

Silvio Filipe Borges Ferreira

## Células Estaminais: Evolução e Aplicações

Monografia realizada no âmbito da unidade Estágio Curricular do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, orientada pelo Professor Doutor José Barata Custódio e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Julho 2014



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

*Eu, Sílvio Filipe Borges Ferreira, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o nº 2007010541, 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 critérios bibliográficos legalmente estabelecidos, salvaguardando sempre os Direitos de Autor, à excepção das minhas opiniões pessoais.*

**Coimbra, 11 de Julho de 2014**

---

(Sílvio Filipe Borges Ferreira)

**O Aluno**

---

(Sílvio Filipe Borges Ferreira)

**O Orientador da Monografia**

---

(José Barata Custódio)

## **Agradecimentos**

Aos meus professores, pela transmissão de conhecimento e disponibilidade.

Aos meus pais, e às minhas irmãs por todo o apoio e carinho, por terem estado sempre presentes, ao longo do curso e da vida.

Aos meus amigos, pelo companheirismo e partilha de experiências.

Por fim, agradeço também à Rita, que foi um pilar ao longo do percurso académico.

A todos um muito obrigado!

*“The stem cell field is poised for progress. If it lives up to its early promise, it may one day restore vigor to aged and diseased muscles, hearts, and brains—perhaps even allowing humans to combine the wisdom of old age with the potential of youth.”*

Gretchen Vogel

# ÍNDICE

<b>INTRODUÇÃO</b> .....	7
<b>1. CONCEITO DE CÉLULA ESTAMINAL</b> .....	8
<b>2. LIMITAÇÕES E PRINCIPAIS BARREIRAS</b> .....	9
<b>3. CÉLULAS ESTAMINAIS INDUZIDAS</b> .....	11
<b>4. APLICAÇÃO NA TERAPÊUTICA</b> .....	15
<b>4.1. DOENÇAS NEURO-DEGENERATIVAS E LESÕES NEURONAIS</b> .....	16
<b>4.2. DIABETES MELLITUS TIPO I</b> .....	18
<b>4.3. DOENÇAS CORONÁRIAS</b> .....	19
<b>4.4. PATOLOGIAS HEMATOLÓGICAS</b> .....	20
<b>5. APLICAÇÃO NO DESENVOLVIMENTO DE FÁRMACOS</b> .....	20
<b>5.1. MODELOS PARA ESTUDAR DOENÇAS</b> .....	20
<b>5.2. SCREENING DE ATIVIDADE E TOXICIDADE EM NOVAS MOLÉCULAS</b> .....	21
<b>6. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS</b> .....	22
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	24

**RESUMO:**

As células estaminais representam uma área de conhecimento emergente, de variado espectro de aplicação, que vai desde a terapêutica ao desenvolvimento de novos fármacos.

Devido às limitações do uso de células estaminais embrionárias, a pesquisa evoluiu no sentido de indução de pluripotência a partir de vários tipos de células. Têm sido estudadas várias formas de se obter células pluripotentes ao longo dos anos.

A sua aplicação terapêutica está ainda numa fase prematura e são necessários mais estudos para ultrapassar as limitações que existem, apesar do grande progresso já alcançado. Várias aplicações têm surgido, nomeadamente o desenvolvimento de fármacos e no estudo de modelos de doenças. Com todo o investimento aplicado, será de esperar um futuro promissor para esta tecnologia.

**Palavras-chave:** células estaminais, medicina regenerativa, indução de pluripotência, aplicação terapêutica

**ABSTRACT:**

Stem cells represent an emerging area of knowledge, with a wide range of applications, from the therapeutics to the drug development.

Due to the limitations of the use of embryonic stem cells, research has moved towards the induction of pluripotency from various cell types. Several ways to obtaining pluripotent cells over the years have been studied.

The stem cell's therapeutic application is still at an early stage, and further studies are required to overcome the limitations that exist, despite the great progress achieved. Several applications have emerged, such as in the development of drugs and in the study of disease models. With all the efforts made, it will be to expect a promising future for this technology.

**Keywords:** stem cells, regenerative medicine, pluripotency induction, therapeutic application

## INTRODUÇÃO

O conceito de célula estaminal foi introduzido pela primeira vez em 1908 por Alexander Maksimov, que teorizou a existência de células estaminais hematopoiéticas, precursoras das células do tecido sanguíneo (Biography of Alexander A. Maximow, 2007). Apesar dos seus estudos na área, só em 1978 foram efectivamente descobertas estas células, abrindo caminho para uma tecnologia tão promissora, que mais tarde veio a englobar a medicina regenerativa (Prindull et al., 1978).

Inúmeros estudos têm sido realizados utilizando as tradicionais células estaminais embrionárias, destacando-se o trabalho desenvolvido por James Thomson que isolou pela primeira vez células estaminais embrionárias humanas, fazendo-as proliferar em laboratório (Thomson et al., 1998). Devido às suas limitações de histocompatibilidade e ética, houve necessidade de evolução, sendo introduzido o conceito de indução de pluripotência, recentemente, numa tentativa de ultrapassar as barreiras impostas até então (Takahashi & Yamanaka, 2006).

A sua aplicação à medicina regenerativa tem como objectivos: a utilização destas células de uma forma eficaz na terapia regenerativa de órgãos e tecidos lesionados, bem como na melhoria da qualidade de vida, aumentando o potencial do ser humano em termos de longevidade (Ratajczak et al., 2014).

Assim, a presente monografia tem por objectivo fazer uma revisão da evolução da medicina regenerativa, no contexto das células estaminais, focando as principais vantagens e desvantagens da sua aplicação, obstáculos e barreiras a ultrapassar, bem como das áreas de aplicação no campo da medicina. Adicionalmente, pretende-se também perspectivar sobre o futuro desta tecnologia, de acordo com os dados actuais, dando uma opinião pessoal sobre o assunto.

## **I. CONCEITO DE CÉLULA ESTAMINAL**

As células estaminais são células indiferenciadas, precursoras das diferentes células do organismo humano, animal, ou mesmo vegetal. Desta forma, são capazes de dar origem a qualquer tipo de célula ou tecido do organismo. Possuem grande capacidade de se dividirem, auto-renovarem e diferenciarem, apresentando elevada potência, propriedades que são de extrema importância no contexto da medicina regenerativa (Bose, 2012). Estas células podem dividir-se simetricamente, isto é, originando duas células filhas exactamente iguais à que lhes deu origem. Por outro lado, a sua divisão pode ser assimétrica, originando duas células filhas diferentes, uma igual à célula mãe e outra um pouco mais diferenciada. Existe portanto um balanço entre estes dois processos na regulação da manutenção e regeneração dos tecidos do organismo (Simsek & Simsek, 2012).

Na literatura encontram-se dois tipos de classificação destas células, de acordo com a sua potência ou com o seu estado de diferenciação.

A potência celular define-se como a capacidade de uma célula se dividir e diferenciar em diferentes células do organismo (Mitalipov & Wolf, 2009). No fundo, representa a extensão da sua capacidade de diferenciação, apresentando um total de cinco níveis distintos, por ordem decrescente: células totipotentes, pluripotentes, multipotentes, oligopotentes e unipotentes.

