

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA**

BRUNA GRANDI DA COSTA

**UTILIZAÇÃO DE TERAPIA CELULAR EM AFECÇÕES
NEUROLÓGICAS DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL**

PORTO ALEGRE - RS

2012/1

BRUNA GRANDI DA COSTA

**UTILIZAÇÃO DE TERAPIA CELULAR EM AFECÇÕES
NEUROLÓGICAS DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Programa de Graduação da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como parte dos requisitos para obtenção do Bacharelado em Medicina Veterinária.

Orientadora: Prof^a PhD Elizabeth Obino
Cirne-Lima

Co-orientadora: Prof^a Dr^a Ana Helena da Rosa
Paz

PORTO ALEGRE - RS

2012/1

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, pelo amor que sempre me dispuseram, pela educação que me proporcionaram e pelo apoio e incentivos que me permitiram realizar um dos meus maiores sonhos.

À minha família, em especial a minha madrinha, Maria Lisete, por todo o apoio.

Ao Laurício Görger pelo suporte emocional e palavras de incentivos.

A todas minhas amigas, simplesmente pelo dom de saber ouvir. Em especial, à Sheila Dalpiccol pela ajuda na revisão do texto.

Aos meus professores pelos ensinamentos e por demonstrarem que esses conhecimentos adquiridos em sala de aula não são absolutos, instigando e incentivando seus alunos a buscarem mais respostas.

Ao professor Dr. Rui Fernando Félix Lopes, por ser responsável pelo meu ingresso na pesquisa científica e pelos sábios conselhos.

À professora PhD Elizabeth Obino Cirne-Lima por ter aceitado me orientar neste trabalho e pela ajuda na elaboração e correção do mesmo.

À professora Dr^a. Ana Helena da Rosa Paz pela ajuda na elaboração e correção deste trabalho.

À UFRGS que me proporcionou um ensino de excelência e me permitiu a convivência com algumas das pessoas mais interessantes que conheci.

Aos meus pais, Isabel e Gilmar, pelo apoio durante minha trajetória acadêmica e pelo amor e dedicação presente em toda a minha vida, e ao cão, que serviu como inspiração, foi amigo incondicional e membro da família, e que deixou saudades, Atrevido.

*“A ignorância gera mais frequentemente
confiança do que conhecimento: são os que
sabem pouco, e não aqueles que sabem muito,
que afirmam de uma forma tão categórica que
este ou aquele problema nunca será resolvido
pela ciência.”*
Charles Darwin

*“Chegará o dia em que os homens
conhecerão o íntimo dos animais, e, neste dia,
um crime contra um animal será considerado
um crime contra a humanidade.”*
Leonardo da Vinci

RESUMO

As células-tronco são células indiferenciadas com capacidade de se subdividir indefinidamente e que em decorrência de estímulos podem se diferenciar e originar células especializadas. Tais células podem ser de natureza embrionária ou adulta, podendo ser classificadas também quanto à sua capacidade de diferenciação em totipotentes, pluripotentes, oligopotentes ou unipotentes. Enquanto as células-tronco embrionárias apresentam grande potencial terapêutico e por muito tempo foram consideradas a fonte mais promissora de células para terapia de substituição celular, alguns aspectos que podem limitar suas aplicações principalmente em relação a questões éticas do uso de embriões humanos e a possibilidade de rejeição devido à incompatibilidade imunológica entre paciente e doador. Alternativamente, cientistas têm estudado o uso de células-tronco obtidas de tecidos adultos, pois na maior parte deles existem células responsáveis pela integridade, reparo e remodelação dos tecidos. Além da medula óssea as células-tronco vêm sendo isoladas em diversos tecidos no organismo adulto, tais como: sangue periférico, cérebro, medula espinhal, polpa dentária, vasos sanguíneos, músculo esquelético, epitélio da pele e do sistema digestivo, córnea, retina, fluido amniótico, fígado, pâncreas e células adiposas. Evidências de que o tecido nervoso possa se recuperar quando acometido por doenças agudas e degenerativas trouxe esperança para pacientes acometidos por doença de Parkinson, doença de Alzheimer, esclerose lateral amiotrófica, atrofia muscular espinhal, acidente vascular encefálico e inúmeras patologias traumáticas. As pesquisas mostram o papel das células-tronco na substituição do tecido lesado, bem como em promover fatores extracelulares que podem estimular o salvamento e reabastecimento celular endógeno. Neuroregeneração é um conceito complexo e relativamente novo, que inclui conhecimento de neurogênese, neuroplasticidade e neurorestauração. A regeneração no sistema nervoso central implica na produção de novos neurônios, derivados tanto da proliferação de células-tronco ou precursoras endógenas quanto da administração de células exógenas com potencial de substituir o tecido perdido. O objetivo deste trabalho é revisar conceitos sobre as células-tronco e suas diferentes fontes de obtenção, dando ênfase as populações celulares mais utilizadas na pesquisa para tratamento de doenças neurológicas. Além disso, busca-se relacionar algumas doenças neurológicas humanas, cuja terapia celular seja sugerida, com doenças observadas em animais, tais como: síndrome do distúrbio cognitivo, Parkinson canino e lesões traumáticas. Há muito ainda por ser respondido; contudo, há indícios de que a terapia celular represente a cura ou, pelo menos, a melhora sintomática, de doenças que atualmente infligem grande sofrimento às pessoas e aos animais. Contanto que, a ética da experimentação animal seja respeitada, a pesquisa clínica na neurologia comparada trará avanços não apenas a terapia celular aplicada a humanos, mas poderá representar um progresso também na Medicina Veterinária.

Palavras-chave: Célula-tronco embrionária. Célula-tronco adulta. Terapia celular. Doença neurodegenerativa. Neuroregeneração. Neurologia comparada.

ABSTRACT

Stem cells are undifferentiated cells capable of indefinite divisions and that under stimuli may differentiate and originate specialized cells. These cells may be embryonic or adults in nature, being classified also as to their capacity of differentiation in totipotent, pluripotent, oligopotent or unipotent. While embryonic cells present great therapeutic potential and for long time were considered the most promising source of cells for replacement cell therapy, some aspects may limit its application, mainly because of ethics issues in the use of human embryos and the possibility of rejection due to immunologic incompatibility between patient and donor. Alternatively, scientists have been studying the use of stem cells from adult's tissues, because cells responsible for integrity, repair and remodeling are present in most of tissues. In addition to the bone marrow, stem cells have been isolated from several tissues in the adult organism, such as: peripheral blood, brain, spinal cord, dental pulp, blood vessels, skeletal muscle, epithelium from skin and digestive system, cornea, retina, amniotic fluid, liver, pancreas and adipose cells. Evidences that nerve tissue might recover when stricken by acute and degenerative diseases brought help to patients affected by Parkinson's disease, Alzheimer's disease, amyotrophic lateral sclerosis, spinal muscular atrophy, stroke and numerous traumatic pathologies. Research shows the part of stem cells in replacing damaged tissue, as well as in promoting extracellular factors that may stimulate the rescue and endogenous cell replenishment. Neuroregeneration is a complex and relatively new concept that includes knowledge of neurogenesis, neuroplasticity and neurorestoration. Central nervous system regeneration implies in production of new neurons, derived both from proliferation of stem cells or endogenous precursor cells and from administration of exogenous cells with replacement potential. The aim of this paper is to review concepts about stem cells and its different sources, emphasizing the most utilized cell populations in research for neurological diseases treatment. Additionally, some human neurological diseases, which cell therapy may be suggested, are compared with diseases observed in animals, such as: cognitive dysfunction syndrome, canine Parkinson and brain ischemia. There is much to be answered; however, there are signs that cell therapy represents the cure, or at least symptomatic improvements, of diseases that currently inflict great suffering to both people and animals. As long as the animal experimentation ethics be respected, clinical research in comparative neurology will bring advances not just for cell therapy applied to humans, but will also represent a progress in veterinary medicine.

Key words: Embryonic stem cell. Adult stem cell. Cell therapy. Neurodegenerative disease. Neuroregeneration. Comparative neurology.

ABREVIATURAS

AVC	Acidente Vascular Cerebral
A β	β -amilose
AME	Atrofia Muscular Espinhal
CP(s)	Célula(s) Progenitora(s) ou Precursora(s)
CPE(s)	Célula(s) Progenitora(s) Endotelial(is)
CT(s)	Célula(s)-tronco
CTA(s)	Célula(s)-tronco Adultas
CTD(s)	Célula(s)-tronco da Polpa Dentária
CTE(s)	Célula(s)-tronco Embrionária(s)
CTH(s)	Célula(s)-tronco Hematopoiética(s)
CTM(s)	Célula(s)-tronco Mesenquimal(is)
CTN(s)	Célula(s)-tronco Neuronal (is)
CTP(s)	Célula(s)-tronco Pluripotente(s) Induzida(s)
DA	Doença de Alzheimer
DP	Doença de Parkinson
ELA	Esclerose Lateral Amiotrófica
GFAP	Proteína Ácida Glial Fibrilar
MCI	Massa Celular Interna
NMI	Neurônio Motor Inferior
NMPF	Neurônio Motor Pré-Frontal
NMS	Neurônio Motor Superior
SDC	Síndrome do Distúrbio Cognitivo
SMN	Proteína de Sobrevivência de Neurônios Motores
SNC	Sistema Nervoso Central
VEGF	Fator de Crescimento Endotelial Vascular

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	09
1	CÉLULAS-TRONCO	11
1.1	CÉLULAS-TRONCO EMBRIONÁRIAS	11
1.1.1	Células Pluripotentes Induzidas	14
1.2	CÉLULAS-TRONCO ADULTAS	15
1.2.1	Células-tronco da medula óssea	18
1.2.1.1	Células-tronco hematopoiéticas	19
1.2.1.2	Células progenitoras endoteliais	20
1.2.1.3	Células-tronco mesenquimais	20
1.2.2	Células-tronco em outros tecidos	22
1.2.2.1	Células-tronco adultas neuronais	23
2	TERAPIA CELULAR EM DOENÇAS NEUROLÓGICAS	27
2.1	DOENÇA DE ALZHEIMER	28
2.1.1	Síndrome do distúrbio cognitivo	29
2.2	DOENÇA DE PARKINSON	30
2.2.1	Parkinson canino	32
2.3	DOENÇA DO NEURÔNIO MOTOR	33
2.3.1	Esclerose lateral amiotrófica	34
2.3.2	Atrofia muscular espinhal	36
2.3.3	Doença do neurônio motor em veterinária	36
2.4	ACIDENTE VASCULAR CEREBRAL	37
	CONCLUSÃO	40
	REFERÊNCIAS	42

INTRODUÇÃO

O sistema nervoso central (SNC) tem a habilidade de responder a uma lesão através do aumento da produção celular e da tentativa de regeneração (RICE; SCOLDING, 2004). Apesar disso, o prognóstico de pacientes com doença neurológica grave é reservado devido ao complexo funcionamento do SNC, ainda que recebam manejos farmacológicos, cirúrgicos e fisioterápicos adequados (RICE, HALFPENNY; SCOLDING, 2003).

Segundo a teoria neuronal, descrita por Ramón y Cajal (1894), a regeneração neuronal verdadeira era considerada impossível, mesmo sabendo-se que as células gliais eram capazes de proliferação (GASPARINI *et al.*, 2004). No entanto, a partir da década de 1990, desenvolveu-se o conceito de neurologia regenerativa (FALAVIGNA, 2007). A possibilidade de reparo de doenças pelo uso de células progenitoras originou novas teorias para a doença degenerativa e ofereceu uma possibilidade de recuperação ou reparação neurológica através de uma via de suplementação, estimulação ou proteção do precursor endógeno (RICE; SCOLDING, 2004).

O cérebro infantil conta com um processo chamado plasticidade cerebral, ou seja, quando uma área é lesada há um redirecionamento da informação e o desenvolvimento de uma nova área funcional através do estímulo repetitivo. No adulto, essa plasticidade não é encontrada e a tentativa de reparo acontece através das células de sustentação não-funcionais, os astrócitos. Além disso, a presença de fatores inibitórios do crescimento axonal e da migração celular e a menor capacidade de trocas das células do SNC, quando comparadas a outros órgãos, dificultam ainda mais a regeneração a nível celular. Assim, o transplante de células-tronco para esse ambiente, com o objetivo de auxiliar a reparação e melhorar seu funcionamento, é lógica e atrativa (RICE, HALFPENNY; SCOLDING, 2003).

A possibilidade do tecido nervoso se recuperar quando acometido por doenças agudas e degenerativas trouxe esperança para pacientes acometidos por doença de Parkinson, doença de Huntington, esclerose múltipla, esclerose lateral amiotrófica, acidente vascular encefálico e diversas patologias traumáticas (FALAVIGNA, 2007). Nos últimos dois ou três anos houve um rápido aumento nos testes clínicos envolvendo terapia celular que estão estabelecendo o padrão clínico para uma área emergente da medicina. As pesquisas mostram o papel das células-tronco na substituição do tecido lesado, bem como

em promover fatores extracelulares que podem estimular o salvamento e reabastecimento celular endógeno (TROUNSON, 2011).

O objetivo deste trabalho é revisar conceitos sobre as células-tronco e suas diferentes fontes de obtenção, dando ênfase as populações celulares mais utilizadas na pesquisa para tratamento de doenças neurológicas. As doenças abordadas são as consideradas de maior destaque em artigos científicos, seja pela sua gravidade ou pelo número de pacientes acometidos.

Por fim, este texto busca relacionar as doenças humanas com as que acometem os animais de companhia, principalmente cães e gatos, pois com o avanço da Medicina Veterinária nos últimos anos pode ser possível, no futuro, a utilização dessas terapias para tratar afecções neurológicas dos animais. Além disso, a neurologia comparada vem crescendo em importância e destaque na comunidade científica, portanto, a pesquisa clínica em pequenos animais pode representar uma troca eficiente de conhecimento, contribuindo para o avanço da terapêutica das enfermidades neurológicas tanto nos seres humanos quanto nos animais (SCIENCE DAILY, 2008).

1 CÉLULAS-TRONCO

As células-tronco (CTs) são células indiferenciadas com elevada capacidade de divisão celular e que em decorrência de estímulos podem se diferenciar e originar células especializadas. Tais células podem ser de natureza embrionária ou adulta, sendo as primeiras obtidas dos estágios iniciais pós-fertilização e as adultas encontradas em virtualmente todos os tecidos (MEIRELLES, CHAGASTELLES; NARDI, 2006). São classificadas também quanto à sua capacidade de diferenciação ou potência celular (totipotentes, pluripotentes, oligopotentes ou unipotentes), a qual é definida pela capacidade de uma célula se especializar em determinados tipos celulares (FRITSCH, 2007).

