenerative disease.

## I. INTRODUÇÃO: CÉLULAS ESTAMINAIS

No século XXI estamos a ser confrontados com um novo problema: o envelhecimento da população está a levar a um aumento da incidência de doenças neurodegenerativas e da falência de órgãos. Tais condições não são susceptíveis de ser tratadas pelas mesmas moléculas que tanto sucesso tiveram no século passado a restaurar a saúde e a prolongar a vida. São necessárias novas abordagens terapêuticas de modo a repor a função dos tecidos. No caso particular das doenças neurodegenerativas, para as quais ainda não há cura, a investigação de terapias com células estaminais apresenta um enorme potencial de aplicação tanto no tratamento como na prevenção (Daley, G.Q., 2012).

As células estaminais possuem três características únicas (Watt, F.M., Driskell, R.R., 2010):

1. São células não especializadas.
2. Podem dividir-se e renovar-se por longos períodos de tempo.
3. Têm a capacidade de, em condições específicas, se diferenciar em células com características e funções especializadas.



**Figura I-** As células estaminais podem ser separadas em três categorias principais. As células totipotentes são células capazes de gerar qualquer tipo de célula; são capazes de gerar um embrião, incluindo a placenta. Nos seres humanos, existem até cerca de quatro dias após a fecundação, antes da fase de blastocisto, do qual as células estaminais embrionárias são derivadas. As células pluripotentes são células capazes de gerar todas as células do corpo, excepto células totipotentes ou tecidos extra-embriónicos tais como a placenta. Dentro de um tipo específico de tecido, as células multipotentes são capazes de gerar várias células. As células estaminais adultas podem ser reprogramadas para entrar num estado de célula estaminal embrionária ao serem forçadas a expressar factores específicos de estaminalidade, sendo designadas Células Pluripotentes Induzidas (CPI). (Adaptado de Watt, F.M., Driskell, R.R., 2010)

Dois tipos de células estaminais pluripotentes de mamíferos, as células estaminais embrionárias (CEE) derivadas da massa celular interna do blastocisto e as células estaminais germinativas (CEG), obtidas a partir de embriões pós-implantados podem dar origem a qualquer célula especializada (Figura 1). As células estaminais adultas (CEA) ou células somáticas, por seu lado, estão presentes em tecidos adultos tais como a medula óssea, cérebro e sangue, mas são limitados em relação ao potencial de estaminalidade das CEE (Kim, S.U., 2007). A medula óssea engloba duas populações distintas de células estaminais: Células Estaminais Hematopoiéticas (CEH) e Células Estaminais Mesenquimais (CEM). As CEH são células multipotentes que dão origem a todos os tipos de células sanguíneas, incluindo linhagens mielóides e linhagens linfóides e também podem ser derivadas do cordão umbilical (Daley, G.Q., 2012). As CEM são progenitoras de todas as células do tecido conjuntivo (Miura, T., *et al.*, 2011), e para além da medula óssea, podem ser derivadas do tecido adiposo (Daley, G.Q., 2012).

Em 2006, Shinya Yamanaka *et al.* revolucionaram a investigação em células estaminais ao demonstrarem que fibroblastos de ratos adultos podiam ser reprogramados a um estado semelhante ao embrionário, através da expressão de factores de transcrição de pluripotência, adquirindo assim o potencial para formar qualquer célula do organismo (Svendsen, C.N., 2013). As células CPi específicas de um doente podem levar a terapia celular personalizada (Daley, G.Q., 2012).

A presença de Células Estaminais Neurónais (CEN) no SNC foi verificada tanto no estado embrionário como no estado adulto de mamíferos, incluindo seres humanos (Kim, S.U., 2007). Estas células progenitoras têm a capacidade de auto-renovação e são multipotentes, significando que têm potencial para se diferenciarem nos três tipos principais de células do SNC: neurónios, astrócitos e oligodendrócitos (Kim, S.U., 2007).

Embora ocorra neurogénese em regiões restritas do SNC adulto, esta apresenta fraco potencial de regeneração para compensar a perda de células, resultando no comprometimento funcional do cérebro. Assim, a substituição de células perdidas é uma estratégia de tratamento a considerar (Kim, S.U., 2007).

O transplante de células estaminais pode ser classificado como (1):

Alogénico - Quando o doador e receptor são da mesma espécie mas indivíduos diferentes, com um património genético heterogéneo;

Singénico – Quando o doador e o receptor são diferentes mas com património genético idêntico;

Autólogo - Quando o doador e receptor são a mesma pessoa;

Xenotransplante - Quando o doador e o receptor pertencem a espécies diferentes.

Para uma óptima recuperação de uma doença neurodegenerativa o objectivo deverá ser: substituição neuronal e reconstrução pelo menos parcial dos circuitos neuronais. No entanto, as células estaminais podem levar a melhorias funcionais com valor terapêutico através de outros mecanismos que não a substituição de células. Por exemplo, imunomodulação e neuroprotecção, através da libertação de factores tróficos e promoção da neurogénese beneficiando da capacidade das células estaminais em migrar e atingir diversas áreas do cérebro. Em comparação com a transferência directa de genes, uma vantagem de entrega baseada em células estaminais é que a produção do factor trófico continua mesmo que o processo de doença destrua as células endógenas (Lindvall, O., Kokaia, Z., 2010).