A totipotência representa o nível máximo de capacidade de diferenciação, em que a célula pode dar origem a qualquer tipo de tecido do organismo humano, como é o caso do zigoto, formado após a fecundação dos gametas masculino e feminino (Mitalipov & Wolf, 2009). Esta célula é a precursora de todo o organismo humano.

A pluripotência representa o nível seguinte, em que uma célula é capaz de formar qualquer tipo de tecido, mas não um organismo inteiro. Por exemplo, as células do botão embrionário do blastocisto podem formar qualquer um dos três tecidos do embrião (endoderme, mesoderme e ectoderme) dando posteriormente origem ao feto, mas não conseguem originar os tecidos extra-embrionários como a placenta e os anexos embrionários (Bose, 2012).

As células multipotentes apresentam uma capacidade de diferenciação inferior, originando células da mesma camada germinativa, como é o caso das células hematopoiéticas que originam o tecido sanguíneo, ou as células estaminais mesenquimatosas, que vão originar os osteoblastos e adipócitos (Uccelli et al., 2008). Este tipo de célula está confinado à linha germinativa a que pertence, sendo que uma célula multipotente, por exemplo do tecido sanguíneo, não vai originar células do tecido nervoso (Bose, 2012).

Num nível hierárquico inferior situam-se as células oligopotentes, capazes de formar tecidos dentro da mesma família, como é o caso das células mielóides originárias dos diferentes leucócitos, e as células unipotentes, capazes de se diferenciarem em um único tipo de tecido (Simsek & Simsek, 2012). Estas células “finais” encontram-se no nível máximo de diferenciação.

De acordo com o grau de diferenciação e local de obtenção, são classificadas em dois tipos: as células estaminais embrionárias e as células estaminais adultas (também designadas por somáticas) (Simsek & Simsek, 2012). As primeiras encontram-se localizadas no blastocisto e são pluripotentes, enquanto as segundas encontram-se dispersas nos diversos tecidos do organismo já formado, constituindo células de variada potência, desde multipotentes a unipotentes. São responsáveis pela manutenção e regeneração dos tecidos onde se encontram localizadas (Simsek & Simsek, 2012).

## **2. LIMITAÇÕES E PRINCIPAIS BARREIRAS**

Desde a sua descoberta que as células estaminais embrionárias revolucionaram o conceito de medicina regenerativa. Devido ao seu potencial de auto-renovação e diferenciação em qualquer tecido ou órgão do organismo humano, em teoria, estas células poderiam resolver inúmeras patologias que afectam os seres humanos, fornecendo uma quantidade de tecido para transplante virtualmente ilimitada.

Neste contexto, levanta-se a questão ética e moral, porque a obtenção de células embrionárias humanas envolve a destruição de embriões, ou seja, durante a recolha, o embrião é automaticamente destruído (Pereira, 2008). Desta forma, a sua utilização para fins de pesquisa e terapêutica não tem sido aceite, apesar de já há muito tempo se utilizarem embriões fertilizados *in vitro*, no contexto da reprodução assistida, e muitos desses embriões acabarem por ser desprezados (Pereira, 2008). Este obstáculo tem atrasado, de certa forma, a pesquisa neste campo e de acordo com o meu ponto de vista, deveria ser ultrapassado, já que os embriões podem ser desenvolvidos *in vitro*, não necessitando obrigatoriamente de ser implantados no útero humano.

No entanto, em 2008 foram criadas as primeiras células embrionárias humanas, sem que houvesse destruição do embrião. O processo consistia em retirar um único blastómero dos embriões fecundados *in vitro*, através de biópsia. Esse blastómero, juntamente com o embrião de onde é retirado, é posteriormente cultivado num meio específico propício ao

desenvolvimento do blastocisto. Como resultado, tanto o blastómero como o embrião apresentaram taxas de desenvolvimento semelhante (Chung et al., 2008).

Sob o ponto de vista da segurança pública, este tipo de células, apesar do enorme potencial terapêutico, apresentam ainda uma série de riscos. Devido à sua habilidade para formar qualquer tipo de tecido e da elevada capacidade de proliferação, quando transplantadas em humanos, estas células podem formar teratomas, que são tumores contendo vários tipos tecidos, provenientes das três camadas germinativas.

Um outro problema levantado diz respeito à compatibilidade entre o paciente receptor das células e o doador. Como exemplo, supondo que um paciente necessita de um transplante para regenerar ou substituir um determinado tecido, as células estaminais embrionárias que vão ser transplantadas necessitam de ser obrigatoriamente compatíveis com o receptor, caso contrário haverá rejeição. Hipoteticamente, a melhor forma de contornar esta limitação seria a utilização de células estaminais embrionárias do próprio indivíduo, ou em último grau, de um parente próximo compatível. Uma alternativa seria a criação de um banco de células estaminais, semelhante ao que acontece com os bancos de medula óssea, mas isso seria um modelo muito difícil de realizar devido à complexidade das próprias células e da variabilidade genética de cada indivíduo (Pereira, 2008).

Assim, como podem ser ultrapassadas estas limitações? Essencialmente, de acordo com a literatura, poderiam ser usadas duas técnicas. Primeiro, seria pertinente criar embriões contendo células estaminais do próprio indivíduo. Esta técnica já existe e é designada por clonagem terapêutica. É semelhante à clonagem tradicional e consiste na transferência nuclear, ou seja, o núcleo de uma célula do indivíduo a tratar é transferida para o oócito, *in vitro* (Ratajczak et al., 2014). Apesar de resolver o problema da histocompatibilidade, esta técnica ainda é eticamente reprimida, pois continua a ter por base a destruição de embriões.

Assim, houve necessidade de encontrar uma fonte alternativa de células estaminais pluripotentes e surgiu o conceito de indução de pluripotência. O método consiste em utilizar células somáticas, teoricamente de qualquer tecido adulto, tornando-as indiferenciadas e adquirindo de novo a pluripotência. Estas células seriam posteriormente estimuladas *in vitro* a diferenciarem-se em células do tecido a tratar, sendo passíveis de transplante. Desta forma, estariam ultrapassados os problemas de ética e também de histocompatibilidade, já que o dador seria o próprio receptor (Ratajczak et al., 2014).

Devido ao seu grande potencial terapêutico, este tipo de células tem sido alvo de intensos estudos. Todavia, é preciso ainda muita pesquisa antes de poderem ser utilizadas na

terapêutica, sendo necessário ultrapassar algumas barreiras, como a formação de teratomas que lhe está associada (Batista et al., 2014).

