

Vânia Marta Simões Costa

# *Recuperação do Sistema Nervoso Central*

## *O potencial das células estaminais*

Universidade Fernando Pessoa

Faculdade Ciências Da Saúde

Porto, 2011



Recuperação do SNC - O potencial das Células Estaminais

Vânia Marta Simões Costa

# *Recuperação do Sistema Nervoso Central*

## *O potencial das células estaminais*

Universidade Fernando Pessoa

Faculdade Ciências Da Saúde

Porto, 2011

Vânia Marta Simões Costa

# *Recuperação do Sistema Nervoso Central*

## *O potencial das células estaminais*

“Monografia apresentada à Universidade Fernando Pessoa como parte dos requisitos para obtenção do grau de licenciada em Análises Clínicas e Saúde Pública”.

---

## SUMÁRIO

Esta monografia teve como objectivo, verificar o *estado da arte* no que se refere à utilização de células estaminais no tratamento de lesões e de doenças degenerativas do sistema nervoso central.

Foram abordados ao longo deste trabalho de revisão, alguns aspectos fundamentais, descritos em diversos artigos científicos de âmbito internacional que definem o estado actual do desenvolvimento de terapias de recuperação do sistema nervoso central com base nas células estaminais, bem como as várias formas como estas poderão ser aplicadas.

A terapia celular com recurso a células estaminais é uma área de investigação com bastante potencial para o desenvolvimento de tratamentos para as lesões e doenças degenerativas do sistema nervoso central. Este tipo de tratamento é de particular importância, sobretudo devido à baixa capacidade de regeneração do sistema nervoso central. Possibilita a recuperação através de vários mecanismos, podendo repor ou melhorar a função do sistema nervoso lesado, tanto através da reposição celular, bem como, através da promoção da protecção neural libertando substâncias terapêuticas, e pode envolver a utilização de células de origem neural ou não neural.

Já foi demonstrada a eficácia terapêutica na utilização de várias fontes celulares. Contudo, de acordo com a literatura consultada, nenhum dos resultados mostrou uma importância clínica que justifique a sua aplicação na medicina actual. Por outro lado também apoiam a ideia de que, embora ainda existam muitos obstáculos a ultrapassar, a recuperação do sistema nervoso central lesado é uma hipótese bem mais realista do que anteriormente se poderia pensar.

**Palavras-chave:** Stem Cells, Neural Stem Cells, Fetal Stem Cells, Embryonic Stem Cells, Adult Stem Cells, Induce Stem Cells, Cell Therapy, Recovery of the Injured Central Nervous System, Células Estaminais.

## **ABSTRACT**

This work had as aim to check “the state of the art” in what concerns the use of stem cells to treat lesions and degenerative diseases of the central nervous system.

This review work covers some fundamental aspects, mentioned in several scientific articles of international extent, that define the present stage of a cell therapy treatment as to recover the central nervous system, and the different ways of how they can be applied.

Cell therapy using stem cells is an area of medical investigation with a very good potential in the development of therapeutics to treat lesions and degenerative diseases of the central nervous system. This kind of approach is of particular importance, especially due to the low capacity of regeneration of the central nervous system. It allows the central nervous system to recover by means of several mechanisms, being able to restore or to improve the function of the injured central nervous system, both through cell reposition, as well as with the release of therapeutic substances, and it can involve the use of cells of neural or non neural origin.

It has already been shown the therapeutic efficiency of stem cells from various sources. Even so, according to the articles consulted, none of the results showed a clinical relevance that justifies the application of stem cells in the current medicine. Nevertheless, the results also support the idea that, even with many hurdles to overcome, the recovery of the injured central nervous system may be more realistic than previously thought.

**Key-words:** Stem Cells, Neural Stem Cells, Fetal Stem Cells, Embryonic Stem Cells, Adult Stem Cells, Induce Stem Cells, Cell Therapy, Recovery of the Injured Central Nervous System, Células Estaminais.

## **AGRADECIMENTOS**

Quero transmitir o meu agradecimento à Mestre Mary Duro, por se ter disponibilizado para me orientar e apoiar nesta última etapa da minha formação.

À Professora Doutora Cristina Almeida, pela sua compreensão e apoio, numa altura em que eu já não acreditava que o meu trabalho chegaria à fase final.

À Mestre Ana Mota, por todo o seu apoio, disponibilidade e compreensão ao longo de todo o meu percurso académico.

A todos os Professores que contribuíram para a minha formação.

À Mestre Joana Gabriela Silva (docente na Universidade Católica Portuguesa) que, apesar de não me conhecer dispôs-se, com toda a sua simpatia, a prestar o seu apoio, disponibilidade e incentivo.

Aos meus pais, que me possibilitaram a realização deste curso.

A ti Andrea, pelo teu apoio, incentivo e amizade.

Acredite sempre em si mesmo,  
na sua própria capacidade para enfrentar qualquer situação.  
Não fique com receios,  
pois o “não” você já tem, no máximo, obterá o “sim”.

“Sérgio Luís P. da Matta”

## ÍNDICE

I. Introdução.....	1
II. Desenvolvimento .....	5
1. Organização do Tecido.....	6
1.1. Neurónios .....	6
1.2. Células de glia .....	9
2. Origem e desenvolvimento do Tecido Nervoso .....	9
2.1. Origem do tecido .....	9
2.2. Diferenciação celular .....	10
2.3 Migração neural.....	11
2.4. Cone de crescimento.....	12
3. Neurogénese no Adulto .....	12
3.1. Células Estaminais Neurais .....	13
3.2. Zonas Germinativas.....	13
3.3. Células de Glia como Células Estaminais Neurais.....	15
3.3.1. Células de Glia Radial, Astrócitos ou Ependimócitos.....	16
4. Resposta à lesão.....	18
4.1. Lesão à distância.....	18

4.2. Lesão nos axónios do SNP .....	18
4.3. Lesão nos axónios do SNC.....	20
4.4. Possíveis soluções para regenerar os axónios do SNC.....	21
4.5. Lesão no Corpo Celular.....	24
5. Terapias de Reposição Celular - potencial das células estaminais.....	26
5.1. Estratégias de tratamento.....	28
5.2. A célula estaminal ideal.....	29
5.2.1. Células estaminais embrionárias.....	30
5.2.2. Células estaminais neurais fetais .....	33
5.2.3. Células estaminais neurais adultas.....	39
5.2.4. Células estaminais não neurais adultas.....	41
5.2.5. Células estaminais induzidas .....	42
III. Conclusão .....	45
IV. Bibliografia.....	52