As células totipotentes são células capazes de gerar um indivíduo completo com cerca de 200 tipos de células somáticas especializadas, inclusive as das linhagens germinativas (PASSOS *et al.*, 2007), células totipotentes são encontradas no oócito fertilizado e nos embriões até o estágio de mórula (FRITSCH, 2007). A primeira diferenciação celular do organismo ocorre no estágio de blastocisto quando há divisão em trofoblasto e massa celular interna (MCI) (TANAKA *et al.*, 1998), a partir disso as células pluripotentes encontradas na MCI podem formar células das três camadas germinativas (endoderme, mesoderme e ectoderme) dando origem a todos os tipos celulares do organismo exceto a placenta e os anexos embrionários (CHURCHILL, 2001). Células classificadas em oligopotentes são aquelas capazes de se diferenciar em tipos celulares aparentados e as unipotentes se diferenciam em uma única linhagem celular específica de um tecido, garantindo a reposição celular e renovação do mesmo (FRITSCH, 2007).

1.1 CÉLULAS-TRONCO EMBRIONÁRIAS

Segundo Thomson (1998) o conceito de células-tronco embrionárias (CTEs) deveria englobar a capacidade prolongada de proliferação indiferenciada e o potencial de desenvolvimento estável para formar células derivadas das três camadas germinativas mesmo após longo período de cultivo, além disso, devem ser provenientes de embriões no estágio de pré ou peri-implantação. Para fins de pesquisa os critérios precisam ser mais específicos, por isso, em 2001, Smith estabeleceu oito propriedades para classificação das CTEs (*apud* FRITSCH, 2007, p. 21):

- a) ser derivada da massa interna/epiblasto do blastocisto;
- b) ser capaz de se submeter a um número ilimitado de divisões simétricas sem se diferenciar (auto-renovação por longo prazo);
- c) exibir e manter um complemento cromossômico (cariótipo) estável, normal (diplóide) e completo;
- d) as CTEs pluripotentes devem gerar todos os tipos diferenciados de células que são derivadas das três camadas germinativas embrionárias (endoderme, mesoderme e ectoderme), mesmo após cultura prolongada;
- e) ser capaz de colonizar a linhagem germinativa e produzir óvulos ou espermatozoides;
- f) ser clonogênica, pois uma única CTE pode gerar uma colônia de células geneticamente idênticas, ou clones, que têm as mesmas propriedades da célula original;
- g) podem ser induzidas a continuar a proliferar ou a se diferenciar;
- h) expressar o fator Oct-4 da transcrição, que então ativa ou inibe um receptor de genes-alvo e mantém a CTE em um estado proliferativo indiferenciado.

As CTEs apresentam grande potencial terapêutico, porém alguns aspectos que podem limitar suas aplicações médicas devem ser avaliados. Devem ser estabelecidos os métodos de isolamento e diferenciação para obtenção de culturas puras, a segurança da reposição tecidual deve ser comprovada e a questão de incompatibilidade imunológica entre a CT do doador e o organismo receptor deve ser resolvida. Métodos de manipulação genética da histocompatibilidade e de imunossupressão do transplantado (TROUNSON, 2006) podem diminuir a ocorrência de reações imunológicas, assim como a clonagem terapêutica (LANZA, CIBELLI; WEST, 1999) que resolveria o problema de imunocompatibilidade com o uso de células doadoras autólogas, mas que se torna inviável por razões éticas e legais.

Foram feitos estudos sobre a obtenção e aplicação de CTEs do encéfalo em desenvolvimento, essas células apresentaram diferenciação *in vitro* em oligodendrócitos e neurônios dopaminérgicos funcionais e poderiam ser utilizadas no tratamento da esclerose múltipla e da doença de Parkinson (CARPENTER *et al.*, 1999). A dificuldade na utilização desse tipo de células baseia-se no fato de que estas devem ser isoladas a partir de fetos, somando-se ainda o fato da necessidade de vários fetos para obtenção de número de células suficiente para um tratamento, além da organização para realizar a cirurgia de obtenção das células no período em que elas são viáveis (RICE, HALFPENNY; SCOLDING, 2003). Além disso, a lei de biossegurança brasileira promulgada em 2005 proíbe a produção de embriões com o objetivo de obter CTs. Assim como na maioria dos países, o Brasil limita a obtenção de CTEs a embriões congelados há mais de três anos produzidos para fins de tratamento de fertilização *in vitro* e/ou embriões inviáveis para implantação no útero materno com consentimento dos progenitores em ambos os casos.

O processo de criopreservação de embriões pode comprometer o desenvolvimento do embrião pós-congelamento (ARCHER, GOOK; EDGAR, 2003) dependendo do grau de lise celular (EDGAR, BOURNE; MCBAIN, 2000), o que torna o embrião inviável para o desenvolvimento. Apesar do estabelecimento do blastocisto após extensa cultura embrionária ser um dos maiores desafios do processo, uma vez atingido esse estágio, tanto embriões de alta como de baixa qualidade têm o mesmo potencial para o estabelecimento de linhagens de CTEs (BRAGA *et al.*, 2007).

Diversos estudos têm sido conduzidos com o objetivo de desenvolver técnicas e protocolos laboratoriais para que o embrião seja preservado paralelamente ao desenvolvimento de CTEs ou para que se estabeleçam linhagens a partir de embriões não viáveis que seriam descartados (BORGES; BRAGA, 2007). Uma das possibilidades seria biopsiar um ou dois blastômeros do embrião de quatro ou oito células, ou seja, antes de atingir o estágio de blastocisto, o que não comprometeria o desenvolvimento embrionário (SERMON, VAN STEIRTEGHEM; LIEBAERS, 2004). O fato dessa técnica já ser aplicada no diagnóstico genético peri-implantacional para detecção de distúrbios de um único gene (SAIHINE; CAUGHEY, 2005), a tornaria viável como fonte potencial de CTEs, assim um blastômero seria retirado para testes genéticos e outro poderia ser cultivado, sem qualquer prejuízo para o embrião biopsiado (BORGES; BRAGA, 2007).

Outro problema sobre o uso de CTEs é que, ainda não existe controle sobre a questão de haver ou não alguma CTE na fase indiferenciada junto ao meio. Tal célula poderia *in vivo* se multiplicar e entrar em processo de diferenciação celular o que poderia gerar tumores mistos compostos por diferentes tipos celulares, denominados teratomas (CIRNE-LIMA, 2007).

Devido aos problemas citados anteriormente, CTEs ainda não são um tipo celular considerado seguro para aplicação, e a maioria dos estudos realizados até o momento consiste em pesquisa básica, no máximo ensaios pré-clínicos em modelos animais. Entretanto, recentemente o FDA (*Food and Drug Administration- USA*) permitiu a realização do primeiro ensaio clínico utilizando CTEs humanas para o tratamento de lesão da medula espinhal torácica pela empresa Geron™, iniciado em 2010 o estudo baseava-se na aplicação intralesional de progenitores de oligodendrócitos com leve imunossupressão do paciente (CLINICALTRIALS.GOV, NCT01217008, 2011). Embora tenha sido demonstrada a segurança do tratamento, sem a observação de efeitos adversos severos, o ensaio clínico foi descontinuado por questões financeiras (WALSH, 2011).

1.1.1 Células-tronco pluripotentes induzidas

Por muito tempo as CTEs foram consideradas a fonte mais promissora de células para terapia de substituição celular. Entretanto, preocupações éticas em relação ao uso de embriões humanos e a possibilidade de rejeição devido à incompatibilidade imunológica entre paciente e doador podem limitar o uso de CTEs. Visando solucionar esses problemas cientistas têm trabalhado com o desenvolvimento de CTs pluripotentes induzidas (CTPs) a partir de células somáticas adultas (JENSEN, KRABBLE; MEYER, 2011).

Até recentemente, reprogramação celular envolvia clonagem de células somáticas por transferência nuclear, onde o núcleo de um oócito era substituído pelo núcleo de uma célula somática adulta (WILMUT *et al.*, 1997), ou por fusão de uma célula somática a uma CTE (COWAN *et al.*, 2005). Entretanto, fatores como dificuldade técnica e tempo de execução, além da necessidade do uso de oócitos ou CTEs humanos, não resolvem os problemas éticos envolvidos. Então, em 2006, Takahashi & Yamanaka relataram pela primeira vez a reprogramação de fibroblastos adultos de camundongos, transformando as células em CTPs através da utilização de retrovírus com expressão de quatro fatores de transcrição altamente expressos em CTEs: Oct3/4, Sox2, c-Myc e Klf4.

As CTPs resultantes compartilham diversas propriedades com as CTEs, incluindo morfologia, características de crescimento e pluripotencialidade, definida pela habilidade de formar teratomas *in vivo* e diferenciar-se em tipos celulares distintos provenientes das três camadas germinativas (JENSEN, KRABBLE; MEYER, 2011). No entanto, as CTPs não são idênticas as CTEs nos quesitos status epigenético (DENG *et al.*, 2009) e expressão gênica (CHIN *et al.*, 2009). Além disso, as CTPs originais falharam em gerar quimeras e contribuir para a linhagem germinativa (TAKAHASHI; YAMANAKA, 2006). O refinamento do método de seleção das CTPs resolveu essas questões e as CTPs estão mais similares as CTEs em nível epigenético (OKITA, ICHISAKA; YAMANAKA, 2007). Logo após esses estudos iniciais em camundongos, CTPs foram derivadas a partir de fibroblastos humanos usando uma combinação de genes ligeiramente diferentes (TAKAHASHI *et al.*, 2007) e a partir disso, CTPs têm sido geradas a partir de vários tipos celulares e espécies (MASIP *et al.*, 2010).

As similaridades das CTPs com CTEs e o fato que essas células podem ser geradas a partir de células do próprio paciente fazem das CTPs fortes candidatas a aplicação terapêutica. Entretanto, primeiramente, é extremamente importante aperfeiçoar o processo

de reprogramação de células somáticas, pois muitos grupos têm produzido CTPs com o uso de vetores retrovirais, fato que poderia alterar o potencial de diferenciação ou, ainda, induzir a transformação maligna nas CTPs, já que retrovírus integram o DNA randomicamente (JENSEN, KRABBLE; MEYER, 2011).

Outras estratégias têm sido utilizadas para a produção de CTPs, como plasmídeos (KAJI *et al.*, 2009) e transposons (WOLTJEN *et al.*, 2009). Ademais, CTPs também foram geradas sem interação genômica, utilizando vetores adenovirais não integrativos (ZHOU; FREED, 2009), transinfecção repetida de plasmídeos (OKITA *et al.*, 2010) e adição de proteínas recombinantes (KIM *et al.*, 2009). Embora esses métodos não sejam, até o momento, tão eficientes quanto à abordagem retroviral, eles demonstraram claramente que é possível reprogramar uma célula sem o uso de vírus e integração transgênica, dando esperança para o desenvolvimento de CTPs aplicáveis clinicamente (JENSEN, KRABBLE; MEYER, 2011).

1.2 CÉLULAS-TRONCO ADULTAS

Durante muito tempo, pesquisadores tentaram compreender a habilidade de regeneração encontrada em alguns tecidos e hoje existem evidências de que existam CTs em mais tecidos do que se acreditava e com maior plasticidade. Na maior parte dos tecidos adultos existem células responsáveis pela integridade, reparo e remodelamento dos tecidos (MEIRELLES, CHAGASTELLES; NARDI, 2006; BORGES; BRAGA, 2007). A verdadeira célula totipotente, capaz de gerar um organismo completo, é um oócito fertilizado. Durante o desenvolvimento e morfogênese, as células proliferam, migram e se diferenciam, porém este processo gera células residuais quiescentes e não comprometidas que se acredita ser resultado de divisões assimétricas do embrião. Essas CTs podem ser isoladas do embrião em desenvolvimento e de tecidos adultos específicos (SANCHEZ-RAMOS, 2002).

As células-tronco adultas (CTAs), também chamadas de células-tronco somáticas (VERFAILLIE, 2002) são definidas pelas suas características de auto-renovação em longo prazo e de gerarem tipos celulares pré-diferenciados que possuem morfologia e funções especializadas (FRITSCH, 2007). Esses tipos celulares intermediários são denominados células progenitoras ou precursoras (CPs) e são consideradas comprometidas a se diferenciar em uma linhagem celular determinada, embora atualmente essa ideia pareça

não ser tão definitiva (ROBEY, 2000) devido a evidências da ocorrência de transdiferenciação.

Acredita-se que as células mais potentes de um organismo adulto mantenham-se indiferenciadas sob um controle microambiental chamado de nicho que garante a especificidade celular de acordo com o tecido em que esta célula se encontra. *In vitro* essas células recebem estímulos que não estão presentes no nicho em que se encontram *in vivo* podendo alterar seu comportamento, por isso resultados de diferenciação obtidos em condições de cultivo muitas vezes não podem ser extrapolados para modelos *in vivo* (FRITSCH, 2007).

Para uma célula ser classificada como CTA deve ser capaz de auto-renovação durante toda a vida do organismo e deve ser clonogênica. Como esses critérios são difíceis de provar *in vivo*, na prática, cientistas comprovam *in vitro* que uma população de células candidata a CTA purificada tem capacidade de colonizar o tecido. As CTAs devem ser capazes de gerar células totalmente diferenciadas com fenótipos característicos, integradas ao tecido e capazes de exercer funções especializadas. Por fenótipo, entende-se a morfologia, a capacidade de interação com a matriz extracelular, os marcadores de superfície e o comportamento da célula. (FRITSCH, 2007).

As primeiras CTAs caracterizadas foram as hematopoiéticas que, mesmo estando presentes numa proporção de uma para dez mil células da medula óssea, possuem grande capacidade de diferenciação em células sanguíneas das linhagens mieloide e linfóide (ORKIN, 2000). Além da medula óssea as CTAs vêm sendo isoladas em diversos tecidos, tais como: sangue periférico, cérebro, espinha dorsal, polpa dentária, vasos sanguíneos, músculo esquelético, epitélio da pele e do sistema digestivo, córnea, retina, fluido amniótico, fígado, pâncreas e células adiposas (MEIRELLES, CHAGASTELLES; NARDI, 2006). Contudo, apesar do isolamento das CTAs em vários tecidos, é preciso caracterizar definitivamente suas propriedades e potenciais de regeneração para que novos tratamentos possam ser desenvolvidos.

A definição de CTA afirma que elas são capazes de se diferenciar apenas em tecidos próximos aos da sua origem, porém foi sugerida a possibilidade de diferenciação em outros tecidos através da transdiferenciação (BONGSO; RICHARDS, 2004). Trabalhos realizados no final da década de 90 foram os primeiros a demonstrar indícios de flexibilidade das CTAs. O termo plasticidade, também chamado de diferenciação não ortodoxa e transdiferenciação, significa que uma CT de um tecido adulto pode gerar tipos

diferenciados de células de outro tecido até mesmo originário de uma camada germinativa distinta (RIZVI *et al.*, 2006).