### **3. CÉLULAS ESTAMINAIS INDUZIDAS**

Em 2006, foi descrita a capacidade de reverter uma célula ao estado de pluripotência (Takahashi & Yamanaka, 2006). Pela primeira vez, foi possível a obtenção células estaminais a partir de fibroblastos isolados de rato. A indução da pluripotência aconteceu devido à introdução nos fibroblastos de quatro genes indutores de pluripotência, designados por Oct4, Sox2, Klf4 e c-Myc, utilizando um retrovírus, que funcionou como vector viral. As células criadas foram designadas de células estaminais pluripotentes induzidas e apresentavam morfologia e capacidade de proliferação celular semelhantes às células estaminais embrionárias, contendo os mesmos marcadores genéticos (Takahashi & Yamanaka, 2006). A sua selecção foi feita através do marcador Fbx15, uma proteína que é expressa em células embrionárias indiferenciadas. Após serem transplantadas em ratos, as células pluripotentes originaram teratomas que continham tecido das três diferentes camadas germinativas, o que provou que as células eram efectivamente pluripotentes. Assim, ficou demonstrado que qualquer célula já diferenciada pode ser transformada numa célula completamente diferente, se lhe for aplicado um estímulo correcto ou forem introduzidos factores de transcrição específicos (Selvaraj et al., 2010).

As células estaminais pluripotentes induzidas foram injectadas em blastocistos, tendo contribuído para o desenvolvimento de embriões de rato, apesar de não se terem conseguido formar organismos adultos (Takahashi & Yamanaka, 2006). Apesar dos dados obtidos serem de elevada importância, foi claro que era necessário ultrapassar determinados problemas até se conseguir efectivamente utilizar a tecnologia para terapêutica humana. Obstáculos como o tempo demorado do processo, a quantidade de células obtidas e a tendência para a formação de tumores tinham de ser contornados.

Estes estudos tiveram um impacto enorme na comunidade científica, que iniciou uma pesquisa a nível mundial tendo por base os princípios introduzidos em 2006.

A mesma equipa constituída por Okita e colaboradores (2007) realizou um estudo semelhante induzindo a reactivação dos mesmos quatro factores genéticos, mas a selecção das células obtidas foi através da proteína Nanog, um factor de transcrição expresso nas células embrionárias. As células pluripotentes obtidas apresentavam uma maior semelhança com as células embrionárias, possuindo expressão genética e padrões de metilação de DNA

mais próximos, apesar de não serem completamente iguais, quando comparadas com as células pluripotentes seleccionadas com o factor Fbx15 (Okita et al., 2007). Todavia, observou-se que apesar das células pluripotentes obtidas serem de maior qualidade, o processo de obtenção era menos eficiente e eficaz, ou seja, a quantidade de células obtidas era menor e o processo era mais lento (Okita et al., 2007).

O passo seguinte foi tentar criar organismos adultos, utilizando as células estaminais pluripotentes induzidas seleccionadas com Nanog. Após a sua introdução em blastocistos de rato, e posterior implante no útero das fêmeas, foi possível a obtenção de sete quimeras adultos (organismos compostos por genomas diferentes), ao contrário do que tinha sido obtido por Yamanaka em 2006. As células implantadas contribuíram assim para a formação do organismo adulto. Quando os quimeras machos foram cruzados com fêmeas, foi possível a obtenção de uma nova geração de ratos, cujo genoma possuía os quatro factores introduzidos pelo retrovírus. No entanto, cerca de 20% desenvolveu tumores, possivelmente devido à reactivação do gene c-Myc, que possui propriedades oncogénicas (Okita et al., 2007), enquanto os outros três factores não foram reactivados.

Ainda em 2007, o mesmo grupo realizou outro estudo, numa tentativa de substituir o factor c-Myc para reduzir o potencial de formação de tumores. Através de um comunicado, Yamanaka reportou que efectivamente conseguiu produzir células pluripotentes sem o factor c-Myc, levando ao nascimento de quimeras cuja descendência deixou de formar tumores. Apesar do sucesso, o processo mostrou-se ainda mais lento e menos eficiente (Swaminathan, 2007). Mais tarde, Yamanaka substituiu o factor c-Myc por um da mesma família, o l-Myc. Com esta substituição, foi possível aumentar significativamente a eficiência do processo. Os ratos criados conseguiam reproduzir-se, mas a formação tumoral não era estimulada (Yamanaka et al., 2010).

Como era de esperar, os conhecimentos adquiridos foram extrapolados para o campo humano, e em 2007 foram manipuladas células somáticas humanas. Dois grupos desenvolveram esta pesquisa simultaneamente e as conclusões obtidas foram semelhantes. Por um lado, Yamanaka, utilizando os quatro factores originais (Oct3/4, Sox2, Klf4 e c-Myc), reverteu fibroblastos humanos ao estado de pluripotência, obtendo células semelhantes às células embrionárias humanas. Estas apresentavam capacidade de se diferenciarem *in vitro* em qualquer uma das três camadas germinativas (Yamanaka et al., 2007).

Por outro lado, Yu alterou um pouco o método e usou os factores Oct3/4 e Sox2 combinados com o factor Nanog e o Lin28, mostrando a sua suficiência para reprogramar as células humanas. Estas também conseguiam formar qualquer um dos tecidos das três camadas

germinativas (Yu et al., 2007). Destes estudos é pertinente concluir que, como os factores usados para induzir a pluripotência eram semelhantes tanto nos roedores como nos humanos, a maquinaria de transcrição essencial que regula a pluripotência é conservada entre espécies (Han & Yoon, 2011). Este facto é importante na medida em que, quando se aperfeiçoarem os métodos de obtenção de células estaminais e de diferenciação das mesmas nos tecidos alvos, será mais fácil aplicar os princípios para diferentes espécies, englobando muito mais áreas do que a terapêutica humana.

Nesta altura, estava claro que haviam certas limitações a ser ultrapassadas, como a velocidade de produção das células estaminais pluripotentes induzidas, que tinha de ser aumentada; a integração genética e todas as suas consequências, bem como o uso de vectores virais, que para além dos quatro factores de Yamanaka, podem integrar na célula alvo o seu genoma potencialmente nocivo e causar mutações; e ainda o potencial para a formação de tumores. Idealmente, seria necessário que a reprogramação celular passasse pela expressão temporária dos genes de interesse, ou seja, seria de evitar a integração genética que ocorre com a utilização de retrovírus e lentivírus, através da utilização de vectores virais não integrantes, ou ainda a utilização de métodos não virais (Zhou & Freed, 2009).

Existem pesquisas realizadas relativamente aos métodos virais não integrantes, mas os seus resultados não são completamente conclusivos. Stadfeld e os seus colaboradores utilizaram adenovírus em vez de retrovírus para induzir a pluripotência de fibroblastos e células hepáticas. Os genes utilizados foram os quatro factores de Yamanaka, e eram expressos temporariamente. As células obtidas por este método apresentavam padrões de metilação de DNA semelhantes ao das células pluripotentes obtidas através de retrovírus, e conseguiram formar diversos tipos de tecidos e teratomas. Foi possível criar ratos quimeras adultos.

Um outro estudo, realizado por Okita e colaboradores (2008) apresentou resultados contrários, já que não conseguiram transformar hepatócitos em células pluripotentes a partir de adenovírus. No entanto, utilizando a transfecção complementar de Oct3/4, Klf4 e Sox2 a partir de retrovírus, foi possível esta transformação. Aparentemente, alguns tipos de células parecem estar mais receptivos para o adenovírus que contém os genes de interesse, do que outros. Assim, é necessário realizar mais estudos para explorar o potencial do uso de adenovírus como vector viral (Han & Yoon, 2011).