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Bainha de mielina formada pelas células de Schwann .....	7
Figura 2 - Bainha de mielina formada pelos oligodendrócitos .....	7
Figura 3 - Diferentes tipos de neurónios segundo a sua estrutura anatómica. Neurónio Multipolar (A); Neurónio Bipolar (B); Neurónio Unipolar (C) .....	8
Figura 4 - A - Esquema das relações entre a GR e os neurónios migrantes na morfogénese do córtex cerebral. B - Células de GR e neurónios imaturos isolados <i>in vitro</i> .....	11
Figura 5 - Cone de crescimento de um neurónio de galinha .....	12
Figura 6 - Esquema da resposta à lesão nos axónios do SNP .....	19
Figura 7 - Esquema da resposta à lesão nos axónios do SNC .....	21
Figura 8 - Cone de crescimento intacto (A) e cone de crescimento colapsado (B) pela actividade da molécula Nogo-A .....	22
Figura 9 - Representação da actividade, conjunta, dos astrócitos, das moléculas inibidoras do crescimento axonal (Cellular stressors), moléculas inibidoras produzidas pelos astrócitos (CSPG), da enzima Chondroitinase ABC (ChABC) e dos factores ou moléculas neurotróficas, na regeneração dos axónios lesionados .....	24

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

CE - Células Estaminais

CEE - Células Estaminais Embrionárias

CEi - Células Estaminais Induzidas

CEN - Células Estaminais Neurais

ChABC - Chondroitinase ABC

CSPG - Proteoglicano condroitina sulfato

EGF - Factor de Crescimento Epidermal

FDA - Food and Drug Administration

FGF - Factor de Crescimento dos Fibroblastos

GR - Glia Radial

NEPs - Progenitores Neuroepiteliais

NT-3 - Neurotrofina-3

SN - Sistema Nervoso

SNC - Sistema Nervoso Central

SNP - Sistema Nervoso Periférico

ZSG - Zona Subgranular

ZSV - Zona Subventricular

ZV - Zona Ventricular

---

---

## **I. Introdução**

---

---

Esta monografia teve como objectivo verificar o *estado da arte* no que se refere à utilização de células estaminais (CE) no tratamento de lesões e de doenças degenerativas do sistema nervoso central (SNC), evidenciando alguns aspectos fundamentais relativos a esta matéria, descritos em artigos científicos.

Actualmente existem ainda muitas limitações no tratamento de lesões e de doenças degenerativas do SNC (1 - 4). A medicina actual não permite que pacientes com graves lesões no SNC possam recuperar de forma a ter uma vida normal, permanecendo com grandes incapacidades para o resto da vida (3, 5). Além deste problema, o crescente aumento da longevidade nas sociedades ocidentais implica um crescimento directo no envelhecimento demográfico (6, 7). De acordo com a estimativa do Instituto Nacional de Estatística, Portugal terá em 2060 cerca de três idosos por cada jovem (8). Sendo que, a incidência de doenças neurodegenerativas aumenta com a idade, existe uma crescente necessidade de tratamentos efectivos que solucionem este tipo de patologias (2, 6 - 9).

A ausência de uma terapia eficaz que dê resposta a estes problemas leva a que a investigação científica tenha como objectivo o desenvolvimento de tratamentos que possibilitem a recuperação da função do SNC, assumindo por isso grande importância terapêutica (3, 2).

Com os recentes conhecimentos sobre o potencial neurogénico do SNC adulto e da potencialidade das CE em regenerar o tecido nervoso, abriram-se novas possibilidades de tratamento e investigação baseada na terapia celular (2, 7, 9 - 12). O desenvolvimento de uma terapia de reposição celular eficaz é de grande importância, particularmente devido à baixa capacidade de regeneração celular do SNC (11, 13). Assim, o principal objectivo destas técnicas consiste em repor o tecido neural perdido, por lesão ou doença, com células saudáveis, as quais após transplante poderão parar, abrandar ou inverter os eventos patológicos (7, 9, 11, 12, 14, 15). As pesquisas com CE fornecem ainda, uma forma de estudar fármacos para o tratamento das desordens do SNC e alguns processos patológicos, através da criação de modelos celulares das desordens neurais (15, 16).

São vários os tipos celulares que têm vindo a ser estudados com o objectivo de encontrar o tipo celular ideal para aplicação na terapia do SNC: desde as mais conhecidas - as células estaminais embrionárias (CEE) - passando pelas células

estaminais neurais (CEN) fetais e CE adultas (neurais e não neurais), até às mais recentemente investigadas - as células estaminais induzidas (CEi) (2, 7, 9, 11, 13, 16). Muitas mostraram eficácia nos testes laboratoriais e algumas já se encontram na fase de testes clínicos, aumentando a esperança de que é possível uma recuperação neural no SNC (2, 7, 9 - 11, 17, 18). Contudo, de acordo com a literatura consultada neste trabalho de revisão, os resultados positivos não foram reproduzíveis em todos os pacientes envolvidos nos testes clínicos, com apenas uma minoria a mostrar benefícios no tratamento (9, 7).

Apesar dos grandes avanços alcançados com as CE, a tecnologia actual ainda não se encontra suficientemente desenvolvida e segura para uma extensa aplicação clínica (2, 9). Ainda não está totalmente claro de que forma as células transplantadas contribuem para o processo de regeneração, havendo mesmo a possibilidade de provocar alguns efeitos nocivos não específicos devido à implantação de um grande número de células proliferativas, ou ainda, desenvolvimento de reacções imunitárias e formação de tumores, limitando assim o desenvolvimento de uma terapia de reposição celular eficaz (7, 9, 11). Outro obstáculo encontra-se no facto de que, as doenças neurodegenerativas variam muito nos tipos celulares mais afectados, o que dificulta o tratamento, visto ser necessário utilizar o tipo celular correcto para cada patologia (7, 9, 15).

Criar os tipos celulares adequados, que sobrevivam e enviem os prolongamentos aos alvos apropriados após transplante tem sido, à parte pouquíssimas excepções, praticamente impossível (7, 9, 15). Para complicar, tudo isto tem que ser conseguido, muito provavelmente, numa zona não neurogénica do cérebro adulto, envolvida num ambiente patológico hostil que impossibilita a regeneração e sobrevivência de novas células (2, 7, 15). Dito isto, depreende-se que, o desenvolvimento de uma terapia de reposição celular eficaz, para recuperação funcional do SNC, poderá levar ainda bastante tempo (7, 9, 11, 15).

Porém, alguns aspectos do comportamento das CE proporcionam um ambiente mais favorável à regeneração, podendo ser aplicadas através de outros métodos, que não apenas a reposição celular. Estas características das CE poderão ser utilizadas de forma

a promover protecção neural e assim, restaurar pelo menos alguma função ao SNC lesado, contribuindo para melhorar a qualidade de vida dos pacientes (7, 9, 11, 15).