Algumas teorias foram formuladas para explicar este fenômeno, e a que parece ser mais aceita pela comunidade científica é a teoria da fusão celular (RIZVI *et al.*, 2006). Nessa teoria, as células de diferentes linhagens são fusionadas e a CTA passa a apresentar os marcadores de superfície da célula do hospedeiro. No entanto, parece pouco provável que esse mecanismo seja responsável pela reparação tecidual, porque ocorre em baixa frequência. Outras teorias são: a transdiferenciação direta, em que a ativação de um conjunto de genes alteraria a especificidade celular (BJORNSON *et al.*, 1999); a dediferenciação em um estágio intermediário, ou seja, uma célula especializada se transformaria em uma célula mais primitiva multipotente ou até pluripotente (KUCIA, WU; RATAJCZAK, 2007); e a heterogeneidade da população em estudo. Há ainda que se considerar a presença de uma população não hematopoiética de CTA na medula óssea antes de interpretar evidências experimentais como plasticidade ou transdiferenciação (KUCIA *et al.*, 2005), portanto achados anteriores suportando a teoria de plasticidade podem, hoje, ser reinterpretados pelo fato de que há uma população heterogênea de CTA na medula óssea (KUCIA, WU; RATAJCZAK, 2007).

Os mecanismos pelos quais as CTs funcionam e revertem os efeitos da morte celular incluem diferenciação, fusão celular e secreção de citocinas ou efeitos parácrinos (ASANUMA, MELDRUM; MELDRUM, 2010). Enquanto muitos grupos de pesquisa continuam a refinar e expandir o papel das CTAs da medula óssea e do cordão umbilical para os usos clássicos como doenças do sangue e autoimunes, outros estão expandindo o uso das diversas populações de CTAs encontradas nesses locais, em especial das CTs mesenquimais, para terapias cuja função vá além da substituição de células da própria linhagem (TROUNSON *et al.*, 2011). Assim, as pesquisas mais atuais sobre a ação benéfica da terapia celular estão focadas na ação parácrina das CTs, onde se supõe que a secreção de citocinas seja o mecanismo responsável pelo potencial regenerativo dessas células (BURDON *et al.*, 2011).

A maior limitação da terapia celular é a baixa eficácia terapêutica de células transdiferenciadas no local da lesão. Essa limitação tem sido atribuída a estresse celular, ambiente hostil devido à inflamação e hipóxia, suprimento sanguíneo insuficiente e elaboração de citocinas inflamatórias resultando em isquemia e morte celular (DOYLE *et al.*, 2007). Portanto, os efeitos benéficos observados em terapias celulares podem ser em decorrência de fatores parácrinos que podem influenciar células adjacentes,

provavelmente, pelo modo específico no tempo e espaço em que os mediadores parácrinos são expressos, sendo capazes de aumentar a sobrevivência celular e ativar mecanismos endógenos de reparo e regeneração (GNECCHI *et al.*, 2008).

Até agora, CTAs da medula óssea e seus fatores parácrinos tem mostrado todos os atributos necessários para regeneração tecidual, a saber, *homing*¹, imunossupressão, diferenciação, angiogênese, estimulação de células endógenas e possivelmente regulação de vias metabólicas específicas, etc. O aperfeiçoamento e maximização da quantidade de fatores parácrinos secretados pelas CTs são importantes e a pesquisa desses fatores tem mostrado que terapia com CTs é muito mais complicada, mas também com potencial e variedade de aplicações terapêuticas muito maiores do que se esperava. Entretanto, as características da transdiferenciação e fusão celular não podem ser desconsideradas, porque as ações parácrinas irão, muito provavelmente, tornar esses processos mais eficientes (BURDON *et al.*, 2011).

1.2.1 Células-tronco da medula óssea

Hipoteticamente, a presença de várias populações de CTs na medula óssea é resultado de migração durante o desenvolvimento, e as CTs durante a ontogênese são atraídas pelo ambiente permissivo da medula óssea (KUCIA, WU; RATAJCZAK, 2007). Além das CTs hematopoiéticas foram encontradas na medula óssea células progenitoras endoteliais e CTs mesenquimais e suas subpopulações. Contudo, é provável que em muitos casos, populações similares de CTs primitivas da medula óssea tenham sido descritas com nomes diferentes por terem sido detectadas utilizando estratégias experimentais diferentes (KUCIA, WU; RATAJCZAK, 2007).

Apesar dos mecanismos e benefícios terapêuticos ainda não completamente elucidados, é consenso que CTAs, principalmente CTs da medula óssea, são seguras (BURDON *et al.*, 2011) por causa do baixo risco de transformações malignas (ASANUMA, MELDRUM; MELDRUM, 2010). Outro ponto positivo é o fato das CTAs serem obtidas de modelos animais adultos o que diminui as pressões éticas que limitariam o seu uso (BURDON *et al.*, 2011). Contudo, alguns fatores precisam ser melhor

¹ *Homing* é a propriedade que as CTMs possuem para migrarem até o tecido lesionado. Essa capacidade pode ser atribuída à expressão de fatores de crescimento, citocinas e receptores de matriz extracelular na superfície das CTMs (MEIRELLES *et al.*, 2009)

analisados: o transplante de CTAs pode gerar uma resposta imune local e romper a homeostase do tecido causando a liberação de mediadores inflamatórios (GRECO; RAMESHWAR, 2008) e sua habilidade terapêutica de imunossupressão pode promover indiretamente o crescimento tumoral e a proliferação metastática (ASANUMA, MELDRUM; MELDRUM, 2010).

1.2.1.1 Células-tronco hematopoiéticas

As CTs hematopoiéticas (CTHs) foram as primeiras CTAs tecido-específicas a serem isoladas a partir da medula óssea de camundongos na década de 80 (SPANGRUDE, HEIMFELD; WEISSMAN, 1988) e são utilizadas no tratamento de inúmeras doenças das células sanguíneas, como leucemias e doenças autoimunes (WEISSMAN, 2000). As CTHs, para aplicações clínicas, podem ser isoladas a partir da medula óssea, do sangue periférico e do sangue do cordão umbilical (FRITSCH *et al.*, 2007).

Com o uso de citometria de fluxo ou de microesferas magnéticas, as CTHs são isoladas com base na expressão de seus marcadores e no uso de anticorpos contra eles (PAZ; LUGO, 2007). Os anticorpos monoclonais são os reagentes de escolha devido à sua especificidade, reação cruzada mínima e reprodutibilidade, sendo o antígeno de superfície celular CD34 o marcador historicamente mais utilizado (LAROCHELLE *et al.*, 1996). No entanto, sugere-se que a expressão do CD34 varie dependendo do estado de ativação da CT, por isso complementarmente utiliza-se a expressão de enzimas intracelulares que são importantes durante o desenvolvimento, como a enzima aldeído-dehidrogenase (ALDH) que parece ser expressa em altas proporções nas células hematopoiéticas primitivas de várias espécies (CAI, WEISS; RAO, 2004).

Além de citometria de fluxo, ensaios *in vitro*, chamado de ensaios clonogênicos, são necessários para a identificação de CTHs. Esses ensaios consistem em sistemas de cultura de CTHs em meio semissólido suplementado com fatores de crescimento ou citocinas específicas que fazem com que os progenitores hematopoiéticos se diferenciem formando colônias. Dependendo da linhagem celular em que os progenitores estão inseridos, ocorrerá a formação de diferentes unidades formadoras de colônias, que podem ser classificadas de acordo com sua morfologia em: linhagem de granulócitos e macrófagos, linhagem eritroide, linhagem megacariocítica ou linhagem mista (MALERBA *et al.*, 2004). Então, os ensaios clonogênicos são importantes ferramentas para estabelecer

o número, tipos e atividade funcional das CTHs em laboratório e permitem obtenção de linhagens de CTHs com nível de pureza de 85 a 95% (PAZ; LUGO, 2007).

1.2.1.2 Células progenitoras endoteliais

As células progenitoras endoteliais (CPEs) são CTs derivadas da medula óssea, que podem também ser isoladas do sangue periférico (BARBER; IRUELA-ARISPE, 2006), do cordão umbilical e do tecido adiposo (TROUNSON *et al.*, 2011) cuja principal função está nos processos de neovascularização fisiológica e patológica, diferenciando-se em células endoteliais maduras (BARBER *et al.*, 2006), sendo, portanto, importantes na estimulação da angiogênese (TROUNSON *et al.*, 2011). Há relatos de que a medula óssea contenha células que se assemelham a hemangioblastos embrionários e que, portanto, podem ser chamadas de CTs endoteliais (CTENs). Além disso, foram encontrados indícios de que a medula óssea conteria células capazes de formar novos vasos em áreas isquêmicas (FOLKMAN, 1998). Essas células têm como marcador de superfície CD34+/CD133+/KDR+ ou VEGFR2+ (TROUNSON *et al.*, 2011).

Os fatores de mobilização destas células manifestam-se em condições de hipóxia e são substâncias como o fator de crescimento endotelial (VEGF), o fator de crescimento de fibroblastos (FGF), as citocinas, angiopoietina e outros (SIMONS, 2005). Esses fatores poderiam fazer com que as células progenitoras endoteliais migrem para o local isquêmico para promover a neovascularização, que pode ocorrer a partir de três mecanismos distintos: a angiogênese (formação de novos capilares a partir de brotos capilares já existentes) (CARMELIET *et al.*, 2000), a arteriogênese (relacionada à circulação colateral) (SCHAPER; SECHOLZ, 2003) e a vasculogênese (vasos completamente novos ou remodelação dos já existentes) (ASAHARA *et al.*, 1999). Outra possibilidade seria o efeito parácrino das CPEs, que secretariam esses fatores de estímulo, contribuindo para a formação de novos vasos e estimulando células progenitoras residentes na região lesada (REHMAN, ORSCHELL; MARCH, 2003).

1.2.1.3 Células-tronco mesenquimais

As CTs isoladas da medula óssea ou outros tecidos e caracterizadas pela capacidade de aderência são frequentemente denominadas de células-tronco mesenquimais (CTMs)

(CAPLAN, 1991). Contudo a posição da Sociedade internacional de Terapia celular é de que a nomenclatura desse tipo de CT deve ser padronizada e determina o uso da expressão células estromais mesenquimais multipotentes, do inglês *multipotent mesenchymal stromal cells* (*MSC*²) (HORWITZ *et al.*, 2005). No entanto, ainda hoje são encontrados diversos termos designando as CTMs, tais como: células-tronco mesenquimais maduras (mCTMs), precursores de tecidos não hematopoiéticos, unidades formadoras de colônias de fibroblastos, células medulares estromais, células-tronco estromais da medula óssea (BMSSCs) e/ou células precursoras estromais (SPCs), células progenitoras mesodermiais (MPCs), células progenitoras multipotentes adultas (MAPCs) células-tronco reciclantes RS-1 e RS-2 e células-tronco multipotentes da medula óssea humana (hBMSCs) (FRITSCH *et al.*, 2007). É possível que, em muitos casos, populações similares de CT da medula óssea foram isoladas utilizando diversas metodologias e, por isso, nomeadas diferentemente (KUCIA, WU; RATAJCZAK, 2007).

As CTMs são obtidas da medula óssea e também do tecido adiposo, do cordão umbilical e de embriões, sendo capazes de se diferenciar em células estromais da medula, adipócitos, osteoblastos, condrócitos, tendinócitos e miócitos (CAMPAGNOLI *et al.*, 2001). Mais recentemente, foi demonstrada a capacidade das CTMs, de se diferenciarem em células de origem endo e ectodermal como hepatócitos e neurônios, respectivamente (KANG *et al.*, 2011). Como não foram identificadas CTMs no sangue periférico, é provável que as CTMs no organismo adulto estejam localizadas em um nicho perivascular (MEIRELES, CHAGASTELLES; NARDI, 2006).

Segundo a Sociedade Internacional de Terapia Celular, as CTMs caracterizam-se pela sua aderência seletiva a superfícies plásticas, sendo purificadas com base na sua habilidade de aderir às placas de cultivo, o potencial de diferenciação em multi-linhagens *in vitro* (osteogênico, condrogênico e adipogênico) e mediante a expressão de antígenos de superfície. Embora diversos marcadores de superfície sejam citados em diferentes artigos científicos, os marcadores recomendados pela Sociedade Internacional de Terapia Celular são: expressão positiva para CD105, CD73 e CD90 e negativa para CD45, CD34, CD14 ou CD11b, CD79a ou CD19 e HLA-DR (DOMINICI *et al.*, 2006). Além das características citadas, as CTMs podem ser identificadas através do ensaio de unidades formadoras de colônias de fibroblastos, que identifica células finas em forma de veios que proliferam e formam colônias (FRITSCH *et al.*, 2007), nesse ensaio as células aderidas ao fundo da

² No presente trabalho é utilizada a tradução para a língua vernácula: Células-Tronco Mesenquimais, ou seja, CTMs.

placa após as primeiras 72 horas deverão permanecer em cultivo por mais 10 a 15 dias, até que atinjam confluência de 85% (PAZ; LUGO, 2007).

As CTs da medula óssea podem ser facilmente obtidas e as CTMs apresentam rápido crescimento *in vitro* e *in vivo*, representando uma possibilidade no tratamento de doenças neurológicas, pois apresentam marcadores neuronais e são funcionais após sua colocação em SNC de ratos. Exercendo sua ação pela troca das células danificadas ou perdidas e aumentando a plasticidade neuronal, essas células podem promover remielinização da medula espinhal e melhora funcional de áreas de isquemia cerebral (ZHAO *et al.*, 2002). CTs obtidas do cordão umbilical humano têm sido usadas em inúmeros testes de paraplegia, ataxia, esclerose múltipla, esclerose lateral amiotrófica, doença vascular cerebral, atrofia multissistêmica, doença do neurônio motor, sem que ocorra severa resposta imunológica (YANG *et al.*, 2010).

Uma das principais hipóteses por trás dos benefícios do transplante de CTs é de que CTMs migram para a área lesada e diferenciam-se em novas células cerebrais, tais como neurônios e células gliais. Outra teoria é que CTMs transplantadas exerçam seu efeito terapêutico através da estimulação parácrina da neurogênese e também pelo efeito neuroprotetor e suporte neurotrófico (BURNS, VERFAILLIE; LOW, 2009). Além disso, foi demonstrado que CTMs induzem a angiogênese e a formação sináptica, reduzindo a apoptose e toxicidade celular, e regulam o processo inflamatório (DHARMASAROJA, 2009). Acredita-se que o efeito parácrino das CTMs seja o mais provável mecanismo desencadeador dos benefícios da terapia com essas células (YALVAC *et al.*, 2009).