Outras alternativas foram estudadas alternativas, de forma a tentar evitar a utilização de vírus, tanto integrantes como não integrantes. A utilização de plasmídeos como transportadores do material genético para célula foi uma ideia pertinente. Através da inserção de dois plasmídeos de expressão em fibroblastos, um contendo o DNA complementar

(cDNA) dos genes Oct3/4, Sox2 e Klf4, e o outro contendo o cDNA do gene c-Myc, foi possível criar células pluripotentes competentes. As células criadas não apresentavam evidência de integração dos plasmídeos (Okita et al., 2008).

Uma outra hipótese passava por descobrir que moléculas eram formadas pela expressão dos quatro factores de Yamanaka durante a indução de pluripotência. Essas moléculas poderiam ser introduzidos na célula somática, estimulando a sua desdiferenciação temporária, e quando necessário seriam removidas do meio, evitando por exemplo, a formação de tumores nos organismos descendentes (Han & Yoon, 2011). Um estudo realizado em 2009 induziu pela primeira vez a pluripotência em fibroblastos embrionários de rato, utilizando proteínas recombinantes, sintetizadas a partir de culturas de *E. coli*. As células pluripotentes produzidas eram indistinguíveis em relação às tradicionais células embrionárias e expressavam vários marcadores endógenos de pluripotência, como o Oct4, Sox2 e Nanog. Quando se tentou proceder à sua diferenciação novamente *in vitro*, num meio apropriado, elas formaram com sucesso corpos embrionários e desenvolveram células das três camadas germinativas. Este novo método é claramente importante, pois elimina os riscos inerentes à manipulação genética que ocorre com a integração de DNA estranho no genoma de uma célula (Zhou et al., 2009).

Apesar da importância desta experiência, limitações como a eficiência e eficácia do processo continuavam presentes. Na verdade, este método mostrou-se até mais lento, comparado com o uso de vectores virais. Assim, foi proposto um novo modelo, o primeiro baseado em mecanismos celulares, através de 2 compostos: SB431412 (inibidor do TGF $\beta$  - factor de transformação de crescimento beta, uma proteína que interfere na proliferação e diferenciação celular), e PD0325901 (inibidor da MEK - família de quinases activadas por mitogénio). Os dois compostos são inibidores das duas vias assinaladas, que interferem com um processo designado por transição epitelial mesenquimal, onde as células do epitélio se transformam em células mesenquimais multipotentes. Em relação ao modelo original, este método apresentou eficiência aumentada em cerca de 100 vezes. Com a introdução de um novo composto, *thiazovivin*, em combinação com os dois anteriores, foi possível aumentar a eficiência do processo em cerca de 200 vezes (Lin et al., 2009). Em termos de segurança, este método mostrou-se promissor, pois é baseado em mecanismos naturais das células, afastando-se por completo dos inconvenientes da manipulação genética.

Em 2009, um outro método foi proposto, baseado em microRNA, pequenas sequências de nucleótidos complementares ao RNA mensageiro (mRNA), que modulam a sua actividade. A introdução microRNAs diferentes, pertencentes a famílias de microRNA que são expressas

preferencialmente em células estaminais embrionárias, em combinação com a expressão dos factores Oc4, Sox2 e Klf4 através de retrovírus, aumentou a eficiência da reprogramação de fibroblastos de rato (Judson et al., 2009). Mais tarde, seguindo os princípios deste método, um outro grupo conseguiu obter bons resultados na indução de pluripotência de fibroblastos humanos e de ratos através de microRNAs, na ausência dos factores de Yamanaka descritos anteriormente. Como resultado, as células obtidas tinham características semelhantes às tradicionais células pluripotentes induzidas, nomeadamente na expressão de marcadores de pluripotência, formação de teratomas e mesmo contribuição para a criação de quimeras, no caso dos ratos (Anokye-Danso et al., 2011).

A utilização de mRNA sintético como substituinte da integração genética também foi estudada e apresentou resultados positivos. Em 2010, foram reprogramadas vários tipos de células somáticas humanas por este método, com uma eficiência consideravelmente maior em relação aos métodos anteriores. A tradução do mRNA nas proteínas de interesse, sem integração, permite estimular temporariamente as vias da pluripotência, sem os riscos associados aos métodos virais (Warren, et al., 2010).

Os estudos aqui apresentados são apenas alguns exemplos dos que existe actualmente no contexto da produção de células estaminais. É uma ciência em constante evolução, procurando sempre aumentar a eficácia e eficiência dos métodos, tentando ultrapassar as limitações inerentes à indução da pluripotência.

#### **4. APLICAÇÃO NA TERAPÊUTICA**

Dada a capacidade que as células estaminais possuem para se diferenciarem num enorme variedade de células funcionais adultas, têm virtualmente o potencial de curar qualquer doença ou patologia que resulte ou provenha de destruição de tecidos celulares.

Há várias condições em que atualmente só é possível amenizar os sintomas mas não curar a doença, tal como patologias neuro-degenerativas, diabetes mellitus, vários tipos de artrite, entre outros, onde o uso células estaminais representa uma hipótese de cura. Noutros casos, como a paralisia causada por danos na espinal medula, onde não existe actualmente uma solução viável, a medicina regenerativa uma nova esperança.

No contexto da terapêutica, esta ciência já se encontra em decurso em animais, no entanto a sua aplicação terapêutica a humanos é ainda muito restrita, apesar de vários estudos clínicos já estarem a ser aprovados e efectuados utilizando células estaminais e células

estaminais induzidas. A seguir vão ser referidas algumas situações, mas é de realçar que existem muito mais áreas e doenças onde estão a ser feitos estudos.

#### **4.1. DOENÇAS NEURO-DEGENERATIVAS E LESÕES NEURONAIS**

As doenças neuro-degenerativas abrangem uma enorme variedade de patologias, que são caracterizadas pela perda de células neuronais ao nível do cérebro e da espinal medula. Gradualmente, estas células vão sendo destruídas, o que se traduz numa perda de função cognitiva, motora ou fisiológica (Lindvall et al., 2012). Fazem parte do ramo da neurobiologia e são talvez as mais complexas de estudar do organismo humano. Factores como a acessibilidade limitada do tecido nervoso ou mesmo a incapacidade dos neurónios diferenciados se regenerarem contribuem para esta complexidade. Exemplos de doenças que possuem um grande potencial para beneficiar com esta ciência são a doença de Parkinson, doença de Alzheimer, o acidente vascular cerebral ou mesmo as lesões na espinal medula.

A doença de Parkinson é caracterizada pela perda de neurónios dopaminérgicos na substância nigra. Várias abordagens têm sido utilizadas com algum sucesso para combater os sintomas, como a administração de L-DOPA, precursor da dopamina, mas não se mostram eficazes para travar a doença. O seu mecanismo patológico está bem definido, o que a torna passível de tratamento por transplante recorrendo a células estaminais induzidas (Vaccarino et al., 2011). Este conceito já foi aplicado em modelos de roedores com doença de Parkinson, demonstrando correcção da patologia a nível comportamental e anatómico.