Seja qual for a melhor técnica a desenvolver, são necessários mais estudos para compreender melhor os mecanismos envolvidos na recuperação e o verdadeiro potencial das CE de forma a desenvolver uma terapia celular eficaz (7, 9, 11). Este campo de estudo é extremamente recente e está em constante mudança e evolução. Apesar dos resultados obtidos nos diversos estudos com CE não se revelarem clinicamente úteis para o tratamento do SNC no presente, mostram um grande potencial para a terapia, permanecendo a esperança da melhoria, se não a cura, das doenças degenerativas e lesões do SNC (2, 7, 9, 11, 15, 16).

---

---

## **II. Desenvolvimento**

---

---

## 1. ORGANIZAÇÃO DO TECIDO

O tecido nervoso, apesar da sua elevada complexidade e densidade celular, é vulgarmente descrito como apresentando apenas duas categorias funcionais de células: neurónios e células de glia (19). Estes dois tipos celulares, embora exibam propriedades e funções marcadamente diferentes, parecem ser gerados a partir das mesmas CEN (1).

### 1.1. Neurónios

Os neurónios são dotados de um corpo celular ou pericário do qual partem frequentemente numerosos prolongamentos. O corpo celular contém um núcleo único, grande e esférico e os organelos comuns às células animais produtoras de proteínas. São células excitáveis, altamente diferenciadas, especializadas na recepção, condução e transmissão de impulsos nervosos através da sua membrana celular. No geral, o volume total dos prolongamentos de um neurónio é maior do que o volume do corpo celular (19).

Apresentam dois tipos funcionais de prolongamentos:

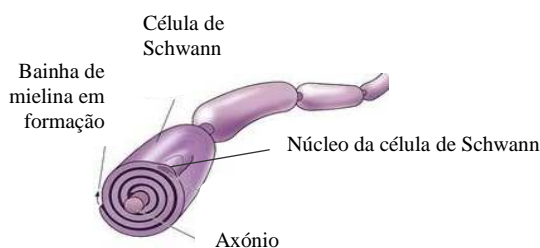
- Dendrites (do grego *déndron*: árvore): ramificações que têm a função de captar estímulos do meio ambiente, de células epiteliais sensoriais ou de outros neurónios (19). As dendrites podem ser abundantes formando a chamada arvore dendrítica, mas também podem ser mais escassas ou completamente inexistentes (20, 21).
  
- Axónio (do grego *áxon*: eixo): prolongamento único e geralmente o maior do neurónio (µm até cerca de um metro), especializado na condução de impulsos nervosos que transmitem informação do neurónio para os alvos: células nervosas, musculares e glandulares. Na sua parte final ramifica-se em prolongamentos muito finos (19).

Os axónios encontram-se associados a células de glia que podem formar uma bainha denominada bainha de mielina. Os neurónios nos quais não há formação dessa bainha - neurónios não-mielinizados - são neurónios de pequeno calibre (20, 22).

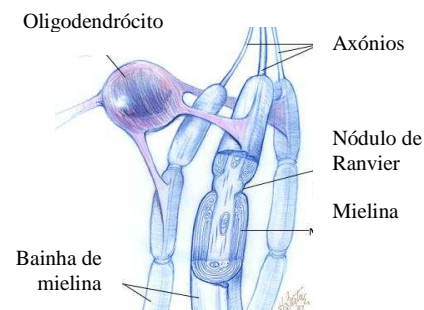
A bainha de mielina resulta da sobreposição das membranas das células de glia em cada internódulo do axónio e actua como um isolante eléctrico aumentando a velocidade de propagação do impulso nervoso ao longo do axónio. Os internódulos são intercalados pelos nódulos de Ranvier, livres de bainha de mielina. Assim, o impulso nervoso (potencial de acção) propaga-se de forma saltatória de um nódulo de Ranvier para o próximo, tornando a velocidade do impulso muito mais rápida em comparação aos axónios não mielinizados (20, 22, 23).

As células de glia que envolvem os axónios do sistema nervoso periférico (SNP) são as células de Schwann e no SNC são os oligodendrócitos. Uma célula de Schwann mieliniza um único internódulo de um único axónio (figura 1), enquanto que o oligodendrócito pode formar bainhas de mielina em internódulos de vários axónios, possibilitando uma redução significativa no número de células necessárias para mielinizar axónios (figura 2). Desta forma, permite economia do espaço físico, o que constitui uma vantagem para o desenvolvimento de um sistema nervoso mais complexo (20, 22).

Outra diferença relaciona-se com a forma como a mielina interage com os axónios numa situação de lesão. Enquanto que, no SNC a mielina em degeneração limita a plasticidade estrutural e regenerativa através de uma actividade inibidora para o crescimento de novos neurónios e axónios lesionados, no SNP a mielina formada pelas células de Schwann não provoca essa limitação e contribui para a recuperação dos axónios lesionados (capítulo 4) (5, 20, 24, 25).



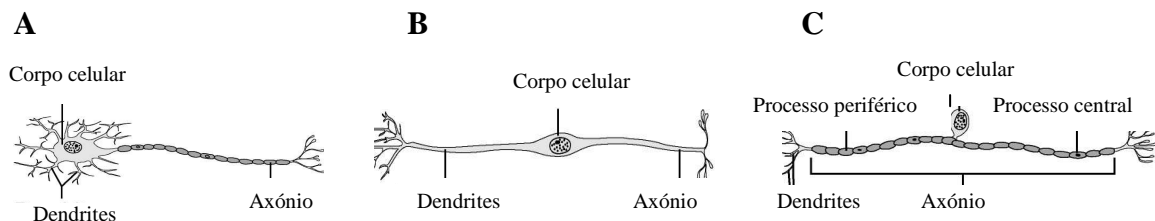
**Figura 1.** Bainha de mielina formada pelas células de Schwann (adaptada de: Astudillo, 2009) (26).



**Figura 2.** Bainha de mielina formada pelos Oligodendrócitos (adaptada de: Astudillo, 2008) (27).

Anatomicamente, distinguem-se três tipos de neurónios, classificados segundo o número e forma dos prolongamentos (figura 3):

- Neurónios unipolares que possuem apenas um prolongamento. As dendrites captam os estímulos que são directamente enviados para o neurónio seguinte através do axónio sem passar pelo corpo celular (tem apenas funções tróficas). Embora existam alguns no SNC, na sua maioria são neurónios sensoriais do SNP (figura 3 - C) (21).
- Neurónios bipolares que são menos abundantes e encontram-se em alguns órgãos sensoriais (mucosa olfactiva, olhos). Têm muitas dendrites que podem ser maiores do que o axónio (figura 3 - B) (21).
- Neurónios multipolares são os mais abundantes de todos e é o tipo neuronal principal no SNC (figura 3 - A) (21).



**Figura 3.** Diferentes tipos de neurónios segundo a sua estrutura anatómica. Neurónio Multipolar (A); Neurónio Bipolar (B); Neurónio Unipolar (C) (adaptada de: Marieb, 2004) (21).