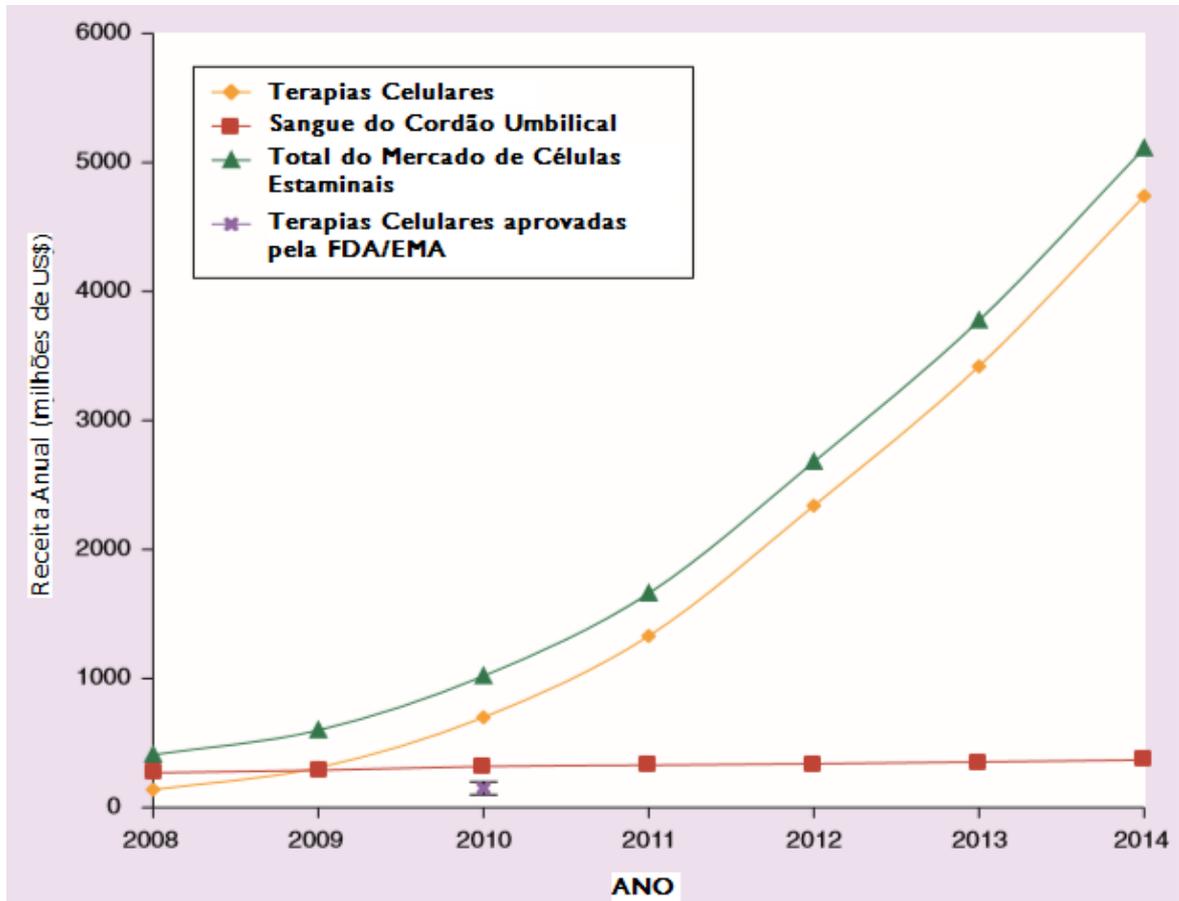
## **2. TERAPIA CELULAR**

A terapia celular é definida como a aplicação terapêutica de células, independentemente do tipo de célula ou da indicação clínica, englobando desde terapias comprovadas como o transplante de órgãos convencional a terapias avançadas com base em células estaminais (Culme-Seymour, E.J. *et al.*, 2012). Importa fazer a distinção da medicina regenerativa que usa qualquer método para substituir ou regenerar células, tecidos ou órgãos, a fim de estabelecer a função normal e, portanto, baseia-se em terapias de todos os quatro pilares da saúde: produtos farmacêuticos, produtos biológicos, dispositivos médicos e terapia celular (Mason, C. *et al.*, 2011). A terapia celular evoluiu bastante desde há 200 anos com a primeira transfusão de sangue humano, passando pelo transplante de medula óssea e de órgãos e pela fertilização *in vitro*, até à investigação de terapias baseadas em células estaminais dos dias de hoje. Assim, a terapia celular constitui um dos pilares terapêuticos da saúde global (Mason C. *et al.*, 2011).

### **2.1. A Indústria da Terapia Celular**

Actualmente, a Indústria da Terapia Celular (ITC) é um sector global de saúde pequeno, mas com enorme potencial de crescimento (Culme-Seymour, E.J. *et al.*, 2012). Em 2011, foi alcançado um importante marco: a receita anual para a ITC passou a marca do milhar de milhão de dólares, estando agora estabelecida como um sector totalmente distinto dos outros três pilares existentes de saúde (produtos farmacêuticos convencionais, biotecnologia, dispositivos médicos), (Mason, C. *et al.*, 2011). Na figura 2 é possível verificar que a ITC progrediu de receitas anuais de alguns milhões de dólares para mais de mil milhões de dólares em 2011 e estima-se que atinja os 5100 milhões dólares em 2014, ainda com potencial de crescimento. Assim, após ultrapassada a barreira dos mil milhões

de dólares de receitas anuais, a existência de diversos ensaios clínicos em curso, aliado à exigência de terapias inovadoras para doenças até agora incuráveis, a ITC está finalmente a despertar o interesse do investimento de empresas e de governo, no sentido de regular e apoiar este sector (Mason, C. *et al.*, 2011).



**Figura 2** - Mercado da Indústria da Terapia Celular (ITC) de 2008-2014. Neste gráfico é possível observar a receita anual estimada da ITC de 2008 a 2014, baseado nas actuais vendas de produtos aprovados pela FDA/EMA. Em 2011, a ITC atingiu o milhar de milhões de dólares de receitas anuais e apresenta um enorme potencial de crescimento. Um dos produtos que têm contribuído para estes lucros é o Provenge®, uma imunoterapia celular autóloga aprovada pela FDA com indicação para o cancro da próstata resistente. (Adaptado de: Mason, C. *et al.*, 2012)

Para as receitas anuais da ITC contribuiu o Provenge®, o primeiro produto de sucesso da ITC que já se encontra na prática clínica de rotina produzido pela empresa *Dendreon* (EUA). É classificado pela FDA como uma imunoterapia celular autóloga, uma vez que é produzido a partir de células do sistema imunitário dos próprios doentes e é desenhado para estimular o sistema imunitário no tratamento do cancro da próstata resistente assintomático ou minimamente sintomático (Mason, C. *et al.*, 2012).

A empresa *BioTime* (EUA) tem feito aquisições estratégicas, incluindo a aquisição da empresa *ES Cell International* (Singapura), que é responsável pela produção das primeiras células estaminais embrionárias humanas sobre condições de Boas Práticas de Fabrico (Mason, C. *et al.*, 2012).

A empresa *Neuralstem* (EUA) desenvolveu uma técnica cirúrgica e cânula flutuante para administração de CEN na medula espinhal de 18 doentes com Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA), num ensaio clínico de fase I (tabela I). O objectivo era avaliar tanto a segurança das CEN transplantadas como o método de transplante medular. Entretanto, a *Neuralstem* concedeu autorização à empresa *Q Therapeutics* (EUA) para utilização da técnica cirúrgica e cânula flutuante. Esta empresa tem igualmente um produto, Q-Cell (células gliais progenitoras), que tem como alvo a ELA. O licenciamento e o uso de técnicas e métodos comuns por várias empresas vai ajudar a facilitar a padronização que o sector tanto necessita (Mason, C. *et al.*, 2012).

Empresa	Pipeline	Alvo terapêutico	Ensaio Clínicos
<b>Brainstorm Cell Therapeutics (Israel)</b>	NurOwn™ (CEM autólogas derivadas da medula óssea)	Esclerose Lateral Amiotrófica	Fase 1/2 (à espera de aprovação da FDA)
<b>Medipost (Coreia)</b>	Neurostem® (CEM derivadas do cordão umbilical)	Doença de Alzheimer	Fase I (concluído)
<b>Neuralstem (EUA)</b>	NSI-566 (CEN humanas)	Esclerose Lateral Amiotrófica	Fase I (terminado) Fase 2 (início previsto durante 2013)
		Acidente Vascular Cerebral	Fase 1/2 (início previsto durante 2013)
		Lesões Vertebro-Medulares	Fase I (início previsto durante 2013)
		Outras Doenças Neurodegenerativas	Fase pré-clínica
<b>StemCells Inc. (EUA)</b>	HuCNS-SC® (CEN humanas purificadas)	Doença de Batten	Fase I (terminado)
<b>Opexa Therapeutics (EUA)</b>	Tcelna® (células T autólogas)	Esclerose Múltipla	Fase 2 (terminado)

PharmiCell (EUA)	<i>Cerecellgram-Stroke</i> <sup>®</sup> (células estaminais autólogas derivadas da medula óssea)	Acidente Vascular Cerebral	Fase 2 (terminado)
	<i>Cerecellgram-Spine</i> <sup>®</sup> (células estaminais autólogas derivadas da medula óssea)	Lesões vertebro-medulares	Fase 2/3 (terminado)
ReNeuron (Reino Unido)	ReN001 (CEN)	Acidente Vascular Cerebral	Fase 2 (estimado começar durante o ano de 2013)

**Tabela 1:** Principais empresas que têm como principal foco a terapia celular e os seus produtos em *pipeline* que visam doenças neurodegenerativas. Estas empresas apresentam um *pipeline* com diversas terapias baseadas em células estaminais e até ao final do terceiro trimestre de 2012 participavam em ensaios clínicos com células estaminais (tanto como financiadoras como colaboradoras) com aplicação em diversas doenças. (Fonte: Mason, C. *et al.*, 2012; (2) - (8))

A empresa *Medipost* tem no seu *pipeline* *Neurostem*<sup>®</sup> (CEM humanas derivadas do cordão umbilical) que já concluiu um ensaio clínico de fase I para a Doença de Alzheimer (DA), e está a ser analisado actualmente (Tabela 1). É esperado que o declínio cognitivo seja retardado através da administração de *Neurostem*<sup>®</sup>, uma vez que estudos pré-clínicos utilizando o modelo de rato transgénico da DA mostraram uma redução significativa das placas  $\beta$ -amilóides após uma única injeção (Mason, C. *et al.*, 2012; 3).