Este conceito já foi testado, utilizando células estaminais pluripotentes induzidas obtidas de doentes Parkinson, posteriormente diferenciadas em neurónios dopaminérgicos e implantadas em modelos animais de roedores. Estes implantes demonstraram um funcionamento regular e sem evidências de serem afectados por processos de neurodegenerescência, mesmo vários meses após o transplante. Os ratos demonstraram melhorias comportamentais que evoluíam com o tempo e, após cerca das 20 semanas, demonstravam uma recuperação total na maioria dos casos (Hargusa et al., 2010).

Os tratamentos para as lesões causadas por acidente vascular cerebral seguem as mesmas linhas de investigação das lesões encontradas nos casos de doença de Parkinson, onde as células são transplantadas para as zonas afectadas, demonstrando uma melhoria progressiva ao nível funcional e comportamental. Os mecanismos celulares que levam a esta melhoria ainda não se encontram bem elucidados, no entanto, várias hipóteses devem ser tidas em consideração, tal como a activação dos mecanismos de reparação endógenos e factores

neurotróficos. Estas melhorias são também tidas como de longa duração, isto é, cerca de um ano (Lindvall & Kokaia, 2011).

A doença de Alzheimer caracteriza-se pela presença de aglomerados neurofibrilares e depósitos de proteína  $\beta$ -amiloide em placas em várias regiões do cérebro, levando a diferenças na manifestação dos sintomas, mantendo, no entanto, alguns pontos em comum, como a perda de memória, demência e declínio das capacidades cognitivas (Hampel, 2013). Concepcionalmente, a aplicação das células estaminais na doença de Alzheimer é mais complicada que no caso da doença de Parkinson, pois é necessário que estas se diferenciem em diferentes tipos celulares diferentes e que migrem para as várias zonas afectadas no cérebro.

Apesar de precoces, alguns estudos em animais demonstraram que quer as células estaminais embrionárias quer as provenientes de tecido adulto, quando introduzidas no cérebro de ratos, eram incorporadas no parênquima do cérebro doente. As células precursoras de neurónios demonstraram possuir capacidade de migrar para as zonas danificadas, diferenciando-se em neurónios e astrócitos, resultando numa diminuição do défice na aprendizagem e memória. Para além disto, demonstraram ainda estimular os neurónios endógenos, activando os sistemas de reparação de neurónios do próprio tecido afectado (Abdel-Salam, 2011). Apesar dos feitos alcançados, esta aplicação necessita de uma maior compreensão e avanço (Lindvall & Kokaia, 2010).

A esclerose lateral amiotrófica define-se pela degeneração dos neurónios motores do córtex cerebral, tronco cerebral e espinal medula, o que vai inicialmente condicionar os movimentos do doente, que acaba rapidamente por perder todas as suas funções motoras, ficando totalmente dependente de terceiros. As capacidades cognitivas do doente ficam inalteradas. Através do uso de células estaminais de vários tecidos, como células estaminais neuronais, ou as células pluripotentes induzidas, já se conseguiram criar neurónios motores *in vitro*. Estes conseguiram estabelecer sinapses funcionais com fibras musculares. Após transplante em modelos animais de roedores, os neurónios conseguiram ligar-se correctamente ao tecido nervoso e aos músculos, contribuindo para uma melhoria parcial da paralisia (Lindvall & Kokaia, 2010). Apesar dos ensaios que se têm feito, ainda é prematuro para tirar conclusões a longo prazo sobre este tipo de terapia (Ratajczak et al., 2014).

As lesões da espinal medula acontecem por um trauma, normalmente forte, e o seu mecanismo patológico é complexo. Envolve interrupção dos estímulos nervosos das vias ascendentes e descendentes, degeneração de neurónios, inflamação e desmielinização. O paciente perde capacidade de movimentos e sensações, dependendo da zona onde acontece

o trauma, e em último caso pode ficar paraplégico, ou tetraplégico. Actualmente, esta doença não tem cura. Um estudo, utilizando células estaminais neurais humanas implantadas na espinal medula de ratos, mostrou que havia regeneração dos neurónios e oligodendrócitos, com melhorias na locomoção. Um outro estudo demonstrava que as células neurais implantadas se diferenciavam em neurónios maduros, que estabeleciam ligação com os neurónios do rato. Um resultado semelhante foi obtido com modelos caninos (Lindvall & Kokaia, 2010). Todavia, pensa-se que as melhorias obtidas se devem também à secreção de factores neurotróficos que vão estimular o crescimento dos neurónios. Em 2009 foi aprovado o primeiro ensaio clínico com células estaminais embrionárias humanas, para tratamento desta patologia. No entanto foi cancelado em 2011, devido ao aparecimento de tumores em modelos de roedores (Ratajczak et al., 2014).

Assim, os resultados obtidos demonstram que esta tecnologia, apesar de muito promissora, ainda precisa de ser avaliada e aperfeiçoada antes de poder ser usada na terapêutica.

#### **4.2. DIABETES MELLITUS TIPO I**

O Diabetes Mellitus tipo I é uma doença metabólica, auto-imune, caracterizada pela destruição das células  $\beta$  do pâncreas. Desta forma, o pâncreas deixa de produzir insulina, uma hormona hipoglicemiante, que interfere no metabolismo da glicose. Esta doença actualmente não tem cura, sendo que o tratamento consiste na injeção de insulina. Mesmo que hipoteticamente se introduzissem células estaminais no pâncreas que levassem à regeneração dos ilhéus de Langerhans, estima-se que o sistema imunitário iria continuar a atacar estas células. Desta forma, foi proposto um novo modelo terapêutico, designado por *Stem Cell Educator Design*. Este modelo utiliza células estaminais derivadas do cordão umbilical, multipotentes. Estas células demonstraram modular a actividade imunológica *in vitro*. A terapia baseia-se em duas etapas, em que inicialmente os linfócitos são separados do sangue do doente e, posteriormente, passam pela câmara de cultura onde estão fixadas as células multipotentes. Após a adaptação, os linfócitos são reintroduzidos no paciente (Zhao et al., 2012).

Um ensaio clínico liderado por Zhao em 2010 demonstrou a segurança do método e a sua exequibilidade. Houve melhoria do controlo metabólico, que durou meses após um único tratamento. Durante este tempo, verificou-se também redução da resposta auto-imune, fornecendo evidências de que o pâncreas pode regenerar quando a auto-imunidade é controlada (Zhao et al., 2012).

Relativamente à produção de células  $\beta$  humanas, já se alcançou este feito em laboratório, através da utilização de células adultas somáticas de uma mulher com diabetes tipo I. Estas células foram fundidas com oócitos, através da técnica de transferência nuclear, originando células pluripotentes, que após proliferação e diferenciação, conseguiam produzir insulina, quando estimuladas por um meio contendo glicose. Após transplante em ratos, estas células possuíam igual actividade às do pâncreas dos próprios ratos (Yamada et al., 2014).

### 4.3. DOENÇAS CORONÁRIAS

No que se refere ao sistema cardíaco, existem alguns alvos terapêuticos importantes como regeneração do músculo cardíaco destruído no caso dos enfartes agudos do miocárdio. Supondo que é possível criar cardiomiócitos viáveis a partir de células do próprio indivíduo e, posteriormente, transplantá-los, essas células poderiam restituir a função cardíaca. É um conceito interessante, que já foi testado em modelos animais, no entanto a sua aplicação em humanos é limitada devido à imaturidade da técnica, tanto para cardiomiócitos derivados de células embrionárias humanas como para os derivados de células pluripotentes induzidas (Oh et al., 2012).