Funcionalmente, podem ser classificados segundo a via de transmissão de que fazem parte:

- Neurónios sensoriais ou aferentes recebem impulsos dos receptores sensoriais da pele ou órgãos internos e transmitem-nos ao SNC. À excepção dos neurónios bipolares, todos os neurónios sensoriais são unipolares e os seus corpos celulares estão localizados nos gânglios sensoriais fora do SNC. Os seus prolongamentos são geralmente muito longos (ex. as fibras que transportam impulsos sensitivos da pele dos dedos do pé estendem-se por mais de um metro até atingir os seus corpos celulares nos gânglios, perto da espinal medula) (21).

- Neurónios motores ou eferentes transmitem impulsos do SNC para os órgãos efectores. São multipolares e na grande maioria o corpo celular situa-se no SNC (21).
- Interneurónios situam-se entre os neurónios motores e os sensoriais. São quase todos multipolares e a maioria está confinada ao SNC onde a integração da informação ocorre (21).

## **1.2. Células de Glia**

As células de glia, geralmente chamadas neuróglias ou simplesmente glia (do grego "cola"), formam uma população celular, funcional e estruturalmente diversa, e partilham a característica de não transmitir impulsos nervosos. São bastante mais numerosas que os neurónios e em geral mais pequenas (19, 22).

Células de glia do SNC e suas principais funções: os astrócitos participam no controle do ambiente iónico e reciclagem de neurotransmissores (20, 22). As células de glia radial (GR) são uma população fetal transitória particularmente abundante no SNC em desenvolvimento, exibindo a dupla função de suporte para a migração de neurónios e de população progenitora (CE) (28 - 30). As células da microglia constituem sensores da lesão tecidual, promovendo a fagocitose de patógenos e neurónios lesados, responsáveis assim pela reparação tecidual. Os oligodendrócitos estão envolvidos na mielinização de axónios no SNC, podem no entanto ser responsáveis pela inibição do seu crescimento (21, 22). Os endotélio ou células endoteliais são responsáveis pelas trocas iónicas e hídricas entre o líquido cefalorraquidiano e o tecido neural (20).

## **2. ORIGEM E DESENVOLVIMENTO DO TECIDO NERVOSO**

### **2.1. Origem do Tecido**

Durante desenvolvimento inicial do embrião são estabelecidas as camadas celulares primitivas necessárias para a formação posterior do sistema nervoso. Tais camadas resultam da divisão celular do conjunto inicial de células (embrioblasto) que, após os

eventos iniciais de proliferação e subsequente gastrulação, dá origem às três grandes camadas germinativas formadas na terceira semana de gestação: a ectoderme, a mesoderme e a endoderme (1, 31).

## **2.2. Diferenciação Celular**

A activação e inactivação de diversos sinais indutores promovem a diferenciação de parte da ectoderme em neuroectoderme (1, 20, 31, 32). Todas as células do SNC são descendentes directas ou indirectas da população celular da neuroectoderme, também referidas por alguns autores como progenitores neuroepiteliais (NEPs) (14, 15, 33, 34).

Os NEPs sofrem uma intensa proliferação celular, ao longo do desenvolvimento do SNC, que limita gradualmente as possibilidades fenotípicas das células descendentes, passando de CE totipotentes (capazes de originar todos os tipos celulares do feto e parte embrionária - placenta) a CE multipotentes (CEN - capazes de gerar os tipos celulares que compõem o tecido ou órgão específico onde se encontram) e posteriormente a precursoras neuronais e gliais (células parcialmente diferenciadas - dividem-se dando origem a células diferenciadas; são também designadas por células progenitoras), conforme se vão estabelecendo as sub-regiões do SNC (20).

As CE da camada celular mais próxima do lúmen na zona ventricular (ZV) dividem-se rapidamente gerando inicialmente neurónios (28, 33). Em conjunto com a neurogénese começa-se a diferenciar um segundo tipo celular, a GR (14, 34). Além dos primeiros precursores neuronais (neuritos) migratórios, a GR é dos primeiros tipos celulares a se diferenciarem no SNC em desenvolvimento (28, 33, 34).

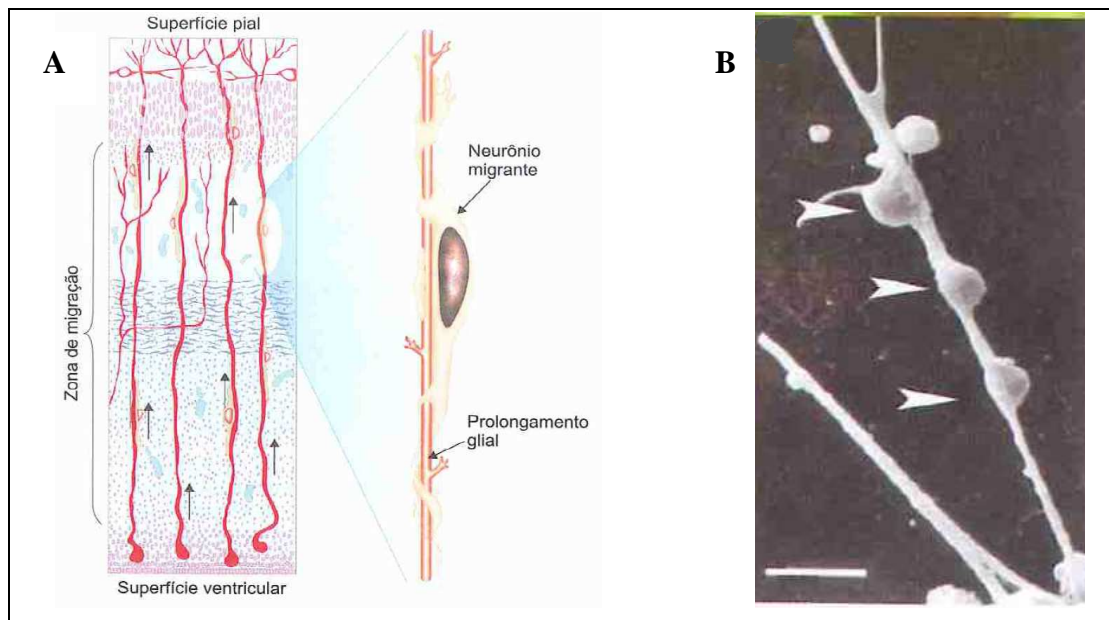
Conforme o desenvolvimento prossegue aparece uma nova zona logo abaixo da ZV, a zona subventricular (ZSV), a qual origina muitas células de glia (28, 33). As células da ZV atingem o pico proliferativo durante a embriogénese e mantêm uma proliferação residual durante a primeira semana pós-natal, quando a GR termina a sua diferenciação nos astrócitos da ZSV e nos endotélio que circundam os ventrículos (28 - 30). A ZSV contém células de rápida proliferação, que se expandem muito durante o último trimestre do desenvolvimento embrionário, em paralelo com uma redução progressiva

da ZV (28, 33). Por fim, a ZV desaparece e a ZSV diminui, permanecendo apenas uma fina ZSV (28 - 30).