O principal produto em *pipeline* da empresa *StemCells Inc* é designado *HuCNS-SC*<sup>®</sup> e é apresentado como potencial tratamento para uma ampla gama de doenças do SNC. Esta empresa foi responsável pela realização do primeiro ensaio clínico aprovado pela FDA com CEN purificadas, isoladas a partir de tecido fetal. As CEN foram transplantadas em seis crianças com Doença de Batten (9), (doença neurodegenerativa autossómica recessiva rara e fatal, e a forma mais comum de um grupo de doenças designado ceroidolipofuscinose neuronal). Estudos prévios realizados pela *StemCells Inc* em modelos animais da doença indicaram que as CEN migram para diferentes áreas do cérebro e integram-se no tecido circundante e produzem a enzima em défice (9). Além disso, em Setembro de 2012 a empresa recebeu um financiamento substancial do Instituto de Medicina Regenerativa da Califórnia para apoiar estudos pré-clínicos com

HuCNS-SC® na doença de Alzheimer, projecto que é liderado por uma portuguesa – Doutora Alexandra Capela (10).

## 2.2. Ensaios Clínicos com terapias baseadas em células estaminais

O progresso nos ensaios clínicos é um bom indicador quanto à robustez de um sector terapêutico em particular (Mason, C. *et al*, 2012). Assim, as duas perguntas, "quantos ensaios clínicos de terapia celular existem actualmente?" e "qual é a sua composição?" são frequentemente ouvidas quando se fala de progresso no sector de terapia celular (Culme-Seymour, E.J. *et al.*, 2012).

De modo a perceber a dimensão actual das terapias baseadas em células estaminais foi realizada uma pesquisa no *website* ClinicalTrials.gov (27 de Agosto de 2013) com o critério "stem AND transplantation AND neurodegenerative" e os resultados vertidos na tabela 2. Apenas estudos 'em curso' são listados. Foram excluídos os estudos com *status* 'desconhecido'. Também os estudos 'suspensos', 'concluídos', 'encerrados', 'retirados' não foram incluídos. Após análise, foram excluídos ensaios que visavam o desenvolvimento de CPi a partir de células de doentes com doenças neurodegenerativas para posterior estudo dessas mesmas doenças, uma vez que esse não é o propósito deste trabalho. Assim, foram identificados 13 estudos clínicos.

Ensaio	Doença	Tipo de células	Forma de Administração	Fase	Local
"Safety of Intravenous Transplantation of Bone Marrow Derived Mesenchymal Stem Cell in Patients With ALS"	Esclerose Lateral Amiotrófica	CEM	Injecção intravenosa	Fase I	Irão
"Intrathecal Transplantation of Autologous Bone Marrow Derived Mesenchymal Stem Cell in Patients With ALS"	Esclerose Lateral Amiotrófica	CEM autólogas	Via intratecal	Fase I	Irão
"Human Neural Stem Cell Transplantation in Amyotrophic Lateral Sclerosis"	Esclerose Lateral Amiotrófica	CEN humanas	Microinjecção cirúrgica na medula espinhal	Fase I	Itália
"Clinical Trial on The Use of Autologous Bone Marrow Stem Cells in Amyotrophic Lateral Sclerosis"	Esclerose Lateral Amiotrófica	Células estaminais da medula óssea autólogas	Perfusão Intraspinhal e intratecal	Fase I/2	Espanha
"Intraventricular Transplantation of Mesenchymal Stem Cell in Patients With ALS"	Esclerose Lateral Amiotrófica	CEM	Injecção intraventricular	Fase I	Irão

“Autologous Cultured Mesenchymal Bone Marrow Stromal Cells Secreting Neurotrophic Factors (MSC-NTF), in Patients With Amyotrophic Lateral Sclerosis”	Esclerose Lateral Amiotrófica	CEM autólogas	Múltiplas injeções intramusculares em 24 locais separados, em adição a uma única injeção por via intratecal no Líquido cefalorraquidiano	Fase 2	Israel
“Human Spinal Cord Derived Neural Stem Cell Transplantation for the Treatment of Amyotrophic Lateral Sclerosis”	Esclerose Lateral Amiotrófica	CEN derivadas da medula espinhal	Implantação cirúrgica	Fase 1	EUA
“Dose Escalation and Safety Study of Human Spinal Cord Derived Neural Stem Cell Transplantation for the Treatment of Amyotrophic Lateral Sclerosis”	Esclerose Lateral Amiotrófica	CEN derivadas da medula espinhal	Injeção na medula espinhal	Fase 2	EUA
“The Clinical Trial on the Use of Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells in Amyotrophic Lateral Sclerosis”	Esclerose Lateral Amiotrófica	CEM derivadas do cordão umbilical	Transplante através de Punção Lombar	Fase 2	China
“Mesenchymal Stem Cells Transplantation to Patients With Parkinson's Disease”	Doença de Parkinson	CEM	Administração intravenosa	Fase ½	China
“Clinical Trial to Evaluate Bone Marrow Stem Cell Therapy for PSP, a Rare Form of Parkinsonism”	Paralisia Supranuclear Progressiva	CEM	Via intra-arterial na artéria carótida interna e da artéria vertebral de pequenos bolus por meio de microcateter.	Fase ½	Itália
“Safety and Efficiency of Umbilical Cord-derived Mesenchymal Stem Cell in Patients With Alzheimer's Disease”	Doença de Alzheimer	CEM derivadas do cordão umbilical	Injeção intravenosa	Fase ½	China
“A New Method to Treat Hereditary Cerebellar Ataxia - Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells Transplantation”	Ataxias cerebelares hereditárias	CEM derivadas do cordão umbilical	Transplante através de Punção Lombar	Fase 2	China

**Tabela 2:** Ensaios clínicos em curso com terapias baseadas em células estaminais em doenças neurodegenerativas. Os dados são provenientes do *website* [clinicaltrials.gov](http://clinicaltrials.gov) e incluem apenas ensaios clínicos em curso. Os estudos com *status* ‘desconhecido’, ‘suspensão’, ‘concluído’, ‘encerrado’ e ‘retirado’ foram excluídos.

Todos os ensaios ‘em curso’ listados encontram-se em fase 1, fase 1/2 ou fase 2. A maioria dos ensaios é financiada por fundações e está a ser realizada fora dos Estados Unidos da América. Dos 13 ensaios apresentados, 6 estudam a aplicação de diferentes tipos de células estaminais na Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA), estudando também diferentes locais e formas de administração, mostrando-se esta como um forte alvo para terapias inovadoras dado a falta de outras alternativas eficazes. Observando os ensaios clínicos ‘em curso’ também é possível perceber que as CEM, quer derivadas do cordão umbilical quer derivadas da medula óssea, são o tipo de células mais utilizadas, havendo já alguns estudos inclusivamente com células autólogas, que visam contornar uma das barreiras que existe na aplicação de terapias baseadas em células estaminais (imunorejeição). No entanto, tem existido um crescente interesse na investigação de terapias baseadas em CEN, comprovado pela existência de 3 ensaios clínicos ‘em curso’, um deles já em fase 2 para a ELA.