Recentemente, utilizando um modelo primata não humano, foi possível regenerar o tecido muscular danificado pelo infarto agudo do miocárdio (Murry, 2014). Foram usadas células estaminais embrionárias humanas para a produção dos cardiomiócitos. Verificou-se um aumento de tecido muscular no coração danificado e uma melhoria da função cardíaca, demonstrando uma resposta electromecânica sincronizada com as células do hospedeiro, apesar de pequenas arritmias não fatais. Assim, especula-se sobre a aplicação de uma técnica semelhante em humanos no futuro (Murry, 2014).

Um outro potencial alvo é a criação de *pacemakers* biológicos que substituíssem os usados actualmente, ultrapassando as suas limitações tais como a necessidade de intervenção cirúrgica ou risco de inflamação por se tratar de um corpo estranho. Esta aproximação já foi testada em modelos suínos, e apresentou resultados satisfatórios, no entanto os cardiomiócitos usadas eram derivados de células embrionárias humanas em vez células pluripotentes induzidas, só permitindo a sua aplicação hipotética em humanos usando imunossuppressores, devido ao risco de rejeição (Oh et al., 2012).

#### **4.4. PATOLOGIAS HEMATOLÓGICAS**

Uma outra área de aplicação das células estaminais diz respeito às patologias que afectam o sangue, por exemplo anemia falciforme e a anemia de Fanconi, onde já existem estudos em roedores que apontam para a sua correcção (Oh et al., 2012).

A anemia falciforme é um tipo de doença hereditária, em que os eritrócitos adquirem a forma de foice, perdendo a sua flexibilidade e, por isso, têm tendência para obstruir os vasos sanguíneos de menor calibre causando vários problemas, como dor aguda súbita ou morte dos tecidos. Esta patologia é causada por uma mutação no gene da hemoglobina, originando hemoglobina S em vez de hemoglobina A (Rees et al.). Num estudo, foram obtidas células pluripotentes induzidas através de glóbulos vermelhos falciformes, e o gene responsável pela patologia foi corrigido. Posteriormente, foram diferenciadas em células hematopoiéticas e transplantadas em murganhos afectados. Como resultado, os murganhos apresentavam uma melhoria nos níveis de hemoglobina, na morfologia dos eritrócitos e nos índices clínicos (Hanna et al., 2007).

Um conceito semelhante foi aplicado à anemia de Fanconi. Este tipo de anemia resulta de uma mutação genética que condiciona a reparação do DNA. Como tal, é comum o aparecimento de cancros e também a falha da hematopoiese pela medula óssea. Num estudo realizado, células somáticas adultas foram colhidas de pacientes com esta patologia e nessas, foi induzida pluripotência e corrigido o gene em causa. Diferenciando as últimas em células da linha hematopoiética, obtiveram-se células mieloides e eritrócitos normais, ou seja, sem a doença (Raya, 2009).

### **5. APLICAÇÃO NO DESENVOLVIMENTO DE FÁRMACOS**

As células estaminais são uma plataforma tão versátil que podem ser usadas não só na terapia, como visto anteriormente, mas também podem ajudar a perceber a natureza das doenças e fornecer novas ferramentas que permitam um estudo mais eficaz e acessível de candidatos a potenciais fármacos.

#### **5.1. MODELOS PARA ESTUDAR DOENÇAS**

No contexto da terapêutica, esta tecnologia tem um enorme potencial. Por exemplo, é possível melhorar o conhecimento de mecanismos de patogénese de uma forma menos invasiva para um doente, simulando *in vitro* o que acontece *in vivo*. Isto é possível porque as

células estaminais podem-se diferenciar, sendo uma fonte ilimitada de qualquer tecido do nosso corpo. Elas expressam também os marcadores típicos desses tecidos, pelo que permitem uma avaliação de todo o fenótipo celular, e não só de alvos específicos como é o actual paradigma. Retêm ainda as variações genéticas causadas pelo desenvolvimento da doença, sendo essa característica importante no estudo de doenças genéticas. Apesar das suas limitações, este é um método que tem vindo a permitir o avanço da terapia personalizada.

Assim, as células estaminais pluripotentes induzidas representam uma alternativa mais económica e mais fiável em comparação aos modelos animais de doenças e, ainda, potencialmente mais versáteis na natureza e quantidade de estudos a que podem ser submetidas. No entanto, há ainda um longo caminho a percorrer até que correspondam a todas as expectativas, pois atualmente há dificuldade em estabilizar o fenótipo que se pretende estudar, a diferenciação celular ainda não está bem conhecida e controlada, assim como também é desconhecida a extensão das modificações celulares que a indução de pluripotência pode causar (Soldner & Jaenisch, 2012).

Num dos primeiros ensaios em que essa simulação foi eficaz, foi estudada a atrofia muscular-espinal, uma doença neurológica hereditária, no qual foram criadas células pluripotentes partir de fibroblastos cutâneos e depois foi promovida a sua diferenciação em neurónios motores. Foi verificado que estas células mantiveram o genótipo da doença e demonstravam defeitos específicos, quando comparadas com as células da mãe do paciente, que era saudável. Foi ainda testada a sua resposta a compostos conhecidos por aumentarem a expressão da proteína de sobrevivência do neurónio motor, que se encontra diminuída nesta doença. Assim, este estudo demonstrou a potencialidade do método como recurso para o estudo de doenças, do seu mecanismo, novos alvos e até para o ensaio de novos compostos (Ebert et al., 2009).

## **5.2. SCREENING DE ATIVIDADE E TOXICIDADE EM NOVAS MOLÉCULAS**

Considerando a potencialidade das células estaminais pluripotentes induzidas para modelar doenças humanas ou mesmo em animais, vários estudos foram já efectuados em que procederam ao “screening” de moléculas activas contra inúmeras doenças. Este tipo de estudos, no entanto, ainda se encontram na sua maioria em fases preliminares de estabelecimento e aperfeiçoamento do método, tendo já apresentado resultados promissores.

Um destes casos é o estudo efectuado por Hoing e colaboradores (2012), no qual utilizaram neurónios motores derivados de células estaminais. O objectivo era realizar um

*screening* de mais de 10000 compostos para avaliar a sua possível função neuro-protectora, quando submetidos a *stress* induzido pela microglia.

Esta abordagem permitiu não só a identificação de 12 potenciais candidatos, bem como um certo grau de elucidação relativamente aos mecanismos de acção destes, que levavam à inibição da toxicidade da microglia. Vários mecanismos de acção foram estudados e vários alvos identificados (Hoing et al., 2012).