1.2.2 Células-tronco em outros tecidos

Apesar da difícil diferenciação entre CTAs tecido-específicas e células progenitoras, foram isoladas CTs de diversos tecidos do organismo adulto, tais como: precursoras epiteliais da pele e do sistema digestivo, musculoesqueléticas, pancreáticas, hepáticas, renais e neuronais. (FRITSCH *et al.*, 2007).

A procura por fontes de CTAs de obtenção minimamente invasiva tem sido focada, entre outras, em CTs da polpa dentária (CTDs) que são obtidas em material de descarte proveniente de procedimentos ortodônticos e cirurgia maxilo-facial em pacientes adultos (YAO, NORTON; WISE, 2004). Foram demonstradas características de CTMs em células germinativas encontradas no dente humano e a análise por citometria de fluxo demonstrou

que as CTDs apresentam marcadores de superfície compatíveis com CTMs, tais como: CD29, CD73, CD90, CD105 e CD166 (YALVAC *et al.*, 2009).

Yalvaç *et al.* (2009) desenvolveram um trabalho que sugere que as CTDs possam ser usadas como neuroprotetor para CTMs e como um modelo para o entendimento de dois processos: a gênese de células adiposas, ósseas, dentárias e nervosas; e a inter-relação das CTMs com neurônios em muitas doenças neurodegenerativas onde a neurotoxicidade é um evento patológico determinante. Esses achados podem impulsionar o uso de uma fonte alternativa de CTs que seriam um material descartado (YALVAÇ *et al.*, 2011).

1.2.2.1 Células-tronco adultas neuronais

Por muito tempo o dogma da neurobiologia era de que o cérebro tratava-se de uma exceção à regra quanto à capacidade de regeneração, relacionando-se a neurogênese apenas aos estágios embrionários e iniciais do desenvolvimento pós-natal. Contudo, estudos desenvolvidos primeiramente em pássaros, e, no início dos anos 2000, com mamíferos, encontraram evidências de que neurônios gerados no organismo adulto podem ser funcionais. Embora não haja nenhuma garantia de que o conhecimento sobre a neurogênese do cérebro adulto renderá novas ferramentas clínicas para reparo cerebral e do cordão espinhal, as esperanças são que, no futuro, a pesquisa sobre o próprio potencial neurogênico do cérebro resulte na maneira de reconstituição de circuitos e de funções danificados e senescentes no cérebro (LINDVALL; MCKAY, 2003). Atualmente, a ideia de que o cérebro adulto de mamíferos contém CTs é um consenso, no entanto, o número de populações dessas células, seu funcionamento e o modo como se relacionam permanece incompreendido (FRITSCH *et al.*, 2007).

As principais classes de células do SNC são células nervosas – os neurônios – e células gliais, sendo estas divididas em macroglia, composta de astrócitos e oligodendrócitos, e microglia. Os neurônios e a macroglia são derivados do ectoderma embrionário, enquanto as células da microglia, que compõem de 5 a 20% das células da glia (EGLITIS; MEZEY, 1997), originam-se da mesoderme hemangioblástica e migram para o cérebro em desenvolvimento durante a embriogênese inicial (CUADROS; NAVASCUES, 1998). No entanto, a colonização microglial não está restrita aos estágios embrionários, mas corre por todo o desenvolvimento neonatal por enxertos de monócitos circulantes provenientes da medula óssea. Não se sabe se monócitos derivados do sangue

podem se infiltrar no tecido cerebral saudável durante a vida adulta e envelhecimento (MILDNER *et al.*, 2007), porém há fortes indícios que isso ocorra em pacientes que sofreram sérias lesões na barreira hematoencefálica causadas por derrame, trauma (PRILLER *et al.*, 2001) e DA (MALM *et al.*, 2008).

Acredita-se que as CTs no cérebro fetal e no adulto dividem-se, dando origem a diversas células precursoras. Os precursores neuronais são também chamados de neuroblastos e geram neurônios de muitos tipos. Os precursores da glia geram dois subtipos celulares, os astrócitos e os oligodendrócitos, tais células são responsáveis pela sustentação mecânica e metabólica dos neurônios e pela produção de mielina, respectivamente. Sob condições normais *in vivo*, os precursores neuronais não geram células gliais, e os precursores gliais não geram neurônios (FRITSCH *et al.*, 2007), porém uma CT fetal ou adulta do sistema nervoso central e do cordão medular pode gerar tanto neurônios quanto astrócitos e oligodendrócitos (TROUNSON *et al.*, 2011).

As CTs neuronais (CTNs) podem ser obtidas do cérebro fetal, neonatal e adulto (TROUNSON *et al.*, 2011). As CTNs são funcionalmente viáveis *in vivo* e podem ser obtidas em pacientes durante uma cirurgia de epilepsia ou através de cirurgia endoscópica minimamente invasiva (RICE, HALFPENNY; SCOLDING, 2003). As CTNs de origem fetal são isoladas de material abortado e são menos controversas, ética e politicamente, que CTEs. Historicamente, CTNs fetais foram consideradas mais seguras que CTEs no quesito formação tumoral após transplante (SHIMADA; SPEES, 2011).

A expressão de algumas proteínas é utilizada para a identificação das CTNs, tais como a expressão de nestina, proteína ácida glial fibrilar (GFAP), NeuN e MAP-2. Assim como, marcadores de superfície são utilizados para determinar a funcionalidade da célula diferenciada (XU Y. *et al.*, 2011). Enquanto a proteína GFAP é utilizada para identificar astrócitos, ou seja, células gliais maduras, nestina é um marcador de CTs progenitoras neurais (XU Y. *et al.*, 2011). Outras duas proteínas são utilizadas na identificação de neurônios: NeuN é uma proteína nuclear neuroespecífica, que, por detecção imunohistoquímica, foi relatada em pontos do desenvolvimento que correspondem à saída do neurônio do ciclo celular e o começo da diferenciação terminal, e MAP-2 é uma proteína associada à microtúbulos expressa num estágio de desenvolvimento posterior à expressão de NeuN, sendo utilizada como marcador de neurônios maduros (SANCHEZ-RAMOS, 2002).

A função dos neurônios diferenciados também deve ser estudada. Para isso, podem ser utilizados os marcadores de superfície ChAT (Colinaacetiltransferase) que é específico

para neurônios colinérgicos e TH (Tiosinohidroxilase) para neurônios dopaminérgicos. A presença de corpúsculos de Nissl também pode ajudar a identificar as células diferenciadas em células nervosas (XU Y. *et al.*, 2011).

Pesquisadores estão buscando outras fontes de CTAs além da medula óssea e sangue do cordão umbilical, e com isso, acelerando o uso de outros tipos de CTAs, em particular CTNs, para doenças em que os benefícios poderiam advir tanto da substituição celular quanto de fatores extracelulares. A maioria dos estudos com CTNs está em fase inicial para definição da segurança dos testes, como ocorre no Reino Unido, com a pesquisa sobre acidente vascular cerebral isquêmico, e nos Estados Unidos, com estudos sobre esclerose lateral amiotrófica e doença de Parkinson. Um estudo suíço sobre lesão crônica da medula espinhal está avançando para a fase II, ou seja, está em fase de comprovação de eficácia em humanos (TROUNSON *et al.*, 2011).

O estudo britânico utiliza CTNs fetais e baseia-se na capacidade das CTNs de expressar vários fatores tróficos e pro-angiogênicos que promovam revascularização, além de terem propriedades imunossupressivas atuando como anti-inflamatórios e ajudando no reparo tecidual, embora não seja um enxerto persistente. Nos EUA, está sendo pesquisada a injeção múltipla de CTNs fetais em áreas de substância cinza da região lombar da medula espinhal para o tratamento da esclerose lateral amiotrófica com objetivo de proteger as células neuronais saudáveis e reparar aquelas que perderam a comunicação com os músculos e conseqüentemente recuperar a capacidade ambulatoria do paciente (TROUNSON *et al.*, 2011).

Outro estudo norte-americano comprova que pacientes acometidos pela doença de Parkinson demonstraram benefícios clínicos persistentes com o tratamento utilizando CTNs autólogas. O procedimento consiste em realizar uma biópsia do cérebro do paciente e coletar o material que é cultivado *in vitro* por vários meses e expandido em CTNs diferenciadas em neurônios, astrócitos e oligodendrócitos, incluindo neurônios gabaérgicos e dopaminérgicos, essas células são, então, implantadas em múltiplos locais na região do putâmen (núcleo lentiforme) (TROUNSON *et al.*, 2011). No estudo suíço sobre lesão medular crônica, são injetadas CTNs adultas provenientes de doadores na medula espinhal e estas, migram para a área lesada para formar neurônios e oligodendrócitos que são importantes para a remielinização dos axônios danificados para recuperar a função nervosa (STEM CELL INC™, 2011; TROUNSON *et al.*, 2011).

2 TERAPIA CELULAR EM DOENÇAS NEUROLÓGICAS

Neurorregeneração é um conceito complexo e relativamente novo, que inclui conhecimento de neurogênese, neuroplasticidade e neurorrestauração. Três eventos principais, que devem ser inter-relacionados, marcam a neurorregeneração: proteção endógena por fatores de crescimento, neurogênese e neurorrestauração (ENCIU *et al.*, 2011). A regeneração no SNC implica na produção de novos neurônios, derivados tanto pela proliferação de CTs ou CPs endógenas quanto pela administração de CTs ou CPs exógenas com potencial de substituir tecido perdido. A implantação de células viáveis que irão se diferenciar, sobreviver e integrar a rede neuronal existente (JOHANSSON, 2007) torna-se uma abordagem terapêutica (ENCIU *et al.*, 2011).

Neuroplasticidade é um termo que ilustra a capacidade do cérebro em se adaptar, estrutural e funcionalmente para o aprimoramento ambiental, sendo assim possível o aprendizado e formação da memória, que são habilidades cognitivas progressivamente perdidas na doença de Alzheimer e em estágios avançados da doença de Parkinson. O cérebro possui uma capacidade latente de recuperação e em estágios iniciais de doenças neurodegenerativas alguns mecanismos compensatórios são desencadeados, como a capacidade de compensação do cérebro frente a defeitos estruturais e funcionais explorada pelas tentativas de neurorrestauração. As primeiras tentativas contemplam a ideia de aumentar os efeitos neuroprotetores dos fatores de crescimento no SNC (ENCIU *et al.*, 2011).

Devido ao aumento de evidências de que a estimulação apropriada ou a suplementação com fatores de crescimento restaura parte da atividade cognitiva perdida e melhora características comportamentais, levanta-se a hipótese de que o cérebro possua uma “reserva neurorregenerativa”, pelo menos nos estágios iniciais e médios da doença, que pode ser alvo de uma perspectiva terapêutica (ENCIU *et al.*, 2011).

A terapia celular representa uma esperança no tratamento de doenças degenerativas ou traumáticas, cujo objetivo terapêutico seja promover a neurorregeneração. Relatos datados na década de 80 já tentavam promover esse tipo de terapia, nessa época implantes de células dopaminérgicas de mesencéfalo fetal foram implantados em pacientes com doença de Parkinson (BRADFORD, 2002). Atualmente, outros modelos de restauração utilizam CTs para tratamento de Alzheimer e Parkinson. Entre as células já utilizadas

estão: CTEs (BJORKLUND *et al.*, 2002), CTNs derivadas de CTEs (WANG *et al.*, 2006), CTHs e CTMs (SADAN *et al.*, 2009).

2.1 DOENÇA DE ALZHEIMER

A doença de Alzheimer (DA) é uma deficiência cognitiva e comportamental adquirida, severa o suficiente para interferir na ocupação funcional e social dos acometidos e de seus familiares. Além de ser considerada incurável é uma doença de curso longo e progressivo. É a forma mais comum de demência, atingindo 4,5 milhões de pessoas apenas nos EUA (HOFFMAN, 2011). É uma doença de alto impacto na economia de países do ocidente, onde se estima que um terço da população com mais de 85 anos sofra deste mal (FERRI *et al.*, 2005), representando um problema de saúde pública (HOFFMAN, 2011).

A prevalência da doença aumenta com a idade, sendo mais frequente em pessoas com mais de 60 anos e diminuindo o risco a partir dos 90 anos de idade. Mais de 90% dos casos ocorre em idosos com mais de 60 anos, mas há famílias que apresentam indivíduos com sintomas a partir dos 30 anos. A associação de demência e características patológicas, como placas neuríticas, difusas e emaranhadas, é mais forte em indivíduos mais jovens (por exemplo, 75 anos) do que em pessoas que desenvolvem os sintomas mais tardiamente (por exemplo, 95 anos). Isso demonstra que a relação entre atrofia cerebral e demência permanece em idades mais avançadas, mas a relação com sinais patológicos diminui (HOFFMANN, 2011).

A DA é marcada pela perda sináptica desde os primeiros estágios (ARENDDT, 2009), essa disfunção sináptica se deve aparentemente a oligômeros solúveis de β -amilose ($A\beta$) como comprovados em estudos com cérebros humanos (WALSH; SELKOE, 2004) e em modelos animais (ROWAN *et al.*, 2003). A acumulação aguda de $A\beta$ está associada a reações inflamatórias envolvendo a microglia e os astrócitos. As células da microglia são células de origem monocítica que residem no cérebro, são as células com efeito imunológico no SNC, tendo, portanto, potencial para fagocitar $A\beta$, mas ao reagirem a estes, aumentam a produção de agentes pro-inflamatórios tóxicos. A alteração sináptica é inicialmente compensada pela “reorganização dinâmica sináptica”, enfatizada pelo aumento paradoxal de marcadores sinápticos. Todavia, o ambiente inflamatório prejudica a neuroplasticidade (ENCIU *et al.*, 2011) e a inflamação crônica caracterizada pela existência de células mediadoras da inflamação, principalmente microglia, cercando placas

de A β , é uma das marcas da patologia (KOISTINAHO *et al.*, 2010). Segundo a hipótese da cascata da amilose, proposta por Hardy & Allsop (1991), os peptídeos tóxicos de A β determinam a deficiência cognitiva dos pacientes.

A exata causa da acumulação anormal de A β no cérebro acometido por DA permanece desconhecida, mas um desequilíbrio entre a produção e a depuração de A β tem sido sugerido como patogenia da doença. Várias mutações podem aumentar a produção de A β (HARDY, 1997), porém poucos casos de DA são causados por essas mutações. Os demais casos permanecem com etiologia desconhecida, sendo identificados alguns fatores de risco como histórico de infecções recorrentes, anormalidades cerebrovasculares (NIHASHI *et al.*, 2001), derrame e trauma cerebral (VAN DEN HEUVEL, THORNTON; VINK, 2007).