### **3.APLICAÇÃO NAS DOENÇAS NEURODEGENERATIVAS**

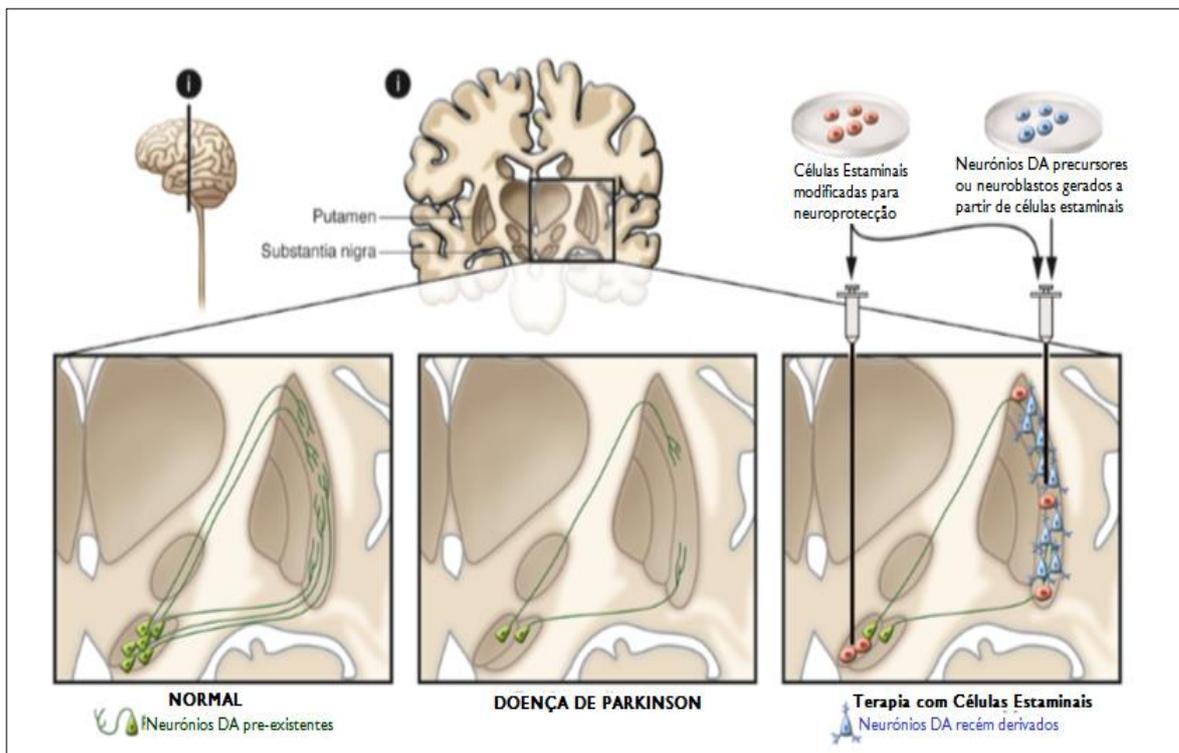
Doença neurodegenerativa é um termo usado para uma vasta gama de condições crónicas nas quais os neurónios e as células gliais no cérebro e na medula espinhal se encontram lesados, existindo ou uma perda selectiva de uma população específica de células, tais como neurónios dopaminérgicos na doença de Parkinson (DP) e neurónios motores na Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA), ou ocorrendo a degeneração generalizada de muitos tipos de neurónios, como acontece na Doença de Alzheimer (DA), ao longo de um período de vários anos (Lindvall O., Kokaia Z., 2010). Existem ainda doenças do SNC que envolvem casos agudos, por exemplo, em resposta a um Acidente Vascular Cerebral (AVC) ou em situações de Lesões Vertebro-Medulares (LVM), nas quais os diferentes tipos de neurónios e células gliais morrem dentro de uma área restrita do cérebro num curto período de tempo (Lindvall O., Kokaia Z., 2010) e que não fazendo parte do grupo das doenças neurodegenerativas propriamente ditas não serão abordadas neste trabalho, apesar de também serem um alvo para a terapia com células estaminais (ver tabela 1, secção 2.1.).

As terapias com base em células estaminais podem ser usadas para restaurar a função das células em doenças neurodegenerativas, ao substituir os neurónios perdidos ou células gliais por transplante de células derivadas de células estaminais que foram pré-diferenciadas *in vitro* em diferentes fases de maturação, ou por indução de células

estaminais endógenas no SNC adulto, para formar novos neurónios e células gliais. Adicionalmente, as células estaminais introduzidas podem induzir a melhoria funcional ao libertarem moléculas terapêuticas com propriedades neuroprotectoras ou de modulação da inflamação (Daley, G.Q., 2012). Nas secções seguintes é abordado o transplante de células estaminais num conjunto de doenças neurodegenerativas.

### 3.1. Doença de Parkinson

Na doença de Parkinson (DP) ocorre degeneração dos neurónios dopaminérgicos da substância nigra, tendo como sintomas característicos rigidez, hipocinésia, tremor e instabilidade postural (Wernig, M. *et al.*, 2008). Ainda que os sintomas motores possam ser tratados relativamente bem, faltam terapias eficazes para outros sintomas como a demência, e ainda não é possível interromper a progressão da doença (Lindvall, O., Kokaia, Z., 2010).



**Figura 3** - Terapia com Células Estaminais na DP. Na DP ocorre a morte progressiva de neurónios dopaminérgicos na substância nigra, assim como uma diminuição da inervação dopaminérgica na região do putamen. A terapia com células estaminais representa uma alternativa viável na medida em que pode actuar por dois mecanismos distintos: em primeiro, a implantação de células estaminais modificadas para libertarem factores de crescimento pode ajudar a proteger os neurónios; e, em segundo, o transplante de precursoros dos neurónios dopaminérgicos no putamen pode gerar novos neurónios, restabelecendo a função perdida. O objectivo é que após o transplante, as células resultantes apresentem as propriedades dos neurónios da substância nigra, de modo a induzir benefício substancial na DP. (Adaptado de Lindvall, O., Kokaia, Z., 2010)

O objectivo de uma terapia baseada em células estaminais na DP é que, após o transplante, as células resultantes apresentem as propriedades dos neurónios da substantia nigra. Assim, a terapia com células estaminais na DP é encarada pela comunidade científica como uma alternativa viável na medida em que pode ser aplicada por dois mecanismos diferentes: a implantação de células estaminais modificadas para libertarem factores de crescimento pode levar a neuroprotecção e, por outro lado, o transplante de precursores dos neurónios dopaminérgicos no putamen pode gerar novos neurónios, restabelecendo a função perdida (Figura 3).

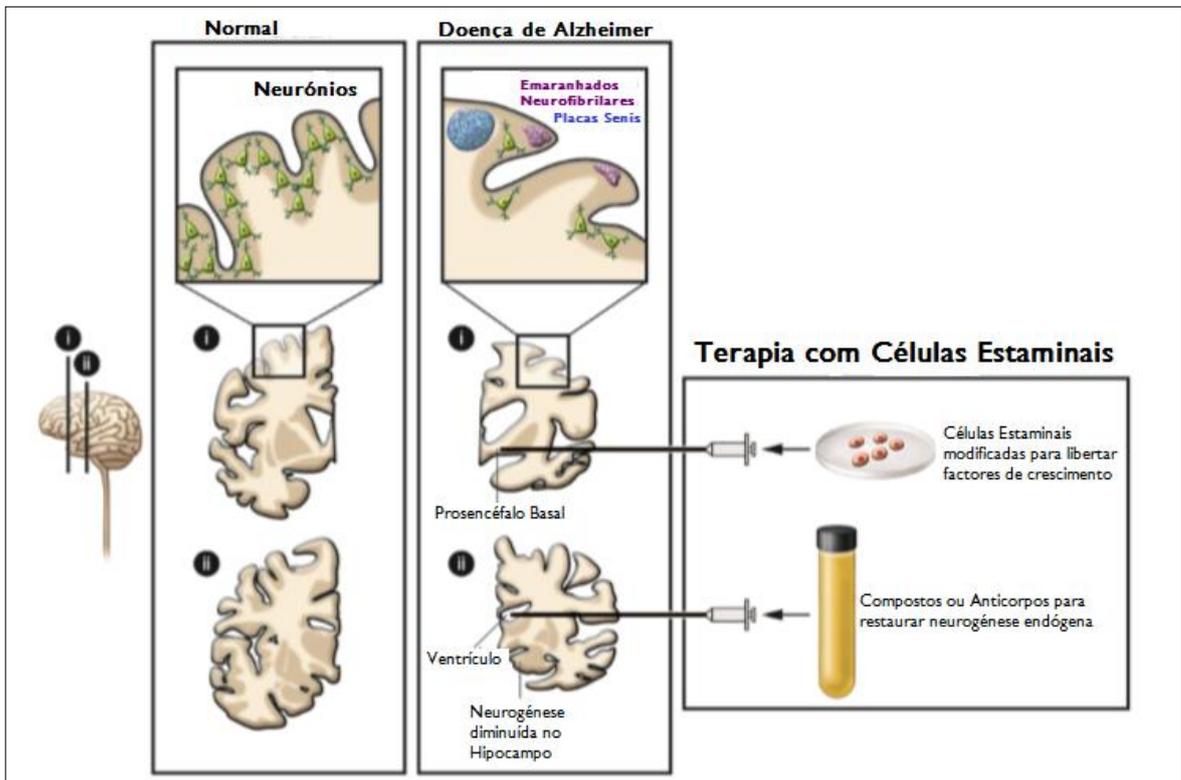
Os ensaios clínicos com transplante de tecido intrastriatal mesencefálico de embriões humanos, que é rico em neuroblastos dopaminérgicos, foram iniciados em 1987 e deram a prova de princípio de que a substituição neuronal pode ser uma alternativa exequível em doentes com DP (Lindvall, O., Kokaia, Z., 2010). Os neurónios dopaminérgicos que se formam a partir do tecido transplantado tornam-se funcionalmente integrados e restauram a libertação estriatal de dopamina dando origem ao alívio sintomático em alguns doentes (Piccini, P. *et al.*, 1999). Após uma década, os neurónios transplantados são funcionais, embora se tenha verificado que uma pequena fracção continha corpos de Lewy (uma característica neuropatológica da DP) (Lindvall, O., Kokaia, Z., 2010).