### 2.3. Migração Neuronal

A migração neuronal é o processo pelo qual os neurónios se deslocam até às suas posições finais no SNC. A migração neuronal parece ocorrer segundo dois mecanismos distintos. As células podem ser conduzidas até aos seus locais finais mediante mecanismos baseados em moléculas de adesão ou, alternativamente, utilizar células de GR, cuja organização morfológica com longos processos que se estendem da superfície ventricular à superfície pial, permite “guiar” os neurónios durante a migração (fig.4) (1, 20, 34).

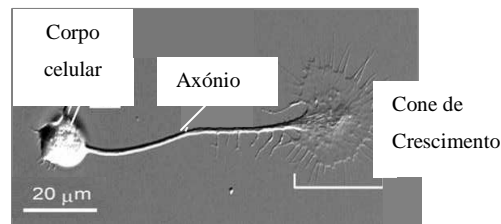
Estas deslocações celulares exercem importantes efeitos sobre a diferenciação dos neurónios. Os diferentes fenótipos parecem depender da interacção da célula precursora neuronal ao longo de uma via migratória, com diferentes sinais disponíveis nos diferentes pontos de passagem (1, 33).



**Figura 4.** A - Esquema das relações entre a GR e os neurónios migrantes na morfogénese do córtex cerebral. B - Células de GR e neurónios imaturos isolados *in vitro*. Os neurónios (indicados pelas setas a branco) aderem às células de GR e começam a deslocar-se ao longo das suas fibras celulares (fonte: Carvalho e Collares-Buzato, 2005) (20).

## 2.4. Cone de crescimento

Cada axónio em crescimento apresenta na sua extremidade uma estrutura chamada cone de crescimento (figura 5). São estruturas altamente móveis que exploram o ambiente extracelular, detectando e respondendo a moléculas sinalizadoras. Reconhecem os alvos sinápticos e favorecem associações sinápticas correctas, determinando a direcção para o crescimento adequado dos axónios, orientando assim, a elongação do axónio nessa direcção (1).



**Figura 5.** Cone de crescimento de um neurónio de galinha (adaptada de: Tojima, 2008) (35).

## 3. NEUROGÉNESE NO ADULTO

No cérebro adulto a capacidade para gerar novas células parece ser limitada, uma vez que a capacidade para mover, sentir e pensar depende da estabilidade dos circuitos neurais (14, 36). As novas células derivam de CEN, cuja identidade ainda não está totalmente esclarecida (9, 10, 14). A escassez destas células e a incapacidade daí resultante em repor os neurónios perdidos foi, por muito tempo, considerada como principal causa da vulnerabilidade do SNC a doenças e lesões (10). Ainda assim, alguns novos neurónios vão sendo gerados em zonas específicas do SNC adulto (9, 10, 17, 36).

A formação de novas células (neurogénese) é influenciada positivamente por variáveis como, abundância de factores de crescimento, de dopamina (neurotransmissor produzido por certos grupos de neurónios) e seus agonistas (fármacos que se ligam aos mesmos receptores que a dopamina exercendo a mesma função) e por estímulos fisiológicos (exercício físico e os estímulos intelectuais) (7, 9, 11, 36). É negativamente influenciada pelo ambiente formado mediante degeneração do SNC e por mediadores inflamatórios (7, 9, 11).

Apesar da neurogênese no adulto ser actualmente um facto considerado como certo, permanecem por esclarecer várias dúvidas, tais como: qual a origem das novas células formadas no SNC do adulto? Quais os seus marcadores celulares? Que mecanismos controlam a neurogênese e diferenciação celular e qual o potencial das CEN do adulto? Algumas destas dúvidas têm sido motivo de controvérsia entre a comunidade científica (7, 10, 11, 14, 29).

### **3.1. Células Estaminais Neurais**

As CEN são células que mantêm a sua capacidade proliferativa e potencialidade de se diferenciarem em células de glia e neurónios (9, 10, 12, 17). Podem ser obtidas a partir de linhagens de CEE e das zonas germinativas do cérebro fetal e do adulto (9, 12, 14). Quando transplantadas, podem sobreviver e diferenciar-se, tanto no ambiente de cérebros fetais, bem como, do adulto (9, 14). Em cultura e na presença de factores de crescimento como o factor de crescimento epidermal (EGF) e o factor de crescimento dos fibroblastos (FGF), as CEN dividem-se formando, cada uma, um agregado celular esférico característico, referido como neurosféricas (9, 14, 29, 37, 38). Quando expostas a sinais apropriados (factores neurotróficos que estimulam genes controladores do desenvolvimento) diferenciam-se em células de glia e neurónios (12, 20, 29, 39).

A capacidade para identificar e purificar CEN abre uma nova perspectiva para o tratamento das lesões e patologias do SNC, tal como aconteceu nas doenças hematológicas quando as CE hematopoiéticas foram identificadas e purificadas (10, 14, 17, 29, 36). Contudo, ainda se desconhece um marcador específico para as CEN “adultas”, o que dificulta a identificação do precursor que origina os novos neurónios formados no SNC adulto (10, 14, 29, 39).

### **3.2. Zonas Germinativas**

As zonas germinativas produzem neurónios durante o desenvolvimento e ainda possuem algumas CEN no adulto. Embora a grande maioria dessas células morra, algumas persistem, multiplicam-se por toda a vida e muitas diferenciam-se em células

de glia ou neurónios, principalmente interneurónios - não foi observado diferenciação de CEN adultas em neurónios com axónios muito longos (1, 28, 29, 36, 40).

Os nichos de CEN das zonas germinativas do adulto, são microambientes produzidos por células, substratos extracelulares e sinais que, também medeiam a diferenciação neural durante o desenvolvimento. Estes microambientes permitem que as CEN expressem o seu potencial, regulando a forma como elas participam na geração, manutenção e reparação tecidular no SNC adulto (1, 28, 36, 38).

Uma das poucas evidências concordante entre os vários estudos sobre a identidade das CEN do adulto é a de que, embora seja possível isolar CEN de várias zonas do SNC, a formação dos novos neurónios ocorre essencialmente em duas zonas germinativas: no hipocampo - mais especificamente na zona subgranular (ZSG) do girus dentado - e no ventrículo lateral (1, 9, 10, 17, 36 - 40).