Foi demonstrado que as células gliais têm capacidade de restringir a acumulação de A β . Recentemente, células monocíticas derivadas da medula foram reconhecidas em estudos experimentais como células com capacidade fagocítica superior as suas equivalentes cerebrais. Essas células são desenvolvidas a partir de CTHs, sob estímulo, essas células monocíticas são liberadas na circulação, por ação de citocinas acabam infiltrando o tecido-alvo. Na DA humana, mesmo essas células tem dificuldade de restringir o crescimento da placa de A β , por isso o aumento das propriedades fagocíticas, tanto das células endógenas do encéfalo (microglia) quanto das células derivadas da medula, oferece uma abordagem terapêutica atrativa para a DA (MALM, MAGGA; KOISTINAHO, 2012). Segundo o site *Clinicaltrials.gov*, apenas um estudo coreano está testando a aplicação de CTMs provenientes do cordão umbilical em pacientes com DA. Este ensaio clínico teve início em fevereiro de 2011 e está atualmente recrutando voluntários.

2.1.1 Síndrome do distúrbio cognitivo

A síndrome do distúrbio cognitivo (SDC), cuja fisiopatologia é incerta, é uma síndrome relacionada à idade, semelhante à doença de Alzheimer (DA) em seres humanos, que acomete cães e gatos de idade avançada. De modo semelhante à DA, o cérebro de cães e gatos com SDC apresenta alterações vasculares, espessamento de meninge e dilatação ventricular. Mais especificamente, o acúmulo progressivo de A β nos neurônios e ao redor

deles parece ser uma característica consistente em ambas as doenças e também nos animais o acúmulo de $A\beta$ é diretamente proporcional à deficiência cognitiva (DEWEY, 2006).

A SDC é diagnosticada principalmente em animais mais velhos, cães com idade superior a nove anos e gatos acima de doze anos. Os sintomas de SDC são variáveis e normalmente inespecíficos e incluem: desatenção, inatividade, perambulação a esmo e vocalização excessiva (frequentemente à noite), demência, distúrbio do ciclo sono/vigília, incontinência urinária e/ou fecal, dificuldade para subir e descer degraus e perda auditiva. Os animais frequentemente não reconhecem ambientes, pessoas ou animais anteriormente familiares e com isso interagem menos com os membros da família. Em gatos ocasionalmente nota-se padrão de comportamento agressivo e hiper-responsivo (DEWEY, 2006).

O diagnóstico de SDC, assim como de DA, baseia-se principalmente na anamnese, que indica deficiência cognitiva progressiva, excluindo outras causas potenciais de distúrbios cognitivos, como doenças metabólicas e enfermidades estruturais do cérebro. Em humanos, a obtenção de imagens, de tomografia computadorizada ou ressonância magnética cerebral é parte de um plano diagnóstico que também deve fazer parte da tentativa de diagnóstico de SDC (DEWEY, 2006).

2.2 DOENÇA DE PARKINSON

A doença de Parkinson (DP) é reconhecida como uma das desordens neurológicas mais comuns, afetando aproximadamente 1% de pessoas com mais de 60 anos de idade. A incidência e prevalência da DP aumentam com a idade, e o aparecimento dos sintomas dá-se a partir dos 60 anos. O aparecimento de sinais clínicos em pessoas com aproximadamente 40 anos é relativamente incomum. A DP é uma vez e meia mais comum em indivíduos do sexo masculino. Acredita-se que a maioria dos casos de DP seja causada por uma combinação de fatores genéticos e ambientais (BENBADIS, 2011).

A DP é causada por uma degeneração progressiva de neurônios dopaminérgicos pigmentados (contendo melanina) da *pars compacta* da substância *nigra* no tronco cerebral superior. A perda destes neurônios resulta em decréscimo gradual de entrada de dopamina no núcleo estriado levando a sinais de rigidez, tremor, hipocinesia e instabilidade postural (JENSEN, KRABBLE; MEYER, 2011).

Uma das propostas para o tratamento curativo da DP seria a reposição de neurônios dopaminérgicos por transplante intracerebral. A terapia celular para o tratamento da DP baseia-se na ideia de que neurônios imaturos transplantados possam se integrar funcionalmente ao tecido cerebral e restaurar a neurotransmissão de dopamina com efeitos duradouros nos sintomas motores. Neurônios dopaminérgicos derivados do mesencéfalo fetal enxertados no núcleo estriado emergiram como uma terapia experimental para DP (JENSEN, KRABBLE; MEYER, 2011).

Vários estudos em pacientes com DP com aplicação intraestriatal de tecido retirado do mesencéfalo ventral de fetos humanos comprovaram que terapia celular pode funcionar nesses pacientes, ou seja, que neurônios dopaminérgicos mortos podem ser substituídos por novos neurônios através de transplantes. Os enxertos podem reinervar o núcleo estriado, levando a melhora sintomática por até dezesseis anos (DUNNETT, BJÖRKLUND; LINDVALL, 2001; POLITIS *et al.*, 2011). Apesar de promissores, os resultados obtidos foram inconsistentes e foi evidenciada a ocorrência de efeitos adversos conhecidos como discinesias induzidas pelo enxerto (FREED *et al.*, 2001; OLANOW *et al.*, 2003). Contudo, mesmo que novos protocolos pudessem melhorar a segurança e eficácia de testes futuros com células de mesencéfalo fetal, é improvável que esse tipo de transplante se torne a corrente terapêutica principal para pacientes com DP devido a dificuldades na disponibilidade de tecido e padronização dos enxertos. Assim, para superar esses problemas, poder-se-ia utilizar as CTs como uma fonte ilimitada e bem caracterizada de neurônios dopaminérgicos para transplante, sendo a produção padronizada de neuroblastos dopaminérgicos a partir de CTs atual foco das pesquisas (POLITIS; LINDVALL, 2012). Hoje, sabe-se que tais neurônios podem ser gerados de CTs de diversas fontes e entre os grupos de maior potencial estão as CTEs, as CTNs, as CTMs e as CTPs (JENSEN, KRABBLE; MEYER, 2011).

Recentemente, um teste clínico utilizando transplante de CTMs autólogas na zona sublateral ventricular de pacientes com DP avançada demonstrou modesta melhora sintomática sem evidência de efeitos adversos como formação tumoral dentro de doze meses (VENKATARAMANA *et al.*, 2010). No entanto, esse ensaio clínico não utilizou exames de imagem para determinar a sobrevivência do enxerto ou mudanças funcionais do núcleo estriado (POLITIS, 2011), por isso, os mecanismos por trás da discreta melhora dos pacientes são desconhecidos. Segundo o site *clinicaltrials.gov* esse estudo realizado na Índia (NCT00976430) teve início em julho de 2009 e encontra-se em andamento. Outro estudo realizado no México (NCT01453803) e iniciado em outubro de 2011, busca

estabelecer a segurança e efetividade de CTMs autólogas derivadas do tecido adiposo em pacientes com DP.

Uma estratégia alternativa ao transplante de CTs seria estimular a diferenciação de CTNs endógenas em neurônios dopaminérgicos do núcleo estriado ou da substância *nigra*. Contudo, a quantidade de CTNs presentes na substância *nigra* pode ser insuficiente para substituir todos os neurônios perdidos progressivamente na DP. Outra possibilidade seria usar as CTs não como células de substituição, mas sim como células liberadoras de fatores neurotróficos e neuroprotetores (JENSEN, KRABBLE; MEYER, 2011). Dentre esses fatores, o fator neurotrófico derivado das células da glia (GDNF) tem demonstrado resultados promissores como agente terapêutico para DP (PARK, EGLIDIS; MOURADIAN, 2001). De acordo com Politis & Lindvall (2012) mais investigações pré-clínicas são necessárias para avaliar a capacidade de diferenciação das CTMs em neurônios dopaminérgicos e sua habilidade em reverter déficits funcionais em modelos animais.

2.2.1 Parkinson Canino

Deve-se ressaltar que inúmeras pesquisas que propiciaram informações atuais sobre a fisiopatologia dos tremores humanos foram realizadas em animais, porém é difícil classificar os tremores de cães e gatos com base na mesma classificação utilizada para tremores humanos, que podem ser classificados em fisiológicos ou patológicos. Dentre os tremores patológicos estão: tremores cerebelares, parkinsonianos, rubrais, distônicos, palatais, ortostáticos, psicogênicos e tremores decorrentes de neuropatia periférica (DEWEY, 2006).

Os tremores parkinsonianos são causados especificamente pela anormalidade na síntese do neurotransmissor dopamina, por degeneração dos neurônios dopaminérgicos presentes na substância *nigra* que se comunicam com o corpo estriado. Essa degeneração da via nigroestriatal também é notada em equinos que consomem erva daninha tóxica, *Centaurea saltitialis* e *Centaurea repans*. Esse tipo específico de tremor não era identificado em cães ou gatos (DEWEY, 2006), porém recentemente veterinários da faculdade do Missouri/EUA relataram casos da doença em cães (SCIENCE DAILY, 2008).

As pesquisas dessa universidade ressaltam semelhanças na sintomatologia da DP em humanos e caninos, os cães com a doença apresentam tremores e rigidez e têm

problemas com equilíbrio e o caminhar. A principal diferença interespecies é a idade de aparecimento dos sintomas, enquanto em humanos a doença apresenta-se em idade mais avançada, em cães, tem caráter hereditário ocorrendo em animais jovens (SCIENCE DAILY, 2008).

Mais recentemente, os pesquisadores identificaram a mutação gênica responsável pela DP em cães da raça *Terrier* Tibetano e acreditam que a mesma mutação esteja presente em humanos com uma desordem neurológica fatal relacionada ao Parkinson. Nessa raça, a doença é denominada lipofuccinose ceróide neuronal, ocorrendo acúmulo de lipofuccina nas células do SNC, onde cães de, em média, cinco anos de idade apresentam demência, deficiência visual, perda de coordenação e sinais de agressividade injustificáveis (SCIENCE DAILY, 2011).

Apesar de seres humanos também serem acometidos por lipofuccinose ceróide em quatro apresentações: infantil, infantil tardia, juvenil e adulto, com achados clínicos semelhantes aos dos *terrier* tibetanos (REDE BRASILEIRA DE NEUROLIPIDOSES, 2011), a mesma mutação gênica dos cães provoca um tipo de DP hereditária em humanos, sugerindo que a patogenia de doenças de acúmulo pode estar relacionada a doenças degenerativas como a DP. Os pesquisadores esperam que através de testes de DNA a doença seja excluída da população canina por meio de cruzamentos adequados. Acredita-se que os cães podem servir de testes para terapias potenciais em humanos visto que, os cães acometidos podem ser identificados antes mesmo do aparecimento da sintomatologia clínica (SCIENCE DAILY, 2011).

2.3 DOENÇA DO NEURÔNIO MOTOR

As doenças de neurônio motor são um grupo clínico e patologicamente heterogêneo de doenças neurológicas, caracterizadas por degeneração de neurônios motores e incluem doenças esporádicas e hereditárias. Há dois grupos de neurônios motores que podem ser afetados: os superiores (NMS) que se originam no córtex motor (giro pré-central) e possuem longos axônios formando os tratos corticoespinhal e corticobulbar, e os inferiores (NMI) que se originam no tronco cerebral (núcleo motor dos nervos cranianos) e na medula espinhal (células do corno anterior) e inervam diretamente os músculos esqueléticos. As doenças de neurônio motor são classificadas de acordo com o tipo de

neurônio que acometem, ou seja, apenas NMS ou NMI ou ambos. A sintomatologia clínica característica também depende do tipo de neurônio afetado (ADESINA, 2011).

2.3.1 Esclerose lateral amiotrófica

Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA) é a doença neurodegenerativa mais comum no sistema motor, foi descrita em 1869 pelo neurologista francês Jean-Martin Charcot, mas alcançou popularidade quando o jogador de basebol Lou Gehrig anunciou seu diagnóstico em 1939, por isso é mais conhecida como doença de Lou Gehrig do que doença de Charcot (LORENZO, 2011). É uma doença incurável e usualmente a morte ocorre três anos após o aparecimento dos sinais clínicos em decorrência de inanição, pneumonia aspirativa e falência pulmonar (CRYSTAL, 2011).

Aparentemente homens são mais acometidos que mulheres e os sintomas aparecem entre os 55 e 65 anos de idade, sendo que casos familiares tendem a ser desencadeados mais cedo (CRYSTAL, 2011). Aproximadamente 5 a 10% dos casos são familiares, caracterizando um padrão hereditário mendeliano normalmente de caráter autossômico dominante e raramente recessivo. Além da característica hereditária apenas o cigarro foi identificado como fator de risco para o desenvolvimento da doença (LORENZO, 2011).

Nos EUA há uma estimativa de que aparecem anualmente dois a três novos casos a cada cem mil habitantes, no mesmo país é considerado uma maior incidência em indivíduos brancos, numa proporção de 1,6:1, em relação a não-brancos. O país com maior incidência de ELA é a Finlândia, onde foi identificada uma mutação cromossômica responsável pela ELA familiar (LORENZO, 2011). A maioria dos casos de ELA são esporádicos e multifatoriais, mas uma mutação genética de caráter dominante no gene SOD1 é encontrada em 20% dos casos herdados. Todavia, a mutação gênica não é o fator determinante para a manifestação da doença, mecanismos ainda não esclarecidos podem causar a morte prematura dos neurônios devido à alteração de função da enzima Cu/Zn superóxido desmutase, codificada pelo gene SOD1 (ADESINA, 2011).

Doença do neurônio motor é um distúrbio exclusivamente motor sem evidências de sintomas sensoriais, alterações de movimento ou déficit cognitivo. Na ELA, somando-se aos sintomas motores, ocorre deficiência cognitiva relacionada a áreas localizadas além do córtex motor (LORENZO, 2011). Foi demonstrado que a ELA inicia-se com inclusões citoplasmáticas e perda neuronal no córtex transentorrinal, diferentemente da DA que

atinge o córtex entorrinal, portanto a perda de memória nas duas afecções pode ter mecanismos distintos (TAKEDA *et al.*, 2009).

Acredita-se que a degeneração neural que ocorre na ELA seja decorrente inicialmente do deslocamento, acumulação e ubiquitinação de uma proteína chamada TDP-43 no citoplasma de neurônios motores (CRYSTAL, 2011). A forma clássica da doença afeta dois ou mais níveis motores que inervam várias regiões do corpo: os NMI, os NMS e frequentemente os neurônios motores pré-frontais (NMPF) que orquestram as ações dos NMI e NMS. Dependendo dos neurônios atingidos a sintomatologia varia entre atrofia muscular progressiva (NMI), espasticidade, reflexos anormais (NMS), e deficiência cognitiva com mudança de comportamento representada por disfunção executiva e/ou comportamentos antissociais (NMPF) (LORENZO, 2011).