Outros grupos de investigação diferenciaram neurónios dopaminérgicos a partir de CEN e comprovaram a restauração funcional em modelos roedores (Tabar, V. *et al.*, 2008; Wernig, M. *et al.*, 2008). Para além disso, avanços recentes tornaram possível a diferenciação de células pluripotentes do mesencéfalo em subtipos neuronais regionalmente específicos cuja deficiência em dopamina é mais afectada na DP, tendo sido demonstrado funcionar também em modelos primatas da DP (Tabar, V. *et al.*, 2008).

Além disso, as células estaminais autólogas personalizadas através da reprogramação de CEA (as CPi) já estão a ser aplicadas na investigação de terapias para a DP e Tabar, V. *et al.* (2008) demonstraram que as células autólogas funcionam melhor do que as células derivadas de dadores não aparentados em modelos de roedores da DP. Assim, para a restauração funcional a longo prazo em doentes com DP, a substituição de células deve ser combinada com uma terapia neuroprotectora para impedir a progressão da doença (Lindvall, O., Kokaia, Z., 2010). Uma estratégia possível pode ser o transplante simultâneo de células estaminais geneticamente modificadas de forma a segregarem um factor trófico para o corpo estriado e substantia nigra (Piccini, P. *et al.*, 2005).

### 3.2. Doença de Alzheimer

A Doença de Alzheimer (DA) é caracterizada por défice de memória, declínio cognitivo e demência devido à perda neuronal e sináptica no sistema colinérgico do prosencéfalo basal, na amígdala, no hipocampo e nas áreas corticais, e à presença de emaranhados neurofibrilares e formação de depósitos de proteína  $\beta$ -amilóide em placas senis (Lindvall, O., Kokaia, Z., 2010).



**Figura 4** - Terapia com Células Estaminais na DA. Na DA ocorre uma perda neuronal no sistema colinérgico do prosencéfalo basal, na amígdala, no hipocampo e nas áreas corticais do cérebro. Para além disso, há formação de emaranhados neurofibrilares e acumulação de peptídeo  $\beta$ -amilóide nas designadas placas senis. A terapia com células estaminais pode contribuir para a diminuição da progressão da doença ao serem transplantadas células estaminais modificadas para libertar factores de crescimento. Por outro lado, podem ser administrados compostos e/ou anticorpos para restaurar a neurogênese endógena no hipocampo. (Adaptado de Lindvall, O., Kokaia, Z., 2010)

Uma vez que a DA afecta várias áreas do cérebro, a substituição neuronal é extremamente complexa: as células estaminais têm de ser pré-diferenciadas *in vitro* em vários tipos diferentes de neuroblastos para implantação subsequente num grande número de áreas cerebrais, o que acarreta dificuldades específicas de aplicação na DA (Boekhoorn, K. *et al.*, 2006). No entanto, têm sido reportados outros tipos de abordagens terapêuticas com base em células estaminais para a DA, uma vez que o transplante de células estaminais modificadas para libertar factores de crescimento pode

contribuir para a diminuição da progressão da doença e, além disso, podem ser administrados compostos e/ou anticorpos para restaurar a neurogênese endógena no hipocampo (Figura 4). O hipocampo, que é a parte do cérebro responsável pela aprendizagem e memória, é particularmente afectado na DA, e é considerado a base dos problemas de memória em doentes com DA, pelo que estudos experimentais sugerem que alguns dos sintomas da DA ocorrem devido à diminuição da formação de novos neurónios na região do hipocampo a partir de CEN, bem como ao aumento de neurónios imaturos em doentes com DA (Zhao C. *et al.*, 2008). Desta forma, uma alternativa viável pode ser a aplicação de terapias com base em células estaminais que visem potenciar a neurogênese e/ou a maturação dos neurónios (Lindvall, O., Kokaia, Z., 2010). Por outro lado, a terapia génica baseada em células estaminais pode levar à administração de factores que alteram o curso da DA ou que tenham propriedades neuroprotectoras, beneficiando da capacidade das células estaminais em migrar e atingir diversas áreas do cérebro (Tuszynski, M.H. *et al.*, 2005). Uma outra abordagem baseada em CEN humanas está a ser estudada por Capela, A. e LaFerla, F. (10), tendo verificado que o transplante de CEN humanas em modelos animais da DA na região do hipocampo melhora a memória, possivelmente fornecendo os factores de crescimento que protegem os neurónios da degeneração (Blurton-Jones, M. *et al.*, 2009). Assim, esta equipa, que está a ser financiada pelo Instituto de Medicina Regenerativa da Califórnia nos seus estudos pré-clínicos (ver secção 2.1.), pretende realizar os estudos necessários para obter a autorização da FDA para começar a testar esta abordagem terapêutica em doentes humanos (10).

### 3.3. Doença de Huntington

A Doença de Huntington (DH) é uma doença neurodegenerativa autossómica dominante caracterizada por movimentos involuntários, comprometimento cognitivo e distúrbios emocionais. Apesar da identificação do gene da DH e da proteína associada (Huntingtina), os mecanismos envolvidos na patogénese da DH permanecem largamente desconhecidos (Ryu, J.K. *et al.*, 2004). O transplante de células fetais humanas pode servir como uma estratégia útil na redução dos danos neuronais da DH. Lee, ST. *et al.* (2005) demonstraram que CEN humanas transplantadas em modelos animais da DH (administração intravenosa) migram para o local da lesão, protegem o corpo estriado lesionado de sofrer mais danos, diferenciam-se em células da glia e neurónios, e promovem a recuperação funcional. Bachoud-Lévi, A.C. *et al.* (2000) realizaram um estudo piloto em doentes humanos com células neuronais derivadas do tecido fetal

(transplante alogénico), onde observaram algumas melhorias clínicas nos sintomas em doentes com DH. No entanto, a comunidade científica concorda que devem ser feitos estudos pré-clínicos mais aprofundados de modo a determinar os mecanismos subjacentes.