No hipocampo os neurónios gerados diferenciam-se e amadurecem localmente, suspeitando-se que a grande capacidade de memória e aprendizagem desta área se deva à ocorrência de neurogénese (28, 36, 38, 39). No ventrículo lateral os neurónios imaturos formados, migram para o bulbo olfactivo, onde amadurecem e se integram como interneurónios (1, 17, 28, 29, 36 - 38, 40).

A parede do ventrículo lateral é composta por uma camada de endimócitos que revestem o lúmen e a ZSV abaixo da camada de endimócitos (29, 37, 38). Estudos iniciais indicavam apenas a ZSV e não o ventrículo lateral, como zona de neurogénese no adulto (10, 37). Com o estudo de Frisé e colaboradores (1999), levantou-se a hipótese da ZSV ser unicamente uma zona de abrigo ou refugio para as CEN que na realidade se originam nos sistemas ventriculares (37). Esta hipótese é mais concordante com algumas características do SNC, como o facto de ser possível isolar CEN de outras regiões que não contêm uma ZSV (1, 9, 28). Estudos mais recentes confirmaram que o nicho neurogénico no adulto é de facto mais extenso do que anteriormente se pensava (9, 40). Verificou-se que não só a ZSV, mas também outras áreas da parede do ventrículo lateral e algumas porções teciduais da passagem migratória por onde os neurónios imaturos se deslocam até ao bulbo olfactivo, são zonas germinativas (40). Embora ainda

não tenha sido possível determinar com clareza o precursor neural primário que origina os neurónios *in vivo*, quando isoladas *in vitro*, as células destas zonas apresentam características de CEN com capacidade para se multiplicar e gerar novos neurónios (10, 29, 39).

Aparentemente não se produz nenhum neurónio noutras regiões do SNC adulto, mas o facto de que podem ser gerados nestas zonas do cérebro e a existência de CEN noutras regiões, sugere que o mesmo possa ocorrer em todo o SNC (1, 9, 10). Suspeita-se que isso apenas não acontece devido à possível existência de sinais inibidores fora das zonas germinativas que impedem as CEN de se diferenciarem em neurónios e assim, as CEN das zonas não germinativas dão origem essencialmente a células de glia (1, 28). Tanto as CEN das zonas germinativas quanto as de zonas não germinativas, quando transplantadas para zonas germinativas geram neurónios e glia, e quando transplantadas para zonas não germinativas geram apenas glia (7). Além disso, quando cultivadas *in vitro* com os factores FGF-2 e EGF, diferenciam-se em astrócitos, oligodendrócitos e neurónios (14).

### **3.3. Células De Glia Como Células Estaminais Neurais**

Foram identificados três tipos celulares com características de CEN, nas zonas germinativas do SNC adulto. Apresentam capacidade de se auto-renovar, gerar novos neurónios, astrócitos e oligodendrócitos. Surpreendentemente as três são células de glia; os astrócitos, os endimócitos e as células de GR (10, 20, 29, 34, 38).

A estrutura complexa dos astrócitos, endimócitos e das células de GR, com múltiplos filamentos e características bioquímicas e estruturais de células diferenciadas e especializadas, não é compatível com o que se considerava por definição uma CEN - células indiferenciadas sem nenhuma função além de gerar novos neurónios e células de glia. Ao contrário, estas células parecem combinar funções de células progenitoras com funções de células de glia especializadas (14, 28, 29, 38, 39).

Ainda que pareça estranho que células diferenciadas, como as células de glia, possam ser CEN, evidências anteriores demonstraram que noutros grupos de animais (aves,

anfíbios, répteis) as células de glia diferenciam-se em neurónios quando estes sofrem lesão no SNC (14, 28,29). Desta forma entende-se que, ou estas células, que têm vindo a ser consideradas como células de glia, têm potencial para se diferenciar e funcionar como CEN, ou algumas células de glia não se encontram totalmente diferenciadas e poderão estar mais intimamente associadas à linhagem das CEN do que anteriormente se pensava (39). É possível que, quando estas células se começam a dividir, estejam apenas a sair de um estado celular quiescente (fase G0 do ciclo celular) para reentrar no ciclo celular (14, 29, 34).

Este novo conceito de que células diferenciadas, como as células de GR, astrócitos e endimócitos, mantêm a sua capacidade proliferativa e podem até regredir na sua diferenciação originado posteriormente neurónios, tem vindo a por em causa a ideia dominante de que as células diferenciadas apenas se poderiam dividir em células iguais a si mesmas (20, 39). Alguns investigadores chegam mesmo a considerar alguns tipos de astrócitos e células de GR como CEN (14, 20, 28, 29, 39, 40). Esta ideia está de acordo com a hipótese de que as células de glia de regiões não neurogénicas também actuam, sobe condições apropriadas, como CEN (14, 28, 39).

A identificação ou classificação das células de glia como células de glia, antes de se saber as suas funções actuais, poderá ser o resultado de se ter identificado ou classificado erradamente as células de glia. Por outro lado, a definição de célula diferenciada - incapaz de originar outros tipos celulares - é que poderá estar errada. Seja qual for a hipótese correcta, ao que tudo indica, pelo menos no SNC a diferença entre uma CE multipotente e algumas células de glia não é tão grande como antes se pensava (14, 29, 38).

### **3.3.1. Células de Glia Radial, Astrócitos ou Ependimócitos**

Apesar dos vários esforços para determinar a identidade das CEN presentes nas zonas germinativas do SNC do adulto, ainda não foi possível chegar a um consenso entre a comunidade científica. Os diferentes grupos defendem, com base nas evidências encontradas nas suas pesquisas, diferentes tipos de células de glia como sendo as CEN presentes no SNC do adulto (11, 14, 28, 29, 34, 37 - 39).

Os três tipos celulares - GR, astrócitos e endotélio - apresentam marcadores de CEN, capacidade proliferativa e potencialidade de se diferenciarem em células de glia e neurónios, tanto *in vitro*, bem como, *in vivo* (11, 14, 28, 29, 34, 37 - 39). Estas características em comum, aliado ao facto de que não são conhecidos marcadores específicos para cada um dos três tipos de células de glia, gera confusão na identificação das células encontradas nos diferentes estudos (29, 38).

No final das modificações pós-natal, algumas células de GR ainda persistem nas zonas germinativas do cérebro do mamífero adulto, após transformações morfológicas que tornam a sua identificação mais difícil (14, 28, 29, 34). Assim, não se exclui a possibilidade das células de GR, ou derivadas destas, funcionarem como CEN também no adulto, tal como acontece durante o desenvolvimento embrionário (14, 28, 34).

Algumas CE encontradas nas zonas germinativas do adulto exibem um fenotipo único, intermédio entre a GR embrionária e os astrócitos de outras zonas. Exibem propriedades típicas das células de GR e dos astrócitos, mas também possuem características intermédias entre estas duas categorias celulares (14, 28). Desta forma, o facto de alguns grupos terem observado células de GR como CEN e não astrócitos e outros o contrário, poder-se-á dever à ainda presente dificuldade em definir este tipo celular (28, 29, 34).