Nos ensaios de *screening* é também possível investigar a potencial toxicidade dos compostos em estudo, toxicidade esta que pode ser estudada em relação a tecidos de uma natureza específica, que muitas vezes só seria possível determinar já nos ensaios clínicos, resultando na recusa do potencial fármaco depois de um grande investimento. Exemplos disto são os vários trabalhos referentes à utilização das células estaminais no estudo da toxicidade cardíaca, pois uma das principais razões pela qual os fármacos cardíacos falhavam os ensaios de fase 2 e 3 era por causarem arritmias. Utilizando cardiomiócitos derivados de células estaminais pluripotentes induzidas, e medindo as propriedades condutoras, o ritmo, a repolarização e outros factores, conseguiram perceber se os compostos em estudo estavam de algum modo a interferir com o seu correcto funcionamento, sendo o modelo mais capaz de reproduzir *in vitro* os efeitos cardiotóxicos dos compostos (Mordwinkin & Burridge, 2013).

Assim, estes estudos demonstram a enorme versatilidade e potencial uso das células estaminais no desenvolvimento de fármacos, que juntamente com muitos outros exemplos nos últimos anos, demonstram que este será potencialmente o melhor modelo para seleccionar compostos passíveis de aprovação em futuros ensaios clínicos.

## **6. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS**

A aplicação das células estaminais na terapêutica e no desenvolvimento de fármacos ainda tem um longo caminho a percorrer até ser efectivamente utilizada como prática recorrente para benefício humano. A presente abordagem restringe-se a uma pequena amostra dos estudos que já foram realizados nesta área e certamente dos que virão a ser.

No meu ponto de vista, o potencial da aplicação desta ciência é enorme no contexto da medicina regenerativa. A possibilidade de regenerar ou substituir qualquer tipo de tecido do organismo confere-lhe uma inegável versatilidade.

Novos estudos científicos aumentam diariamente o nosso conhecimento nesta área, com o objectivo de compreender todos os mecanismos inerentes de forma a encontrarem-se

soluções para as limitações com que somos confrontados actualmente. As técnicas usadas necessitam de ser melhoradas e a previsão do comportamento celular aquando da diferenciação, e após introdução no organismo, necessita de ser compreendida na íntegra, sendo que só assim vai ser possível aplicar as células estaminais embrionárias, somáticas e induzidas na terapêutica.

O uso destas células também se mostra interessante na área do desenvolvimento de fármacos, através da criação de linhas celulares mais próximas do ser humano, o que permite uma maior fiabilidade e especificidade em relação aos modelos animais tradicionais. Os tecidos obtidos seriam produzidos segundo a necessidade, eliminando assim limitações em termos quantitativos.

O estudo de modelos de doença *in vitro*, através da reprodução de células afectadas por determinada patologia a partir de células estaminais mostra-se importante, devido à inacessibilidade de alguns tecidos, como é o caso do sistema nervoso central.

O futuro da pesquisa e aplicação de células estaminais mostra-se promissor. Actualmente já se encontram em realização alguns ensaios clínicos de fase I em humanos, para o uso de células estaminais embrionárias na distrofia macular e lesão na espinal medula, e dependendo dos seus resultados de segurança, o número de ensaios clínicos que vão acontecer nos próximos anos pode aumentar consideravelmente, promovendo a evolução da pesquisa (Brunt et al., 2012).

Do meu ponto de vista, acredito que o futuro da medicina regenerativa e personalizada passe obrigatoriamente pelo uso das células estaminais, com especial foco nas células estaminais induzidas. O potencial para no futuro se poderem construir órgãos *in vitro*, passíveis de transplante em caso de doença ou usados para fins de pesquisa, e mesmo a regeneração de membros *in vivo*, apesar de atrativo, será provavelmente uma das mais difíceis metas a alcançar, devido à sua complexidade celular e estrutural. Contudo, acredito ser um dos passos da evolução da ciência.

## REFERÊNCIAS

- Abdel-Salam, O.M., 2011. Stem Cell Therapy for Alzheimers Disease. *CNS & Neurological Disorders - Drug Targets*. 10, 459-485.
- Anokye-Danso, F., Trivedi, C.M., Jühr, D., Gupta, M., Cui, Z., Tian, Y., Zhang, Y., Yang, W., Gruber, P.J., Epstein, J.A., Morrisey, E.E., 2011. Highly efficient miRNA-mediated reprogramming of mouse and human somatic cells to pluripotency. *Cell Stem Cell*. 8, 376–388.
- Batista, C. E., Mariano, E.D., Marie, S.K., Teixeira, M.J., Morgalla, M., Tatagiba, M., Li, J., Lepski, G, 2014. Stem cells in neurology - current perspectives. *Arq Neuro-Psiquiatr*. 72, 457-465.
- Biography of Alexander A. Maximow, 2007. Obtido de The University of Chicago Library.
- Bose, B. (2012). Past, Present and Future of Stem Cells in Regenerative Medicine. Its Associated Risks and Promise to Mankind. *Asia Pacific Biotech News*. 16, 24-27.
- Brunt, K.R., Weisel, R.D., Li, R.K, 2012. Stem cells and regenerative medicine — future perspectives. *Can J Physiol Pharmacol*. 90, 327-335.
- Chung, Y., Klimanskaya, I., Becker, S., Li, T., Maserati, M., Lu, S.J., Zdravkovic, T., Ilic, D., Genbacev, O., Fisher, S., Krtolica, A., Lanzaemail, R., 2008. Human Embryonic Stem Cell Lines Generated without Embryo Destruction. *Cell Stem Cell*. 2, 113-117.
- Ebert, A.D., Yu, J., Jr, F.F., Mattis, V.B., Lorson, C.L., Thomson, J.A., Svendsen, C.N., 2009. Induced pluripotent stem cells from a spinal muscular atrophy patient. *Nature*. 457, 277-281.
- Hampel, H., 2013. Amyloid- $\beta$  and cognition in aging and Alzheimer's disease: molecular and neurophysiological mechanisms. *Journal of Alzheimer's Disease*. 33, S79-S86.
- Han, J.W., Yoon, Y.S., 2011. Induced Pluripotent Stem Cells: Emerging Techniques for Nuclear Reprogramming. *Antioxid Redox Signal*. 15, 1799-1820.
- Hanna, J., Wernig, M., Markoulaki, S., Sun, C.-W., Meissner, A., Cassady, J. P., Beard, C., Brambrink, T., Wu, L.C., Townes, T.M., Jaenisch, R., 2007. Treatment of Sick Cell Anemia Mouse Model with iPS Cells Generated from Autologous Skin. *Science*. 21, 1920-1923.
- Hargusa, G., Coopera, O., Deleidia, M., Levya, A., Leea, K., Marlowa, E., Marlowa, E., Yowa, A., Soldnerb, F., Hockemeyerb, D., Halletta, P.J., Osborna, T., Jaenischb, R., Isacsona, O., 2010. Differentiated Parkinson patient-derived induced pluripotent stem cells grow in the adult rodent brain and reduce motor asymmetry in Parkinsonian rats. *Proc Natl Acad Sci USA*. 107, 15921–15926.
- Hoing, S., Rudhard, Y., Reinhardt, P., Glatza, M., Stehling, M., Wu, G., Peiker, C., Bocker, A., Parga, J.A., Bunk, E., Schwamborn, J.C., Slack, M., Sternecker, J., Scholer, H.R., 2012. Discovery of Inhibitors of Microglial Neurotoxicity Acting Through Multiple Mechanisms Using a Stem-Cell-Based Phenotypic Assay. *Cell Stem Cell*. 11, 620–632.
- Judson, R.L., Babiarz, J., Venere, M., Billech, R., 2009. Embryonic stem cell specific microRNAs promote induced. *Nat Biotechnol*. 27, 459-461.
- Lin, T., Ambasadhan, R., Yuan, X., Li, W., Hilcove, S., Abujarour, R., . . . Ding, a. S. (2009). A Chemical Platform for Improved Induction of Human iPS Cells. *Nat Methods*. 6, 805–808.
- Lindvall, O., Kokaia, Z., 2010. Stem cells in human neurodegenerative disorders — time for clinical translation?. *The Journal of Clinical Investigation*. 120, 29-40.
- Lindvall, O., Kokaia, Z., 2011. Stem Cell Research in Stroke: How Far From the Clinic?. *Stroke*. 42, 2369-2375.
- Lindvall, O., Barker, R.A., Brüstle, O., Isacson, O., Svendsen, C.N., 2012. Clinical Translation of Stem Cells in Neurodegenerative Disorders. *Cell Stem Cell*. 10, 151-155.
- Mitalipov, S., Wolf, D., 2009. Totipotency, Pluripotency and Nuclear Reprogramming. *Adv Biochem Eng Biotechnol*. 114, 185–199.
- Mordwinkin, N.M., Burrridge, P.W., 2013. A Review of Human Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes for High-Throughput Drug Discovery, Cardiotoxicity Screening, and Publication Standards. *Res J of Cardiovasc Trans*. 6, 22–30.
- Murry, C.E., 2014. Human embryonic-stem-cell-derived cardiomyocytes regenerate non-human primate hearts. *Nature*. 510, 273–277.
- Oh, Y., Wei, H., Ma, D., Sun, X., Liew, R., 2012. Clinical applications of patient-specific induced pluripotent stem cells in cardiovascular medicine. *Heart*. 98, 443-449.