Outra estratégia para a terapia de DH é a de melhorar a neurogénese, e a investigação recente em DH tem-se focado particularmente em estratégias de terapia celular para proteger as populações de células neuronais vulneráveis. Uma abordagem possível baseada em células estaminais consiste na administração de CEN geneticamente modificadas para libertar factores neurotróficos. Num estudo realizado em modelos animais da DH ficou demonstrado que o factor BDNF (Factor neurotrófico derivado do cérebro) pode bloquear lesões neuronais sobre condições patológicas (Kim, S.U., 2007).

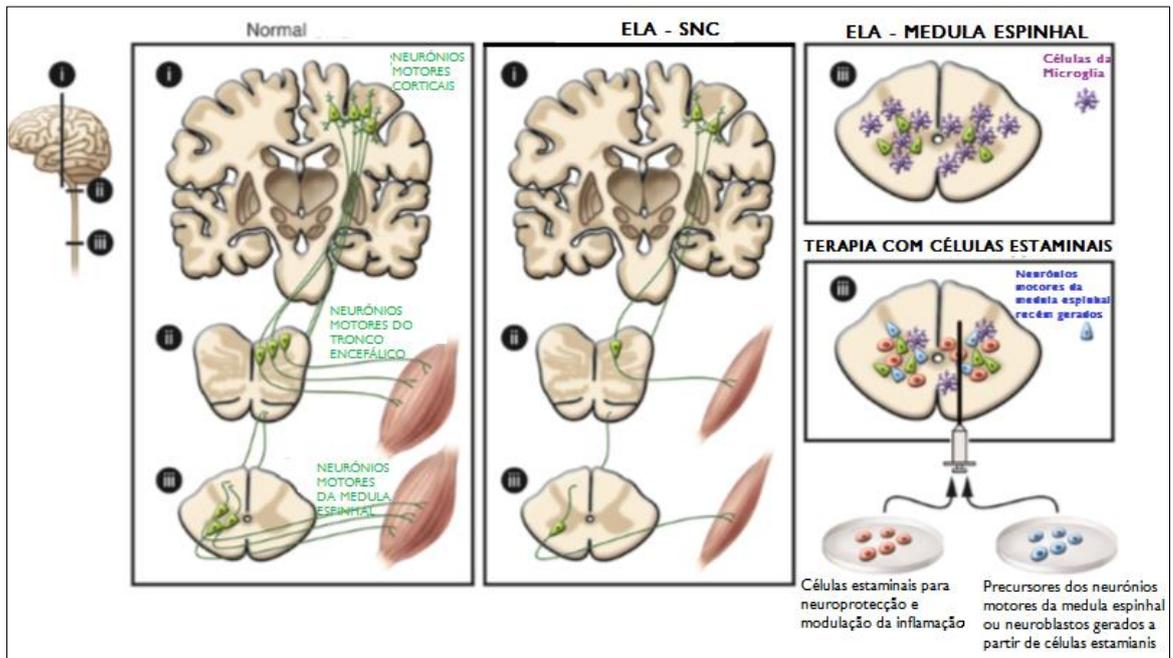
Um dos maiores desafios para aplicação de terapia celular em DH é determinar qual a fonte de células estaminais mais eficaz (Kim, S.U., 2007). Além disso, diversos estudos demonstraram que as respostas imunitárias às células estaminais transplantadas no SNC são complexas, e não podem ser ignoradas. Embora o transplante de CEN possa ser benéfico na DH, há um certo número de parâmetros que precisam ser otimizados (Lindvall, O., Kokaia, Z., 2010) e, neste momento, a utilização de células estaminais que libertem factores tróficos e promovam a neuroprotecção para prevenir a progressão da doença parece uma meta clínica mais viável na DH do que a substituição neuronal (Kim, S.U., 2007).

### **3.4. Esclerose Lateral Amiotrófica**

A Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA) é uma doença grave uma vez que a disfunção e degeneração dos neurónios motores na medula espinhal, córtex cerebral e tronco encefálico causam uma rápida e progressiva fraqueza muscular, que leva à morte em poucos anos. A ELA não tem um tratamento efectivo (Lindvall, O., Kokaia, Z., 2010).

Os neurónios motores podem ser gerados *in vitro* a partir de células estaminais provenientes de várias fontes, incluindo CEE humanas e de rato, CEN derivadas da medula espinhal de ratos, CEN humanas derivadas do prosencéfalo, e células CPI (Lindvall, O., Kokaia, Z., 2010). A terapia com células estaminais pode ser aplicada na ELA de duas formas distintas: transplante de células estaminais que induzam neuroprotecção e diminuição da inflamação; ou o transplante de precursores dos neurónios motores da medula espinhal ou neuroblastos gerados a partir de células estaminais para substituir os neurónios motores lesados (Figura 5). Foi demonstrado que precursores dos neurónios motores e neuroblastos estabelecem sinapses funcionais com as fibras musculares *in*

*in vitro*, ocorrendo extensão dos axónios até às raízes ventrais após o transplante na medula espinhal de ratos adultos com lesão nos neurónios motores. Para além disso, formam junções neuromusculares com o músculo hospedeiro, e dão origem a uma recuperação parcial da paralisia. Após o transplante em nervos tibiais transaccionados de camundongos adultos e maturação, os neurónios motores derivados das CEE de rato exibem unidades motoras normais e atenuam a atrofia muscular (Harper, JM. *et al.*, 2004).



**Figura 5** - Terapia com células estaminais na ELA. Na ELA ocorre degeneração dos neurónios motores no córtex cerebral, tronco cerebral, e medula espinhal. A terapia com células estaminais pode ser aplicada na ELA de duas formas distintas: transplante de células estaminais que induzam neuroprotecção e diminuição da inflamação; ou o transplante de precusores dos neurónios motores da medula espinhal ou neuroblastos gerados a partir de células estaminais para substituir os neurónios motores lesados. (Adaptado de Lindvall, O., Kokaia, Z., 2010).

Xu, L. *et al.*, (2009) desenvolveram estudos pré-clínicos em modelos animais de ELA comprovando que CEN transplantadas fazem contacto sináptico com os neurónios motores hospedeiros e expressam factores neurotróficos, que são protectores das células. Baseando-se nestes resultados a empresa *Neuralstem* iniciou em 2010 um ensaio clínico de fase I (referido na secção 2.1.) tendo como objectivo avaliar a segurança e verificar se as células transplantadas ficam permanentemente na região onde são transplantadas, se há reconstrução dos circuitos com os neurónios motores dos doentes e se ocorre neuroprotecção. Numa avaliação inicial dos dados de segurança dos 9 doentes iniciais, o transplante foi considerado seguro, sem a ocorrência de reacções adversas, o que foi associado à técnica cirúrgica ou às células transplantadas (II).

No entanto para a terapia de substituição de neurónios motores ser um sucesso, diversos aspectos têm de ser definidos, nomeadamente deve ser demonstrado que as

células podem ser entregues em vários locais ao longo da medula espinhal, e que são capazes de estender os seus axónios a longas distâncias para reinervar os músculos em humanos. Para além disso, deve ser estabelecido se a diferenciação dos neurónios motores da coluna vertebral é direccionada para a zona correcta (cervical, torácica, ou lombar) e se os neurónios motores centrais que degeneram na ELA, podem também ser substituídos e se promovem uma restauração funcional eficaz a longo prazo (Lindvall, O., Kokaia, Z., 2010). Contudo, o transplante de células estaminais para diminuir a perda de neurónios motores, através da libertação de factores neurotróficos ou da modulação da inflamação é uma meta clínica mais realista a curto prazo para a ELA (Lindvall, O., Kokaia, Z., 2010).