No caso dos endotélio, poderá ter ocorrido erro na sua identificação devido à elevada proximidade espacial entre os diferentes tipos celulares (endotélio, astrócitos e GR) da ZSV (29, 38). A diferença nos resultados obtidos nos diferentes estudos, também poderá ser o resultado dos endotélio se dividirem raramente, para dar origem a um tipo celular de rápida proliferação, encontrado nas zonas germinativas e que se pensa ser um tipo celular intermédio na geração das novas células (28, 29, 37, 39, 40). Não excluindo contudo, a possibilidade das células de glia originarem directamente neurónios sem passarem por este tipo celular intermédio (39). Adicionalmente, a capacidade dos endotélio e dos astrócitos das zonas germinativas em manterem o seu potencial neurogénico de CEN, poder-se-á dever ao facto de derivarem das células de GR (20, 34, 39).

As discrepâncias entre os diferentes estudos poderão ainda, ser o reflexo da dificuldade em definir o momento em que o verdadeiro fenotipo da GR surge ou desaparece e mostram o quanto difícil é classificar as células das zonas germinativas do SNC adulto em tipos celulares vulgarmente aceites (14, 28, 34). As diferenças experimentais também poderão ter contribuído para as diferenças nos resultados obtidos pelos diferentes grupos (29). Não obstante, nenhum estudo excluiu a possibilidade de diferentes tipos de células de glia funcionarem como CEN. Assim, os três tipos celulares (astrócito, GR, ependimócitos) identificados como contendo características de CEN, poderão realmente estar correctos. Sejam quais forem as, ou a hipótese correcta, ficou comprovado que algumas células de glia podem actuar como CEN (14, 28, 29).

## **4. RESPOSTA À LESÃO**

### **4.1. Lesão à distância**

As lesões celulares no Sistema Nervoso (SN) não afectam apenas os neurónios envolvidos. Neurónios vizinhos, próximos ou mesmo distantes, também podem ser afectados de forma directa ou indirecta. Os neurónios que têm ramificações com as células lesadas são directamente afectados pela destruição dessas ligações, podendo ocorrer também, destruição das suas ramificações terminais. Neurónios vizinhos, que não têm ligações directas com as células lesadas, podem ser indirectamente afectados, influenciados pelo desaparecimento dos terminais competidores pelos mesmos alvos. Estas perdas levam à necessidade de compensação, podendo haver um crescimento de ramificações que se vão ligar às células alvo que perderam os seus neurónios de ligação. Esta reorganização pós trauma estabelece alguma capacidade de restauração, mas nem sempre inteiramente compensatória em termos funcionais (1, 20).

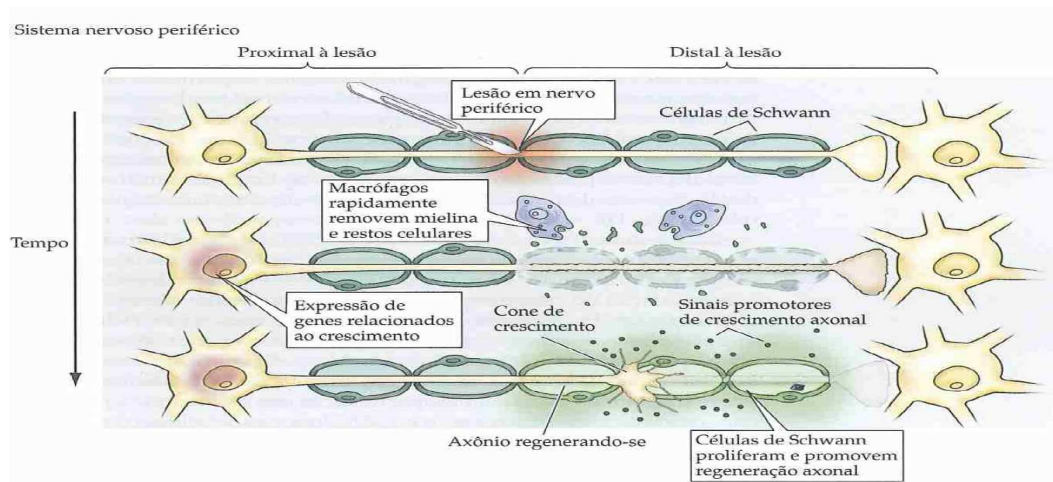
### **4.2. Lesão nos axónios do SNP**

Devido à sua distribuição por todo o corpo, as lesões nos axónios são relativamente frequentes (19). Quando um axónio do SNP é seccionado ocorrem alterações degenerativas seguidas de uma fase de reparação. A parte do prolongamento que fica

separada do corpo celular (parte distal) degenera, enquanto que a parte ligada ao corpo celular (parte proximal) geralmente reinicia o processo de crescimento (figura 6) (1, 20, 22).

As células de Schwann ligadas à parte distal do axónio seccionado sofrem regressão na sua diferenciação e a bainha de mielina degenera. A parte distal do axónio e a bainha de mielina degenerada são fagocitadas pelos macrófagos - procedimento importante para que não haja inibição da regeneração (1, 20). O corpo celular do neurónio aumenta de volume e reinicia a produção dos elementos necessários à regeneração (receptores neurotróficos, moléculas do citoesqueleto e os componentes da membrana plasmática). Forma-se um novo cone de crescimento na extremidade do axónio (figura 6) (20).

Os neurónios lesados e as células vizinhas, entre as quais as células de Schwann e as células do sistema imunitário, aumentam a produção de factores neurotróficos e citocinas que estimulam o crescimento dos prolongamentos e a multiplicação das células de Schwann (figura 6) (20).



**Figura 6.** Esquema da resposta à lesão nos axónios do SNP (fonte: Purves, *et alii.*, 2005) (1).

As células de Schwann que sofreram regressão proliferam e alinham-se, formando uma coluna longitudinal por onde os axónios em regeneração podem crescer até ao alvo. Os axónios crescem e ramificam-se, formando vários filamentos que progridem em direcção às colunas de células de Schwann, sendo tal crescimento orientado pelos mediadores químicos enviados pelas células alvo e pelas próprias células de Schwann