Os axônios motores morrem por degeneração walleriana³ em decorrência da morte do corpo celular e normalmente grandes neurônios são mais atingidos. No começo da doença, as fibras sobreviventes estabelecem conexões e reinervam unidades motoras cujos axônios perderam a ligação com o corpo celular e, como resultado, unidades motoras maiores são formadas. Nesse estágio essas unidades motoras formadas apresentam características histológicas distintas assim como exame eletromiográfico alterado. Com a progressão da doença, e a morte dessas unidades motoras maiores, grupos musculares começam a atrofiar (LORENZO, 2011).

Estratégias de reposição celular ou proteção celular usando transplantes de CTNs tem reacendeu o otimismo terapêutico (KOLIATSOS, XU; YAN, 2008) e o primeiro teste clínico para ELA utilizando aplicação de CTNs em segmento lombar da medula espinal foi recentemente aprovado pelo FDA (XU L. *et al.*, 2011) Diversos países possuem ensaios clínicos com CTs para o tratamento da ELA, entre eles: Espanha, China, EUA, Coréia do Sul e Israel. Estes ensaios estão todos na fase I ou II dos testes e a maioria utiliza CTMs autólogas, apenas um ensaio americano utiliza CTNs derivadas da medula espinal humana (CLINICALTRIALS.GOV, 2012).

Cientistas do Instituto de Medicina Regenerativa da Califórnia estão desenvolvendo uma linhagem de astrócitos derivados de CTEs para começar um teste clínico planejado para 2014, no qual os astrócitos serão injetados na medula espinal cervical ou lombar de

³ A degeneração walleriana é um processo de degradação de todas as estruturas do axônio distal à lesão, que perde sua continuidade com o corpo celular do neurônio. Com a quebra do axônio, as células de Schwann catabolizam a bainha de mielina e engolfam os fragmentos de axônio. Isso forma pequenos compartimentos ovóides contendo debris axonais e mielina, chamados ovóides mielínicos que são, então, fagocitados por macrófagos (LORENZO, 2011).

pacientes com ELA. Outras possibilidades sendo exploradas incluem testes com modelo animal (ratos SOD1-G93) e CPs neuronais humanas. Três testes clínicos em fase I estão em andamento para estabelecer as nuances cirúrgica de segurança, de precisão e de tolerância no tratamento de pacientes com ELA recebendo CTNs derivadas da medula espinhal de fetos humanos ou CTMs. Recentemente, foi aprovado um ensaio clínico fase I onde serão injetadas intratecalmente CTMs modificadas em pacientes com ELA (CHADDAH *et al.*, 2011).

2.3.2 Atrofia muscular espinhal

A atrofia muscular espinhal (AME) compreende um grupo de doenças autossômicas recessivas (KAO, 2011) e é clinicamente caracterizada por enfraquecimento muscular progressivo, associado à degeneração de NMI (MARKOWITZ, SINGH; DARRAS, 2012). No começo da década de 80, Werdnig & Hoffman descreveram uma doença de fraqueza muscular progressiva começando na infância e resultando em morte precoce (KAO, 2011), atualmente a AME é a causa genética mais comum de mortalidade infantil e parece estar presente em todas as populações (MARKOWITZ, SINGH; DARRAS, 2011). Vários tipos de AME foram descritos baseados na idade do aparecimento dos sinais clínicos. Os tipos mais comuns são: tipo I (AME aguda infantil ou doença de Werdnig-Hoffman), tipo II (AME crônica infantil), tipo III (AME crônica juvenil ou doença de Kugelberg-Welander) e tipo IV (AME adulta) (KAO, 2011).

A mutação genética envolve o gene SMN1 e causa diminuição nos níveis de proteína de sobrevivência de neurônios motores (SMN) (MARKOWITZ, SINGH; DARRAS, 2012). Em termos patológicos, a doença é caracterizada pela perda de células do corno medular anterior (KAO, 2011). O objetivo das pesquisas de terapias para AME é a elaboração de compostos farmacêuticos que possam regular a expressão do gene mutado ou modificar outros genes para produzir mais proteína SMN funcional. Assim, utilizar-se-ia terapia gênica para modular a expressão da proteína necessária à sobrevivência dos NMI e terapia celular para substituir os neurônios motores degenerados (MARKOWITZ, SINGH; DARRAS, 2012).

2.3.3 Doença do neurônio motor em veterinária

A AME é relatada em cães de diversas raças e representa um distúrbio hereditário autossômico. Um espectro de síndromes incomuns com quadros clínicos de gravidade variada compõe a AME que é caracterizada por degeneração prematura de neurônios motores, principalmente na medula espinhal, e, em graus variáveis, no tronco cerebral. A maior parte dessa disfunção parece ser semelhante à atrofia muscular espinhal infantil de humanos. Quando se inicia no adulto, assemelha-se a ELA, porém essa apresentação é rara em cães e gatos, em equinos a doença do neurônio motor equino é comparável com a ELA. Assim como em humanos, atualmente, não se dispõe de tratamento efetivo para esse grupo de doenças e, na maioria dos casos, o prognóstico é desfavorável (DEWEY, 2006).

2.4 ACIDENTE VASCULAR CEREBRAL

O acidente vascular cerebral (AVC) popularmente conhecido como derrame é caracterizado pela perda de sangue periférico ou pela formação de uma área isquêmica no cérebro, resultando em perda de função neurológica. Portanto, em termos gerais, os AVCs são classificados em hemorrágicos ou isquêmicos. O AVC isquêmico agudo é causado por trombose ou embolismo e é mais comum do que derrame hemorrágico (KULKARNI, 2011).

Baseado no sistema de categorização do derrame desenvolvido no multicentro *Trial of Org in Acute Stroke Treatment* (TOAST), derrames isquêmicos podem ser divididos em três grandes subtipos: infarto de grandes artérias que caracterizam derrames trombóticos causados por oclusões arterioscleróticas; infarto de vasos menores; e infarto cardioembólico causado por êmbolos de origem cardíaca que são responsáveis pelos casos de derrames recorrentes (ADAMS *et al.*, 1999).

Nos EUA, considera-se que AVC seja a maior causa de incapacitação e a terceira causa *mortis*. Estima-se que 700 mil pessoas sofram um primeiro AVC anualmente, sendo que 20% desses indivíduos morrem dentro de um ano. A incidência global de derrames é desconhecida (KULKARNI, 2011).

Alguns ensaios clínicos para pesquisa de tratamento do AVC estão em andamento. Esses estudos testam a utilização de fatores de crescimento ou de CTs para ajudar na recuperação neuronal após a isquemia (BERMAN, 2011). Clark *et al.* (2000) testou a aplicação de um fator de crescimento de fibroblastos (Fiblast™) em pacientes 24 horas após a ocorrência do AVC isquêmico, a droga foi considerada segura, contudo um estudo

posterior, com maior número de pacientes e aplicação de Fiblast™ seis horas após o AVC, foi cancelado devido à baixa proporção de risco:benefício (BERMAN, 2011). Em 2011, Honmou *et al.* publicou um estudo onde foram administradas CTMs intravenosamente em doze pacientes num período de 36 a 133 dias após o AVC. Esse estudo comprovou a viabilidade e segurança da administração de dose relativamente alta de CTMs autólogas em indivíduos que haviam sofrido derrame e estudos adicionais estão em progresso.

Para prever resultados clínicos precisamente, é necessário definir melhor o modo de ação das CTs no tratamento de cada doença e em cada tipo de tecido (SHIMADA; SPEES, 2011). Por exemplo, no tratamento do AVC, estudos diversos têm demonstrado que a terapia celular atua aumentando a sobrevivência celular e a angiogênese, melhorando a formação sináptica e diminuindo a resposta inflamatória e a cicatriz glial (LINDVALL; KOKAIA, 2004; MARTINO; PLUCHINO, 2006; BACIGALUPPI *et al.*, 2009). Enquanto todos esses mecanismos podem ocorrer simultaneamente, alguns podem ser mais importantes que outros, ou ainda, alguns podem atuar de forma direta e outros indireta (SHIMADA; SPEES, 2011).

Recentemente, um longo acompanhamento após a implantação intravenosa de CTs da medula óssea em pacientes que haviam sofrido AVC demonstrou os benefícios dessa terapia com estatísticas de sobrevivência maiores para os pacientes tratados quando comparados ao grupo controle (LEE *et al.*, 2010). Se CTs da medula são úteis na reposição de tecidos ósseos, tendíneos ou outros tecidos mesenquimais ou conjuntivos, é provável que não seja uma fonte efetiva de células para reposição neural. Curiosamente, apesar da falta de diferenciação neuronal, o transplante de CTs da medula óssea pode melhorar a função nervosa (SHIMADA; SPEES, 2011). Efeitos positivos após infusão intravenosa ou intra-arterial após AVCs foram observados em ratos, camundongos e humanos, mesmo sem níveis significativos de células enxertadas (CHEN *et al.*, 2001; BAKONDI *et al.*, 2009; LEE *et al.*, 2010). Bakondi *et al.* (2009) afirmaram que uma subpopulação de CTs, obtidas da medula óssea e que expressa o antígeno CD133, tem capacidade de tratar lesões isquêmicas de AVC com base na secreção de proteínas e peptídeos e ressaltam a importância de identificar as moléculas que fornecem proteção neuronal.

Sem dúvida, dentre as doenças citadas neste trabalho, o AVC isquêmico é o que apresenta maior número de ensaios clínicos com uso de CTs no momento. A maioria dos estudos utiliza células autólogas ou alogênicas provenientes do cordão umbilical ou medula óssea, todos os ensaios encontram-se na fase I ou II dos testes. Diversos países estão verificando a segurança e eficácia de CTs em pacientes que sofreram AVCs, tais

como: Taiwan, França, Espanha, Estados Unidos e Reino Unido. O Brasil também realizou um ensaio clínico fase I de maio de 2009 a maio de 2011, tal estudo utilizava CTs autólogas (CLINICALTRIALS.GOV)

Em animais, isquemia cerebral refere-se à diminuição do fluxo sanguíneo no cérebro suficiente para provocar sintomas de encefalopatia e independente da causa da lesão cerebral instala-se disfunção neuronal em razão da produção de radicais que contêm oxigênio livre, da produção de lactato pelo metabolismo anaeróbico e da perda do equilíbrio osmótico dos neurônios. Atualmente o tratamento da encefalopatia isquêmica, bem como do traumatismo medular e craniano tem por objetivo minimizar a autólise secundária à lesão primária, sendo necessária, em alguns casos, a descompressão cirúrgica e a estabilização de vértebras (DEWEY, 2006).

CONCLUSÃO

A humanidade continua a buscar o fim do sofrimento causado por doenças e uma melhor qualidade de vida em idade avançada. Não há dúvida de que a ciência está olhando para CTs como uma possível solução para essa importante questão (KUCIA *et al.*, 2007), pois de acordo com dados do *Center for Disease Control and Prevention*, três mil norte-americanos morrem diariamente de doenças que no futuro poderão ser tratadas com tecidos formados de CTEs (USA, 2007).

A aplicação de CTs para o tratamento de enfermidades neurológicas tem despertado grande interesse em razão dos resultados promissores obtidos com pesquisas em modelos animais de doenças. Entretanto, existe uma dissociação entre os resultados experimentais e clínicos, sendo, portanto, necessária a realização de estudos clínicos preliminares para estabelecer o potencial funcional desse tratamento, identificar os fatores técnicos associados e seus efeitos adversos (SANCHES-RAMOS, 2002).

Muitas questões estão por ser respondidas, por exemplo: a determinação do tipo de célula-tronco capaz de promover uma replicação própria *in vivo*, com baixo grau de invasibilidade e que não sofra diferenciação espontânea a fim de evitar o surgimento de tumores; a dificuldade das células alcançarem o local da lesão; as formas de evitar rejeição em transplantes não autólogos; e os possíveis efeitos no comportamento do paciente (FALAVIGNA, 2007). Além disso, é crucial a obtenção de uma fonte de CTs confiável e não controversa. CTAs da medula óssea podem ser uma alternativa terapêutica em potencial ao uso controverso de CTEs e clonagem terapêutica (KUCIA, WU; RATAJCZAK, 2007).

Para encontrar as respostas a essas questões, há necessidade da realização de testes primeiramente em animais (FALAVIGNA, 2007), com isso, ressalta-se a importância da neurologia comparada que correlaciona doenças humanas a dos animais, podendo trazer benefícios mútuos. Ressalta-se o trabalho pioneiro de universidades americanas, como a universidade do Missouri, que estão combinando ciências médicas humana e animal, pois segundo o professor O'Brien cães e pessoas sofrem da mesma doença, mas em cães de raça pura é muito mais fácil identificar problemas genéticos. A proposta das escolas de Medicina e de Veterinária é identificar mutações genéticas nos cães e, então, descobrir se as mesmas mutações causam doença similar em pessoas (SCIENCE DAILY, 2011).

Sendo o transplante de CTs uma abordagem inovadora para o tratamento de diversas doenças caracterizadas por depleção celular, a recuperação estrutural e funcional pela colocação de novas células viáveis é uma alternativa promissora as estratégias convencionais (SHIHABUDDIN; AUBERT, 2010). Devido à capacidade limitada de auto-reparação do tecido nervoso após injúrias (GAGE, 2000), a substituição de tecido cerebral necrosado e isquêmico, a regeneração de neurônios perdidos em doenças neurodegenerativas e a reabilitação de tecido lesionado no trauma de medula espinhal são apenas algumas aplicações da promissora terapêutica com CTs (YALVAÇ *et al.*, 2011).

Normalmente, as células sugeridas para terapia celular neurogênica são CTes e CTNs adquiridas do tecido cerebral de embriões ou adultos (MCKAY, 1997). No entanto, o uso dessas células em aplicações clínicas é limitado por questões legais e éticas (KANG, SHEU; LIN, 2011). CTMs e sua habilidade de diferenciação em células semelhantes a neurônios têm importante papel no tratamento de doenças neurodegenerativas como DP, doença de Huntington e ELA (SILANI *et al.*, 2004).

Atualmente estão sendo realizados testes clínicos com CTs para uma ampla variedade de condições com ênfase na utilização de células da medula óssea, hematopoiéticas (mobilizadas e recuperadas do sangue e do cordão umbilical) e mesenquimais. A segurança dessas aplicações tem sido demonstrada consistentemente, principalmente em transplante autólogos, porém efeitos curativos permanentes não foram consistentemente obtidos. Os benefícios terapêuticos estão aumentando e há claramente uma vantagem em utilizar CTs como veículos para corrigir mutações genéticas que causam severa sintomatologia (TROUNSON *et al.*, 2011).