- Okita, K., Ichisaka, T., Yamanaka, S., 2007. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature*. 448, 313-317.
- Okita, K., Nakagawa, M., Hyenjong, H., Ichisaka, T., Yamanaka, S., 2008. Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors. *Science*. 322, 949-952.
- Pereira, L.V., 2008. A importância do uso das células tronco para a saúde pública. *Ciência & Saúde Coletiva*. 13, 7-14.
- Prindull, G., Prindull, B., Meule, N., 1978. Haematopoietic stem cells (CFUc) in human cord blood. *Acta Paediatr Scand*. 67, 413-416.
- Ratajczak, M.Z., Jadczyk, T., Pedziwiatr, D., Wojakowski, W., 2014. New advances in stem cell research: practical implications for regenerative medicine. *Pol Arch Med Wewn*. ISSN: 1897-9483. Article ID: AOP\_14\_053 [Epub ahead of print]
- Raya, Á., 2009. Disease-corrected haematopoietic progenitors from Fanconi anaemia induced. *Nature*. 460, 53-59.
- Rees, D.C., Williams, T.N., Gladwin, M.T., 2010. Sickle-cell disease. *Lancet*. 376, 2018-31.
- Selvaraj, V., Plane, J.M., Williams, A.J., Dengemal, W., 2010. Switching cell fate: the remarkable rise of iPS cells and lineage reprogramming technologies. *Trends Biotechnol*. 28, 214-223.
- Simsek, G., Simsek, E., 2012. Stem Cells, Challenging Era Beyond. *Niche*. 1, 46-48.
- Soldner, F., Jaenisch, R., 2012. iPSC Disease Modeling. *Science*. 338, 1555-1556.
- Swaminathan, N., 30 de Novembro de 2007. Stem Cells - This Time without the Cancer. Obtido de Scientific American: <http://www.scientificamerican.com/article/stem-cells-without-cancer/>
- Takahashi, K., Yamanaka, S., 2006. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 126, 663-676.
- Thomson, J. A., Eldor, J.I., Shapiro, S.S., Waknitz, M.A., Swiergiel, J.J., Marshall, V.S., Jones, J.M., 1998. Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts. *Science*. 282, 1144-1147.
- Uccelli, A., Moretta, L., Pistoia, V., 2008. Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nat Rev Immunol*. 8, 726-736.
- Vaccarino, F.M., Stevens, H.E., Kocabas, A., Palejev, D., Szekeley, A., Grigorenko, E.L., Weissman, S., 2011. Induced pluripotent stem cells: a new tool to confront the challenge of neuropsychiatric disorders. *Neuropharmacology*. 60, 1355-1363.
- Warren, L., Manos, P.D., Ahfeldt, T., Loh, Y.H., Li, H., Lau, F., Ebina, W., Mandal, P., Smith, Z.D., Meissner, A., Daley, G.Q., Brack, A.S., Collins, J.J., Cowan, C., Schlaeger, T.M., Rossi, D.J., 2010. Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells with synthetic modified mRNA. *Cell Stem Cell*. 7, 618-30.
- Yamada, M., Johannesson, B., Sagi, I., Burnett, L. C., Kort, D., Prosser, R., Paull, D., Nestor, M., Freeby, M., Greenberg, E., Goland, R., Leibel, R., Solomon, S., Benvenisty, N., Sauer, M., Egli, D., 2014. Human oocytes reprogram adult somatic nuclei of a type 1 diabetic to diploid pluripotent stem cells. *Nature*. 510, 533-536.
- Yamanaka, S., Nakagawa, M., Takizawa, N., Narita, M., Ichisaka, T., 2010. Promotion of direct reprogramming by transformation-deficient Myc. *Proc Natl Acad Sci USA*. 107, 14152-14157.
- Yamanaka, S., Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., 2007. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*. 131, 861-872.
- Yu, J., Vodyanik, M. A., Smuga-Otto, K., Antosiewicz-Bourget, J., Frane, J. L., Tian, S., Nie, J., Jonsdottir, G.A., Ruotti, V., Stewart, R., Slukvin, I.I., Thomson, J.A., 2007. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science*. 318, 1917-1920.
- Zhao, Y., Jiang, Z., Zhao, T., Ye, M., Hu, C., Yin, Z., Li, H., Zhang, Y., Diao, Y., Li, Y., Chen, Y., Sun, X., Fisk, M., Skidge, R., Holterman, M., Prabhakar, B., Mazzone, T., 2012. Reversal of type 1 diabetes via islet  $\beta$  cell regeneration following immune modulation by cord blood-derived multipotent stem cells. *BMC Medicine*. 10, 3. doi:10.1186/1741-7015-10-3
- Zhou, H., Wu, S., Joo, J. Y., Zhu, S., Han, D. W., Lin, T., Trauger, S., Bien, G., Yao, S., Zhu, Y., Siuzdak, G., Scho, H.R., Duan, L., Ding, S., 2009. Generation of Induced Pluripotent Stem Cells Using Recombinant Proteins. *Cell Stem Cell*. 8, 381-384.
- Zhou, W., Freed, C.R., 2009. Adenoviral gene delivery can reprogram human fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Stem Cells*. 27, 2667-2674.