### **3.5. Doença de Machado-Joseph**

A doença de Machado-Joseph (DMJ), também conhecida como ataxia espinocerebelar tipo 3 (SCA3), é a ataxia espinocerebelar hereditária mais comum e uma das muitas doenças neurodegenerativas poliglutamínicas. Na DMJ, uma expansão da repetição CAG codifica uma poliglutamina anormalmente longa (polyQ) presente na proteína da doença, a ATXN3. A DMJ é caracterizada por ataxia cerebelar, oftalmoplegia externa progressiva, disartria, disfagia, sinais piramidais, distonia, rigidez e atrofia muscular distais. A atrofia do cerebelo é progressiva e dependente do comprimento da repetição CAG e da idade dos doentes. A DMJ, tal como outras doenças poliglutamínicas é, actualmente, incurável, havendo mesmo ausência de tratamento preventivo. Contudo muitos sintomas da doença podem ser tratados com medidas farmacológicas e não farmacológicas. Tem-se verificado desenvolvimentos promissores na busca de terapias para a DMJ. Os agentes destinados aos diferentes eventos moleculares que contribuem para a patogénese da doença têm demonstrado algum sucesso em modelos animais de DMJ, embora nenhum deles tenha ainda avançado para o ponto de ensaios clínicos em doentes com DMJ (Costa M.C., Paulson, H.L., 2012). Assim, terapias baseadas em células estaminais devem ser vistas como uma possível estratégia de tratamento, tanto pela substituição das células lesadas como pela utilização das células para libertar factores neuroprotectores ou moléculas terapêuticas. Além disso, tendo em conta a patologia uma alternativa poderá ser terapia génica baseada em células estaminais. Portanto, serão necessários estudos pré-clínicos aprofundados para averiguar a viabilidade destas estratégias terapêuticas.

## 4. PERSPECTIVAS FUTURAS E PRINCIPAIS BARREIRAS

As doenças neurodegenerativas são muito diferentes no grau de incapacidade que causam e nas alternativas terapêuticas que estão disponíveis. Por exemplo, os doentes com DP têm uma expectativa de vida quase normal e vários medicamentos são eficazes durante os primeiros anos. Em contraste, não existe um tratamento eficaz para a ELA, sendo uma doença fatal que progride rapidamente. Estas características distintas de cada doença devem ser consideradas aquando da aplicação clínica de um tratamento experimental e potencialmente arriscado baseado em células estaminais. Por um lado, se já existe uma terapia eficaz, como na DP, o risco de um efeito adverso, com base nos resultados em modelos animais pré-clínicos, tem de ser baixo e a terapêutica baseada em células estaminais deve oferecer uma vantagem substancial (por exemplo, melhor resultado funcional, administração única *versus* terapêutica medicamentosa ao longo da vida com efeitos adversos associados, análise custo-eficácia). Por outro lado, se não existe uma terapia eficaz, uma doença fatal como a ELA pode justificar os riscos potenciais de uma intervenção experimental baseada em células estaminais em doentes (Daley, G.Q., 2012). Assim, uma abordagem terapêutica baseada em células estaminais deve ser sustentada em diversos aspectos. Em primeiro lugar, a terapia com base em células estaminais tem de ser clinicamente competitiva (devem ser definidos quais os riscos aceitáveis para o doente); em segundo lugar, a patologia deverá definir que células devem ser geradas a partir de células estaminais; em terceiro lugar, terapias baseadas em células estaminais têm de demonstrar eficácia e segurança em modelos animais, antes de chegar à clínica; por último, é necessário identificar o mecanismo biológico subjacente aos efeitos observados nos modelos animais de doenças humanas (Svendsen, C.N., 2013).

Portanto, é necessário ultrapassar os obstáculos significativos que atrasam a tradução de resultados experimentais em novas terapias com aplicação clínica. Em particular, é necessário compreender melhor os mecanismos de acção das células estaminais após o transplante e aprender a controlar a proliferação de células estaminais, sobrevivência, migração e diferenciação, sendo que diversos estudos referem que as características do ambiente patológico, tais como a magnitude da inflamação, desempenham um papel crucial na sobrevivência, diferenciação e função tanto das células transplantadas como das células endógenas (Daley, G.Q., 2012).

Assim, as maiores barreiras identificadas são (Daley, G.Q., 2012; Lindvall, O., Kokaia, Z., 2010):

1. Aqueles que se opõem à utilização de embriões humanos;
2. Risco de formação de tumores após transplante de células estaminais (observado em modelos animais);
3. De forma a fornecer células diferenciadas é necessário uma contínua manutenção de células estaminais indiferenciadas por longos períodos em cultura: como garantir estabilidade cromossomal?;
4. A cultura em larga escala de células estaminais ainda é problemática: as terapias têm sido limitadas pela indisponibilidade de quantidades suficientes de células para transplante. Nesse sentido, a escala reduzida torna o processo caro e moroso;
5. Existe ainda o potencial de imunorejeição, para além de que é necessário uma diferenciação adequada para amadurecer fenótipos funcionais.

Desta forma para o êxito do desenvolvimento de terapias baseadas em células estaminais para doenças neurodegenerativas é preciso definir roteiros clínicos, nomeadamente tem de se estabelecer quais os principais marcos na pesquisa básica e clínica que precisam ser alcançados antes de tais terapias poderem ser testadas em doentes e todos os problemas associados (éticos, regulatórios, sociais, e económicos) precisam de ser abordados (Lindvall, O., Kokaia, Z., 2010).

Por um lado, o transplante de células específicas, geradas a partir de células estaminais do próprio doente (CPI) poderá eliminar as preocupações éticas associadas com as CEE e os seus derivados e, por outro lado, diminui a probabilidade de imunorejeição. No entanto, antes da aplicação poder ser considerada em doentes, o risco de formação de tumores tem que ser eliminado (Daley, G.Q., 2012).

No que diz respeito à avaliação da segurança de terapias baseadas em células estaminais, deve-se enfatizar que na maioria dos casos representam produtos totalmente novos, e a proliferação e diferenciação são difíceis de controlar. Os modelos animais podem não prever totalmente a toxicidade, a ocorrência de respostas imunes ou o risco de formação de tumores após o transplante em doentes (Lindvall, O., Kokaia, Z., 2010).

Adicionalmente, também é necessário encontrar a melhor fonte de células estaminais para cada doença em particular, de modo a facilitar estudos para a optimização da dose e da região alvo para o transplante (Daley, G.Q., 2012).

Contudo de acordo com Lindvall, O., Kokaia, Z. (2010) o transplante de células estaminais para substituição neuronal é uma estratégia mais viável a curto prazo na DP (tendo sempre como base evidência pré-clínica de eficácia e segurança e cálculo do risco-

benefício). Em contrapartida, nas outras doenças neurodegenerativas, a substituição neuronal parece mais distante, pelo que as abordagens terapêuticas com células estaminais deverão ser feitas inicialmente para neuroprotecção, fornecendo moléculas neuroprotectoras ou moduladoras da inflamação

## **5. CONCLUSÕES**

As células estaminais são claramente uma área promissora no campo das ciências da saúde, mas como muitas áreas de interesse, a sua utilização levanta questões e controvérsias. Há questões a serem esclarecidas antes da aplicação de terapias baseadas em células estaminais no SNC ser amplamente aceite na medicina clínica.