Há muito ainda por ser respondido, no entanto, há indícios de que a terapia celular represente a cura ou, pelo menos, a melhora sintomática, de doenças que atualmente infligem grande sofrimento as pessoas e animais. Uma forte indicação de confiança no uso de terapia celular está no aumento da participação de grandes companhias farmacêuticas nesse campo de pesquisa. Por conseguinte, com o aumento do patrocínio dessas empresas e de organizações não governamentais, é provável que novos testes clínicos rapidamente se expandam nos próximos anos (TROUNSON *et al.*, 2011). Contanto que, a ética da experimentação animal seja respeitada, a pesquisa clínica na neurologia comparada trará avanços não apenas a terapia celular aplicada a humanos, mas poderá representar um progresso também na Medicina Veterinária.

REFERÊNCIAS

ADAMS H. P. Jr. *et al.* Baseline NIH Stroke Scale score strongly predicts outcome after stroke: A report of the Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment (TOAST). **Neurology**, Minneapolis, US, v. 1, n. 53, p. 126-131, 1999.

ADESINA A. M. Pathology of motor neuron disorders. In: Drugs, diseases and procedures, **Medscape Reference**, 2011. Disponível em: <<http://emedicine.medscape.com/article/1743992-overview>> Acesso em 15 jan de 2012.

ARCHER J., GOOK D. A., EDGAR D. H. Blastocyst formation and cell numbers in human frozen-thawed embryos following extended culture. **Human Reproduction**, Oxford, GB, v. 8, n. 18, p. 1669-1673, 2003.

ARENDR T. Synaptic degeneration in Alzheimer's disease. **Acta Neuropathologica**, New York, US, n. 118, p. 167-179, 2009.

ASAHARA, T. *et al.* VEGF contributes to postnatal neovascularization by mobilizing bone marrow-derived endothelial progenitor cells. **The Embo Journal**, [SI], v. 3, n18, p 964-972, 1999.

ASANUMA H, MELDRUM D. R.; MELDRUM K. K. Therapeutic applications of mesenchymal stem cells to repair kidney injury. **Journal of Urology**, Baltimore, US, v. 184, n. 1, p. 26–33, 2010.

BACIGALUPPI M. *et al.* Delayed post-ischaemic neuroprotection following systemic neural stem cell transplantation involves multiple mechanisms. **Brain: a Journal of Neurology**, Oxford, GB, n. 132, p. 2239–2251, 2009.

BAKONDI B. *et al.* CD133 identifies a human bone marrow stem/progenitor cell sub-population with a repertoire of secreted factors that protect against stroke. **Molecular Therapy**, [SI], n. 17, p. 1938–1947, 2009.

BARBER, C.L., IRUELA-ARISPE, M.L. The ever-elusive endothelial progenitor cell: identities, functions and clinical implications. **Pediatric Research**, Baltimore, US, v. 4, n.59, p. 26-31, 2006.

BENBADIS S. R. Parkinson Disease: Treatment & Management. In: Drugs, diseases and procedures, **Medscape Reference**, 2011. Disponível em: <<http://emedicine.medscape.com/article/1831191-overview>> Acesso em: 13 jan 2012.

BERMAN S. A. Neuroprotective Agents in Stroke. In: Drugs, diseases and procedures, **Medscape Reference**, 2011. Disponível em: <<http://emedicine.medscape.com/article/1161422-overview#aw2aab6b5>> Acesso em 16 jan 2012.

BJORKLUND L. M. *et al.* Embryonic stem cells develop into functional dopaminergic neurons after transplantation in a Parkinson rat model. **Proceedings of the National**

Academy of Sciences of United States of America, Washington, n. 99, p. 2344-2349, 2002.

BJORNSON C.R. *et al.* Turning brain into blood: a hematopoietic fate adopted by adult neural stem cells in vivo. **Science**, Washington, US, n. 283, p. 534-537, 1999.

BONGSO A.; RICHARDS M. History and perspective of stem cell research. **Best Practice & Research: Clinical Obstetrics & Gynaecology**, London, GB, v. 6, n. 18, p. 827-842.

BOQUEST A.C. *et al.* Isolation and transcription profiling of purified uncultured human stromal stem cells: alteration of gene expression after in vitro cell culture. **Molecular Biology of the Cell**, Bethesda, US, v. 3, n. 16, p. 131-141, 2005.

BORGES E.; BRAGA D. P. A. F. Células-tronco embrionárias: visão do especialista em medicina reprodutiva. In: PASQUALOTTO, F. F. **Células-tronco – Visão do especialista**. Caxias do Sul: EDUCS, 2007. p. 83-94.

BRADFORD H. F. The use of foetal human brain tissue as brain implants: phenotype manipulation by genetic manipulation and biochemical induction. **Keio Journal of Medicine**, Tokyo, JP, n. 51, p. 148-153, 2002.

BRASIL. Decreto-lei nº 11.105, de 24 de março de 2005. **Lex: Diário Oficial da União**, Brasília, 2005.

BURDON T. J. *et al.* Bone Marrow Stem Cell Derived Paracrine Factors for Regenerative Medicine: Current Perspectives and Therapeutic Potential. **Bone Marrow Research**, New York, n. 207326, 14 p., 2011.

BURNS T. C., VERFAILLIE C. M., LOW W. C. Stem cells for ischemic brain injury: a critical review. **Journal of Comparative Neurology**, [SI], n. 515, p. 125-144, 2009.

CAI J., WEISS M.L., RAO M.S. In search of “stemness”. **Experimental Hematology**, Amsterdam, NL, n. 32, p. 585-598, 2004.

CAMPAGNOLI C. *et al.* Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow. **Blood: the Journal of Hematology**, New York, n. 98, p. 2396-2402, 2001.

CAPLAN A. I. Mesenchymal stem cells. **Journal of Orthopaedic Research**, New York, n. 9, p. 641-650, 1991.

CARPENTER M. K. *et al.* In vitro expansion of a multipotent population of human neural progenitor cells. **Experimental Neurology**, San Diego, US, n. 158, p. 265-278, 1999.

CHADDAH M. R. *et al.* Meeting report of the International Consortium of Stem Cell Networks ' Workshop Towards Clinical Trials Using Stem Cells for Amyotrophic Lateral Sclerosis/Motor Neuron Disease. **National Institutes of Health**, Bethesda, US, n. 12, p. 315-317, 2011.

CHEN J. *et al.* Therapeutic benefit of intravenous administration of bone marrow stromal cells after cerebral ischemia in rats. **Stroke: Journal of Cerebral Circulation**, Dallas, US, n. 32, p. 1005-1011, 2001.

CHIN *et al.* Induced pluripotent stem cells and embryonic stem cells are distinguished by gene expression signatures. **Cell**, Cambridge, US, v. 1, n. 5, p. 111-123, 2009.

CIRNE-LIMA E. O. Clonagem. In: PASQUALOTTO, F. F. **Células-tronco – Visão do especialista**. Caxias do Sul: EDUCS, 2007. p. 101-104.

CLARK W. M. *et al.* Trafermin in acute ischemic stroke: results of a phase II/III randomized efficacy study. **Neurology**, Minneapolis, US, v. 54, n. 88, 2000.

CLINICAL TRIALS. Disponível em: <<http://clinicaltrials.gov/ct2/home>> Acesso em: 25 jan 2012.

COWAN C. A. *et al.* Nuclear reprogramming of somatic cells after fusion with human embryonic stem cells. **Science**, Washington, US, v. 5739, n. 309, p. 1369-1373, 2005.

CRYSTAL H. A. Demencia in motor neuron disease. In: Drugs, diseases and procedures, **Medscape Reference**, 2011. Disponível em: <<http://emedicine.medscape.com/article/1134953-overview#showall>> Acesso em 14 jan 2012.

CUADROS M. A.; NAVASCUES J. The origin and differentiation of microglial cells during development. **Progress Neurobiology**, Oxford, GB, n. 56, p. 173–189, 1998.

DENG J. R. *et al.* Targeted bisulfite sequencing reveals changes in DNA methylation associated with nuclear reprogramming. **Nature Biotechnology**, New York, v. 4, n. 27, p. 353-360, 2009.

DEWEY, C. W. **Neurologia de Cães de Gatos: Guia Prático**. São Paulo: Roca, 2006, 352 p.

DHARMASAROJA P. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells for the treatment of ischemic stroke. **Journal of Clinical Neuroscience**, [SI], n. 16, p. 12-20, 2009.

DOMINICI M. *et al.* Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, London, GB, v. 4, n. 8, p. 315-317, 2006.

DOYLE B. *et al.*, Dynamic tracking during intracoronary injection of ¹⁸F-FDG- labeled progenitor cell therapy for acute myocardial infarction, **Journal of Nuclear Medicine**, New York, v. 48, n. 10, p. 1708–1714, 2007.

DUNNETT S. B., BJÖRKLUND A.; LINDVALL O. Cell therapy in Parkinson's disease - stop or go? **Nature Reviews Neuroscience**, London, GB, n. 2, p. 365-369, 2001.

EDGAR D. H., BOURNE H. A. L., MCBAIN J. C. A quantitative analysis of the impact of cryopreservation on the implantation potential of human early cleavage stage embryos. **Humam Reproduction**, Oxford, GB, v. 1, n. 15, p. 175-179, 2000.

EGLITIS M.; MEZEY E. Hematopoietic cells differentiate into both microglia and microglia in the brains of adult mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America**, Washington, US, n. 94, p. 4080-4085, 1997.

ENCIU *et al.* Neuroregeneration in neurodegenerative Disorders. **BioMed Central Neurology**, London, GB, v. 11, n.75, 2011.

FERRI C. P. *et al.* Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. **The Lancet**, London, GB, n. 366, p. 2112-2117, 2005.

FLAVIGNA A. Células-tronco: visão do especialista em neurologia e neurocirurgia. In: PASQUALOTTO, F. F. **Células-tronco – Visão do especialista**. Caxias do Sul: EDUCS, 2007. p. 199-205.

FOLKMAN J. Therapeutic angiogenesis in ischemic limbs. **Circulation**, Dallas, US, v. 1, n. 97, p. 108-110, 1998.

FREED C. R. *et al.* Transplantation of embryonic dopamine neurons for severe Parkinson's disease. **New England Journal of Medicine**, Waltham, US, n. 344, p.710-719, 2001.

FRITSCH M. *et al.* Células-tronco: aspectos gerais. In: PASQUALOTTO, F. F. **Células-tronco – Visão do especialista**. Caxias do Sul: EDUCS, 2007. p. 19-82.

GAGE F. H. Mammalian neural stem cells. **Science**, Washington, US, n. 287, p. 1433-1438, 2000.

GASPARINI M. *et al.* Stem cells and neurology: cues for ethical reflections. **Journal of the Neurological Sciences**, Amsterdam, NL, n.25, p. 108-113, 2004.

GNECCHI M. *et al.* Paracrine mechanisms in adult stem cell signaling and therapy, **Circulation Research**, Baltimore, US, v. 103, n. 11, p. 1204–1219, 2008.

GRECO S. J.; RAMESHWAR P. Microenvironmental considerations in the application of human mesenchymal stemcells in regenerative therapies. **Journal of Biologics**, [SI], v. 2, n. 4, p. 699–705, 2008.

HARDY J.; ALLSOP D. Amyloid deposition as the central event in the aetiology of Alzheimer's disease. **Trends in Pharmacological Sciences**, Amsterdam, NL, n. 12, p. 383-388, 1991.

HARDY J. amyloid, the presenilins and Alzheimer's disease. **Trends in Neurosciences**, Amsterdam, NL, n. 20, p. 154-159, 1997.

- HOFFMANN M. Alzheimer Disease. In: Drugs, diseases and procedures, **Medscape Reference**, 2011. Disponível em: <<http://emedicine.medscape.com/article/1134817-overview>> Acesso em: 13 jan 2012.
- HONMOU O. *et al.* Intravenous administration of auto serum-expanded autologous mesenchymal stem cells in stroke. **Brain: a Journal of Neurology**, Oxford, GB, n. 134, p. 1790-1807, 2011.
- HORWITZ E. *et al.* Clarification of the nomenclature for MSC: the International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, n. 7, p. 393-395, 2005.
- JENSEN P., KRABBLE C.; MEYER M. **Cell Therapy for Parkinson's Disease: Status and Perspectives**. In: FINKELSTEIN D. I. Towards New Therapies for Parkinson's Disease. **In Tech**, Durham, US, 396 p., p. 343 – 378, 2011.
- JOHANSSON B. B. Regeneration and plasticity in the brain and spinal cord. **Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism**, Hagerstown, US, n. 27, p. 1417-1430, 2007.
- KAJI K. *et al.* Virus-free induction of pluripotency and subsequent excision of reprogramming factors. **Nature**, London, GB, v. 7239, n. 458, p. 771-775, 2009.
- KANG J. H., SHEU J. J.; LIN H. C. Increased risk of Guillain-Barré Syndrome following recent herpes zoster: a population-based study across Taiwan. **Clinical Infectious Diseases**, Oxford, GB, v. 5, n. 51, p. 525-530, 2010.
- KANG S. J. *et al.* Neuron-Like Differentiation of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells. **Yonsei Medical Journal**, Seoul, KR, v. 3, n. 52, p. 401-412, 2011.
- KAO A. Spinal muscular atrophy. In: Drugs, diseases and procedures, **Medscape Reference**, 2011. Disponível em: <<http://emedicine.medscape.com/article/1181436-overview>> Acesso em: 15 jan 2012.
- KIM D. *et al.* Generation of human induced pluripotent stem cells by direct delivery of reprogramming proteins. **Cell**, Cambridge, US, v. 6, n. 4, p. 472-476, 2009.
- KOISTINAHO J. *et al.* The role and therapeutic potential of microglial cells in Alzheimer's disease. **Glia**, New York, US, n. 58, p. 889-900, 2010.
- KOLIATSOS V. E., XU L.; YAN J. Human stem cell grafts as therapies for motor neuron disease, **Expert Opinion on Biological Therapy**, London, GB, n. 8, p. 137–141, 2008.
- KUCIA M. *et al.* Bone marrow as a home of heterogeneous populations of nonhematopoietic stem cells. **Leukemia Research**, Oxford, GB, n. 19, p. 1118–1127, 2005.
- KUCIA M., WU W.; RATAJCZAK M. Z. Bone marrow-derived very small embryonic-like stem cells: their developmental origin and biological significance. **Developmental Dynamics**, New York, US, n. 236, p. 3309-3320, 2007.

- KULKARNI R. Ischemic Stroke in Emergency Medicine. In: Drugs, diseases and procedures, **Medscape Reference**, 2011. Disponível em: <<http://emedicine.medscape.com/article/1916852-overview#showall>> Acesso em: 16 jan 2012.
- LANZA R.P., CIBELLI J.B., WEST M.D. Human therapeutic cloning. **Nature Medicine**, New York, US, n. 5, p. 975-977, 1999.
- LAROCHELLE A. *et al.* Identification of primitive human hematopoietic cells capable of repopulating NOD/SCID mouse bone marrow: implications for gene therapy. **Nature Medicine**, New York, US, n.2, p. 1329-1337, 1996.
- LEE J. S. *et al.* A long-term follow-up study of intravenous autologous mesenchymal stem cell transplantation in patients with ischemic stroke. **Stem Cells**, Dayton, Ohio, n. 28, p. 1099-1106, 2010.
- LINDVALL O.; KOKAIA Z. Recovery and rehabilitation in stroke: stem cells. **Stroke: Journal of Cerebral Circulation**, Dallas, US, n. 35, p. 2691-2694, 2004.
- LINDVALL O., MCKAY R. Brain repair by cell replacement and regeneration. **Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America**, Washington, US, v. 13, n. 100, p. 7430-7431, 2003.
- LORENZO N. Amyotrophic Lateral Sclerosis. In: Drugs, diseases and procedures, **Medscape Reference**, 2011. Disponível em: <<http://emedicine.medscape.com/article/1170097-overview>> Acesso em: 14 jan 2012.
- MALERBA I. Inhibition of CFU-EBFU-E and CFU-GM colony growth by cyclophosphamide, 5 fluorouracil and taxol: development of high throughput in vitro method. **Toxicology In Vitro**, Oxford, GB, v.3, n. 18, p. 293-300, 2004.
- MALM T. M. *et al.* Minocycline reduces engraftment and activation of bone marrow-derived cells but sustains their phagocytic activity in a mouse model of Alzheimer's disease. **Glia**, New York, n. 56, p. 1767-1779, 2008.
- MALM T., MAGGA J.; KOISTINAHO J. Animal Models of Alzheimer's Disease: Utilization of Transgenic Alzheimer's Disease Models in Studies of Amyloid Beta Clearance. **Currents Translational Geriatrics & Experimental Gerontology Reports**, Publish online, 2012. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/content/q7145736253g8571/>> Acesso em 23 dez 2011.
- MARKOWITZ J. A., SINGH P.; DARRAS B. T. Spinal Muscular Atrophy: A Clinical and Research Update. **Pediatric Neurology**, New York, US, n. 46, p. 1-12, 2012.
- MARTINO G.; PLUCHINO S. The therapeutic potential of neural stem cells. **Nature Reviews Neuroscience**, London, GB, n. 7, p. 395-406, 2006.
- MASIP M. A. *et al.* Reprogramming with defined factors: from induced pluripotency to induced transdifferentiation. **Molecular Human Reproduction**, Oxford, GB, v. 11, n. 16, p. 856-868, 2010.

MCKAY R. Stem cells in the central nervous system. **Science**, Washington, US, n. 276, p. 66-71, 1997.

MEIRELLES *et al.* Mechanisms involved in the therapeutic properties of mesenchymal stem cells: mini review. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, New York, US, n. 20, p. 419-427, 2009.

MEIRELLES L. D. S., CHAGASTELLES P. C.; NARDI N. B. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. **Journal of Cell Science**, London, GB, n. 119, p. 2204-2213, 2006.

MILDNER A. *et al.* Microglia in the adult brain arises from Ly-6ChiCCR21 monocytes only under defined host conditions. **Nature Neuroscience**, New York, US, n. 10, p. 1544-1553, 2007.

NIHASHI T. *et al.* Expression and distribution of beta amyloid precursor protein and beta amyloid peptide in reactive astrocytes after transient middle cerebral artery occlusion. **Acta Neurochirurgica**, Wien, AT, n. 143, p. 287-295, 2001.

OKITA K. *et al.* Generation of mouse-induced pluripotent stem cells with plasmid vectors. **Nature Protocols**, New York, US, v. 3, n. 5, p. 418-428, 2010.

OLANOW C W. *et al.* A double-blind controlled trial of bilateral fetal nigral transplantation in Parkinson's disease. **Annals of Neurology**, Boston, US, n. 54, p.403-414, 2003.

OLSSON M. *et al.* Extensive migration and target innervations by striatal precursors after grafting into the neonatal striatum. **Neuroscience**, Oxford, GB, n. 79, p. 57-78, 1997.

PARK K. W., EGLITIS M. A.; MOURADIAN M. M. Protection of nigral neurons by GDNF-engineered marrow cell transplantation. **Neuroscience Research**, Shannon, IR, v. 4, n. 40, p. 315-323, 2001.

PASSOS E. P. *et al.* Células-tronco adulta: visão do especialista em medicina reprodutiva. In: PASQUALOTTO, Fábio Firmbach. **Células-tronco – Visão do especialista**. Caxias do Sul: EDUCS, 2007. p. 95-99.

PAZ A. H.; LUGO A. A. Manejo laboratorial no cultivo de células-tronco. In: PASQUALOTTO, F. F. **Células-tronco – Visão do especialista**. Caxias do Sul: EDUCS, 2007. p. 105-115.

POLITIS M.; LINDVALL O. Clinical application of stem cell therapy in Parkinson's disease. **BioMed Central Medicine**, London, GB, v. 1, n. 10, 2012.

POLITIS M. *et al.* Graft-induced dyskinesias in Parkinson's disease: High striatal serotonin/dopamine transporter ratio. **Movement Disorders**, New York, n. 11, p.1997-2003, 2011.

POLITIS M: Optimizing functional imaging protocols for assessing the outcome of fetal cell transplantation in Parkinson's disease. **BioMed Central Medicine**, London, GB, n. 9, p.50, 2011.

PRILLER J. *et al.* Targeting gene-modified hematopoietic cells to the central nervous system: Use of green fluorescent protein uncovers microglial engraftment. **Nature Medicine**, New York, US, n. 7, p. 1356-1361, 2001.

RAMON Y CAJAL S. The Croonian lecture: La fine structure des centres nerveux. **Proceedings of the Royal Society London**, London, GB, n. 55, p. 444-467, 1894.

REDE BRASILEIRA DE NEUROLIPIDOSES. Lipofuscinoses Ceróides Neurônais. Disponível em: <http://www.neurolipidoses.com.br/pacientes/sobre_neurolipidoses/lipofuscinoses_ceroides_neuronais> Acesso em: 14 jan 2012.

REHMAN J., ORSCHELL C.M., MARCH K.L. Peripheral blood "endothelial progenitor cells" are derived from monocyte/macrophages and secrete angiogenic growth factors. **Circulation**, Dallas, US, v. 1, n. 107, p. 1164-1169, 2003.

RICE C.; SCOLDING N. Adult stem cells: reprogramming neurological repair? **The Lancet**, London, GB, n. 364, p. 193-199, 2004.

RICE C., HALFPENNY C., SCOLDING N. Stem cells for the treatment of neurological disease. **Transfusion Medicine**, Oxford, GB, n. 13, p. 351-361, 2003.

RIZVI A.Z. *et al.* Bone marrow-derived cells fuse with normal and transformed intestinal stem cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America**, Washington, US, v. 16, n. 103, p. 6321-6325, 2006.

ROBEY P.G. Stem cells near the century mark. **The Journal of Clinical Investigation**, New York, US, n. 105, p. 1489-1491, 2000.

ROWAN M. J. *et al.* Synaptic plasticity in animal models of early Alzheimer's disease. *Philosophical Transactions of Royal Society London B: Biological Science*, London, GB, n. 358, p. 821-828, 2003.

SADAN O. *et al.* Adult neurotrophic factor-secreting stem cells: a potential novel therapy for neurodegenerative diseases. *Israel Medical Association Journal*, [SI], n. 11, p. 201-204, 2009.

SANCHES-RAMOS P. Terapia celular en enfermedades neurodegenerativas: perspectiva desde el modelo experimental de enfermedad de Parkinson. **Neurology**, Minneapolis, US, n. 18, p. 355-356, 2002.

SCHAPER W., SECHOLZ D. Factors regulating arteriogenesis. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**, Dallas, US, n. 23, p. 1143-1151, 2003.

SCIENCE DAILY. **Tibetan Terrier dogs could play key role in developing therapy for early-onset Parkinson's**. 2011. Disponível em:

<<http://www.sciencedaily.com/releases/2011/04/110418135531.htm>> Acesso em: 14 jan 2012.

SCIENCE DAILY. **Vets Focus On Neurological Disorders In Dogs, Humans**. 2008. Disponível em: <<http://www.sciencedaily.com/releases/2008/01/080123181351.htm>> Acesso em: 14 jan 2012.

SERMON K., VAN STEIRTEGHEM A., LIEBAERS I. Perimplantation genetic diagnosis. **Lancelot**, [SI], v. 363, n. 9421, p. 1633-1641, 2004.

SHAHINE L. K., CAUGHEY A. B. Preimplantation genetic diagnosis: the earliest form of prenatal diagnosis. **Gynecologic and Obstetric Investigation**, Basel, CH, v. 1, n. 60, p. 39-46, 2005.

SHIHABUDDIN L. S.; AUBERT I. Stem cell transplantation for neurometabolic and neurodegenerative diseases. **Neuropharmacology**, New York, US, n. 58, p. 845-854, 2010.

SHIMADA I. S.; SPEES J. L. Stem and Progenitor Cells for Neurological Repair: Minor Issues, Major Hurdles, and Exciting Opportunities for Paracrine-Based Therapeutics. **Journal of Cellular Biochemistry**, New York, US, v. 2, n. 112, p. 374-380, 2011.

SILANI V. *et al.* Stem cell therapy for amyotrophic lateral sclerosis. **The Lancet**, London, GB, n. 364, p. 200-202, 2004.

SIMONS M. Angiogenesis. Where do we stand now? **Circulation**, Dallas, US, n. 111, p. 1556-1566, 2005.

SMITH A. G. Embryo-derived stem cells: of mice and men. **Review of Cell and Developmental Biology**, Palo Alto, US, n. 17, p. 435-462, 2001.

SPANGRUDE G. J., HEIMFELD S.; WEISSMAN I. L. Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells. **Science**, Washington, US, v. 241, n. 4861, p. 58-62, 1988.

STEM CELLS INC™, 2012. Disponível em: <<http://www.stemcellsinc.com/Therapeutic-Programs/Clinical-Trials.htm>> Acesso em: 25 jan 2012.

TAKAHASHI K.; YAMANAKA S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. **Cell**, Cambridge, US, v. 4, n. 126, p. 663-676, 2006.

TAKAHASHI K. *et al.* Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. **Cell**, Cambridge, US, v. 5, n. 131, p. 861-872, 2007.

TAKEDA T. *et al.* Progression of hippocampal degeneration in amyotrophic lateral sclerosis with or without memory impairment: distinction from Alzheimer disease. **Acta Neuropathology**, New York, US, v. 1, p. 117, p. 35-44, 2009.

TANAKA S. *et al.* Promotion of trophoblast stem cell proliferation by FGF4. **Science**, Washington, US, v. 282, n. 5396, p. 2072-2075, 1998.

THOMSON J. A. *et al.* Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. **Science**, Washington, US, v. 282, n. 5391, p. 1145-1147, 1998.

TROUNSON A. *et al.* Clinical trials for stem cell therapies. **BioMed Central Medicine**, London, GB, v. 9, n. 52, 2011.

TROUNSON A.O. The production and directed differentiation of human embryonic stem cells. **Endocrine Reviews**, Baltimore, US, v. 2, n. 27, p. 208-219, 2006.

USA. Center for Disease Control and Prevention, 2007. Disponível em:
<<http://www.cdc.gov>> Acesso em: 12 out 2011.

VAN DEN HEUVEL C., THORNTON E.; VINK R. Traumatic brain injury and Alzheimer's disease. A review. **Progress in Brain Research**, Amsterdam, NL, n. 161, p. 303-316, 2007.

VENKATARAMANA N. K. *et al.* Open-labeled study of unilateral autologous bone-marrow-derived mesenchymal stem cell transplantation in Parkinson's disease. **Translational Research**, New York, US, n. 155, p. 62-70, 2010.

VERFAILLIE C. M. Adult stem cells: assessing the case for pluripotency. **Trends in Cell Biology**, Cambridge, GB, v. 11, n. 12, p. 502-508, 2002.

WALSH D. M.; SELKOE D. J. Deciphering the molecular basis of memory failure in Alzheimer's disease. **Neuron**, Cambridge, US, n. 44, p. 181-193, 2004.

WALSH F. **Stem cell trial halted**. BBC News Health, 2011. Disponível em:
<<http://www.bbc.co.uk/news/health-15740133>> Acesso em: 25 jan 2012.

WEISSMAN I. L. Translating stem and progenitor cell biology to the clinic barriers and opportunities. **Science**, Washington, US, v. 287, n. 5457, p. 1442-1446, 2000.

WILMUT I. A. *et al.* Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. **Nature**, London, GB, v. 6619, n. 385, p. 810-813, 1997.

WOLTJEN K., I. P. *et al.* PiggyBack transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells. **Nature**, London, GB, v. 7239, n. 458, p. 766-770, 2009.

XU L. *et al.* Dual transplantation of human neural stem cells into cervical and lumbar cord ameliorates motor neuron disease in SOD1 transgenic rats. **Neuroscience Letters**, Limerick, IR, n. 494, p. 222-226, 2011.

XU Y. *et al.* Cocaine- and amphetamine-regulated transcript promotes the differentiation of mouse bone marrow-derived mesenchymal stem cells into neural cells. **BioMed Central Neuroscience**, London, GB, v. 12, n. 67, 2011.

YALVAÇ M. E. *et al.* Differentiation and neuro-protective properties of immortalized human tooth germ stem cells. **Neurochemical Research**, New York, US, 2011.

YALVAÇ M. E. *et al.* Potential role of dental stem cells in the cellular therapy of cerebral ischemia. **Current Pharmaceutical Design**, San Francisco, US, n. 15, p. 3908-3916, 2009.

YANG W. Z. *et al.* Safety evaluation of allogeneic umbilical Cord blood mononuclear cell therapy for degenerative conditions. **Science Translational Medicine**, Harrisborg, US, v. 8, n. 75, 2010.

YAO S., NORTON J.; WISE G. E. Stability of cultured dental follicle cells. **Cell Proliferation**, Oxford, GB, n. 37, p. 247-254, 2004.

ZHAO L. *et al.* Human bone marrow stem cells exhibit neural phenotypes and ameliorate neurological deficits after grafting into the ischemic brain of rats. **Experimental Neurology**, San Diego, US, n. 174, p. 11-20, 2002.

ZHOU W.; FREED C. R. Adenoviral gene delivery can reprogram human fibroblasts to induced pluripotent stem cells. **Stem Cells**, Dayton, US, v. 11, n. 27, p. 2667-2674, 2009.