Ao longo dos últimos anos, tem havido um progresso contínuo no desenvolvimento de abordagens para gerar os tipos de neurónios e as células gliais de origem humana que são necessários para a terapia de substituição de células com base na respectiva patologia das doenças. Uma das maiores inovações é a possível utilização de células específicas produzidas a partir de células estaminais do próprio doente (as CPI). Além da substituição celular, as células estaminais podem acrescentar valor terapêutico através da imunomodulação, isto é, podem ser utilizadas para libertar factores tróficos e neuroprotectores e estimular a angiogénese. Assim, será de prever que os contínuos avanços na investigação em células estaminais produzam as bases científicas para a realização de um grande número de ensaios clínicos em doenças neurodegenerativas ao longo dos próximos anos. No entanto, para uma optimização do aproveitamento clínico de células estaminais no tratamento de doenças neurodegenerativas é necessário uma pesquisa mais aprofundada sobre os mecanismos de acção que envolvem a utilização de células estaminais, e é imprescindível mostrar evidência pré-clínica de eficácia e segurança (Daley, G.Q., 2012).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BACHOUD-LEVI, A.C. *et al.* (2000). **Motor and cognitive improvements in patients with Huntington's disease after neural transplantation.** *Lancet*. 2000 Dec 9;356(9246):1975-9.
- BOEKHOORN, K., JOELS, M., LUCASSEN, P.J. (2006). **Increased proliferation reflects glial and vascular-associated changes, but not neurogenesis in the presenile Alzheimer hippocampus.** *Neurobiol Dis*. 2006 October; 24(1): 1–14. doi: 10.1016/j.nbd.2006.04.017
- BLURTON-JONES, M. *et al.* (2009) **Neural stem cells improve cognition via BDNF in a transgenic model of Alzheimer disease.** *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 August 11; 106(32): 13594–13599. doi: 10.1073/pnas.0901402106
- CORTI, S. *et al.* (2007). **Neural stem cells LewisX+ CXCR4+ modify disease progression in an amyotrophic lateral sclerosis model.** *Brain* 2007 May; 130(Pt 5): 1289–1305. doi: 10.1093/brain/awm043
- COSTA, M.C., PAULSON, H.L. (2012) **Toward understanding Machado-Joseph Disease.** *Prog. Neurobiol.* 97, 239–257. doi:10.1016/j.pneurobio.2011.11.006
- CULME-SEYMOUR, E. J. *et al.* (2012). **A decade of cell therapy clinical trials (2000-2010).** *Regen Med*. 2012 Jul;7(4):455-62. doi: 10.2217/rme.12.45
- CUMMINGS, B.J. *et al.* (2005). **Human neural stem cells differentiate and promote locomotor recovery in spinal cord-injured mice.** *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(39):14069–14074. doi: 10.1073/pnas.0507063102
- DALEY, G.Q. (2012) **The promise and perils of Stem Cell Therapeutics.** *Cell Stem Cell*. 2012 June 14; 10(6): 740–749. doi: 10.1016/j.stem.2012.05.010
- HARPER, J.M. *et al.* (2004) **Axonal growth of embryonic stem cell-derived motoneurons in vitro and in motoneuron-injured adult rats.** *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(18):7123–7128. doi: 10.1073/pnas.0401103101

KIM, S.U. (2007). **Genetically engineered human neural stem cells for brain repair in neurological diseases.** *Brain Dev.* 2007 May; 29(4): 193–201. doi: 10.1016/j.braindev.2006.07.012

LEE, ST. *et al.*, (2005). **Intravenous administration of human neural stem cells induces functional recovery in Huntington's disease rat model.** *Neurosci Res.* 2005 July; 52(3): 243–249. doi: 10.1016/j.neures.2005.03.016

LINDVALL, O., KOKAIA, Z. (2010). **Stem cells in human neurodegenerative disorders—time for clinical translation?** *J Clin Invest.* 2010 Jan;120(1):29-40. doi: 10.1172/JCI40543.

MASON, C. *et al.* (2011). **Cell therapy industry: billion dollar global business with unlimited potential.** *Regen Med.* 2011 May;6(3):265-72. doi: 10.2217/rme.11.28.

MASON, C. *et al.* (2012). **The Global Cell Therapy Industry Continues to Rise during the Second and Third Quarters of 2012.** *Cell Stem Cell.* 2012 Dec 7;11(6):735-9. doi: 10.1016/j.stem.2012.11.013

MIURA, T., UMEZAWA, A., AKUTSU, H. **Molecular Biomarkers of Embryonic Stem Cells.** In: Craig S. Atwood and Sivan Vadakkadath Meethal. *Embryonic Stem Cells: The Hormonal Regulation of Pluripotency and Embryogenesis.* InTech: Craig Atwood (Ed.), April 4, 2011. ISBN 978-953-307-196-1. p. 160-166.

PICCINI, P. *et al.* (1999). **Dopamine release from nigral transplants visualized *in vivo* in a Parkinson's patient.** *Nature Neuroscience* 2, 1137 - 1140 (1999). doi:10.1038/16060

PICCINI, P. *et al.* (2005). **Factors affecting the clinical outcome after neural transplantation in Parkinson's disease.** *Brain* 2005 December; 128(Pt 12): 2977–2986. doi: 10.1093/brain/awh649

PLUCHINO, S. *et al.* (2005). **Neurosphere-derived multipotent precursors promote neuroprotection by an immunomodulatory mechanism.** *Nature.* 2005;436(7048):266–271. doi:10.1038/nature03889

RYU, J.K. *et al.* (2004). **Proactive transplantation of human neural stem cells prevents degeneration of striatal neurons in a rat model of Huntington disease.** *Neurobiol Dis.* 2004 June; 16(1): 68–77. doi: 10.1016/j.nbd.2004.01.016

SVENDSEN, C.N. (2013). **Back to the future: How human induced pluripotent stem cells will transform regenerative medicine.** *Hum. Mol. Genet.* (2013). doi: 10.1093/hmg/ddt379

TABAR, V. *et al.* (2008). **Therapeutic cloning in individual parkinsonian mice.** *Nat Med.* 2008 April; 14(4): 379–381. doi: 10.1038/nm1732

TUSZYNSKI, M.H. *et al.* (2005). **A phase I clinical trial of nerve growth factor gene therapy for Alzheimer disease.** *Nat Med.* 2005 May; 11(5): 551–555. doi: 10.1038/nm1239

WATT, F.M., DRISKELL, R.R. (2010). **The therapeutic potential of stem cells.** *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2010 January 12; 365(1537): 155–163. doi: 10.1098/rstb.2009.0149

WERNIG, M. *et al.* (2008). **Neurons derived from reprogrammed fibroblasts functionally integrate into the fetal brain and improve symptoms of rats with Parkinson's disease.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008 April 15; 105(15): 5856–5861. doi: 10.1073/pnas.0801677105

XU, Leyan *et al.* (2009). **Human neural stem cell grafts in the spinal cord of SOD1 transgenic rats: differentiation and structural integration into the segmental motor circuitry.** *J Comp Neurol.* 2009 Jun 1; 514(4):297-309. doi: 10.1002/cne.22022.

ZHAO, C., DENG, W., GAGE, F.H. (2008). **Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis.** *Cell*, Volume 132, Issue 4, 645-660. doi:10.1016/j.cell.2008.01.033

(1) **Cell therapy and regenerative medicine glossary.** *Regen. Med.* 7(3 Suppl.), S1–S124 (2012). [acedido a 7 de Julho de 2013] Disponível na Internet em: <http://www.futuremedicine.com/doi/pdf/10.2217/rme.12.38>

(2) [www.brainstorm-cell.com/](http://www.brainstorm-cell.com/) [acedido a 27 de Agosto de 2013]

(3) [www.medi-post.com/](http://www.medi-post.com/) [acedido a 27 de Agosto de 2013]

(4) [www.neuralstem.com/](http://www.neuralstem.com/) [acedido a 27 de Agosto de 2013]

(5) [www.stemcellsinc.com/](http://www.stemcellsinc.com/) [acedido a 27 de Agosto de 2013]

(6) [www.opexatherapeutics.com/](http://www.opexatherapeutics.com/) [acedido a 27 de Agosto de 2013]

(7) [www.pharmacellus.com](http://www.pharmacellus.com/) [acedido a 27 de Agosto de 2013]

- (8) [www.reneuron.com/](http://www.reneuron.com/) [acedido a 27 de Agosto de 2013]
- (9) <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/results/NCT00337636> [acedido a 5 de Setembro de 2013]
- (10) <http://www.cirm.ca.gov/our-funding/awards/restoration-memory-alzheimer%E2%80%99s-disease-new-paradigm-using-neural-stem-cell> [acedido a 5 de Setembro de 2013]
- (11) <http://www.neuralstem.com/cell-therapy-for-als> [acedido a 5 de Setembro de 2013]
- (12) [www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov) [acedido a 27 de Agosto de 2013]