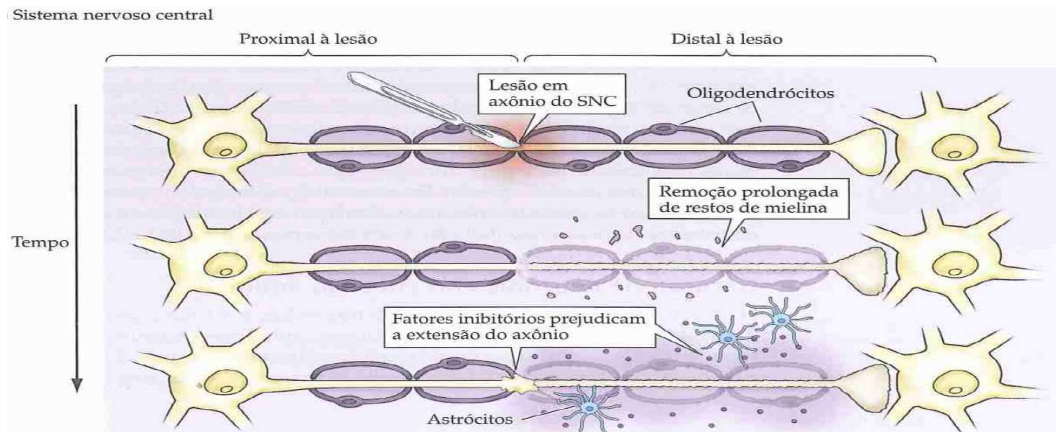
(figura 6) (19, 20). A eficácia funcional da regeneração depende de cada axónio ocupar a coluna de células de Schwann que promove a ligação ao alvo correcto (10, 22). Quando os axónios atingem os alvos ocorre a remielinização (20).

Se a formação de tecido cicatrizante for muito rápida, se o espaço deixado pelo prolongamento lesado for preenchido por fibras de cologénio ou, se a lesão atingir o corpo celular do neurónio, os prolongamentos não se conseguem regenerar (41).

### **4.3. Lesão nos axónios do SNC**

Quando ocorre lesão nos axónios do SNC o processo de regeneração normalmente falha (3, 20, 42). Quando há perda total dos prolongamentos, os neurónios ficam sem nenhuma ligação a outras células, acabando por morrer devido à incapacidade em receber moléculas neurotróficas (19).

A regeneração parece não ser bem sucedida essencialmente por dois motivos. Primeiro, quando ocorre lesão nos axónios, o corpo celular nem sempre consegue reactivar a expressão dos genes necessários para o crescimento do axónio, pois parecem ser suprimidos quando o indivíduo atinge a maturidade (1, 3, 42). Segundo, quando é possível reactivar tais genes, os cones de crescimento que se vão desenvolver a partir da lesão encontram um ambiente desfavorável ao crescimento (figura 7) (1, 3 - 5, 42, 43). As membranas de mielina em degeneração libertam moléculas inibidoras do crescimento axonal (1, 5, 24, 25, 43). A remoção dos resíduos gerados ocorre apenas ao fim de alguns dias, sendo mediada pelas células de microglia. Este processo é demorado e pode levar algumas semanas, o que contribui para um agravamento na libertação de moléculas inibidoras (20, 44). Após a lesão, os astrócitos aumentam a sua proliferação, sofrem hipertrofia e migram de imediato para o local da lesão (20, 22, 45). Ocupam os espaços deixados pelos neurónios mortos e pelos axónios danificados, promovendo a chamada cicatrização astrocitária. (19, 20, 22, 45). Esta cicatriz contribui para selar o local da lesão e assim, reduzir a infecção e proteger os tecidos que rodeiam a lesão (42). Porém, também constitui uma barreira física e molecular (libertam moléculas inibidoras) através da qual os axónios não conseguem crescer (3, 4, 19, 20, 42, 45).



**Figura 7.** Esquema da resposta à lesão nos axônios do SNC (fonte: Purves, *et alii.*, 2005) (1).

Os astrócitos e outras células vizinhas à lesão secretam diversas citocinas e factores de crescimento que contribuem para a sobrevivência dos neurónios directa ou indirectamente envolvidos, mas essas proteínas não inibem a acção das moléculas inibidoras do crescimento axonal (19, 20).

Não se sabe a razão pela qual a evolução originou esta diferença entre os ambientes moleculares do SNC e o do SNP, em situação de lesão. Especula-se que talvez se deva à necessidade de estabilidade nas ligações do encéfalo adulto para que seja possível o processamento e armazenamento da imensa informação que é possível assimilar (1).

#### 4.4. Possíveis soluções para regenerar os axónios do SNC

Uma vez que a impossibilidade de regeneração dos axónios no SNC resulta, essencialmente, da presença de moléculas inibidoras, a regeneração poderá ser estimulada pela remoção ou inibição dessas moléculas (1, 4, 5, 11, 24, 42). Pensa-se que seja possível atingir esse objectivo através de vários processos como:

- i) Transplante de células que contribuam para um ambiente mais favorável ao crescimento axonal (1, 3, 11).

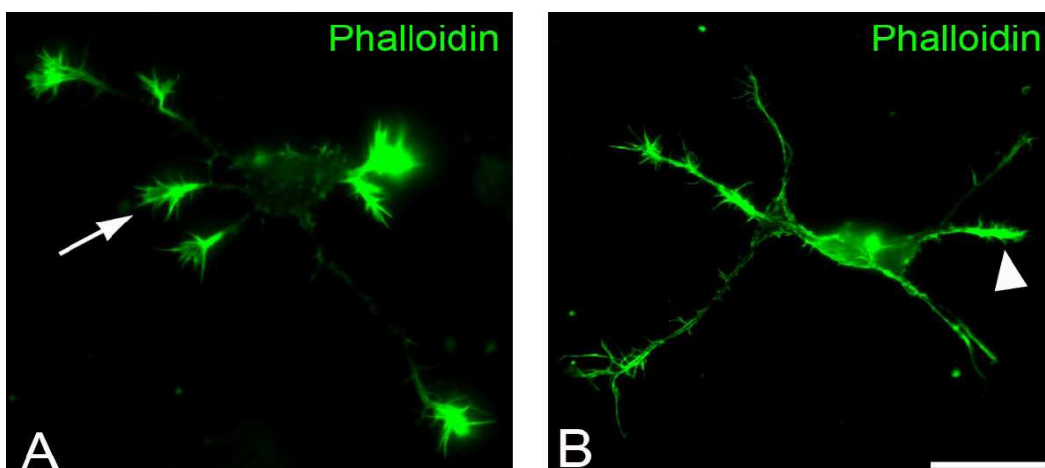
Foram produzidas em cultura, células com propriedades de segregar anticorpos contra moléculas inibidoras. Quando transplantadas em conjunto com células de Schwann e CEN para o SNC, produziram um ambiente que facilitou o crescimento dos axónios

lesados e em alguns casos promoveram a recuperação funcional, mostrando assim uma forte acção sobre as moléculas inibidoras (1).

O transplante de nervos periféricos também apresentou alguns efeitos positivos (1, 3, 5, 11). O ambiente produzido pelas células do SNP é tão favorável ao crescimento axonal que mesmo os axónios do SNC podem ser regenerados através de segmentos de nervos periféricos, transplantados para o SNC. Com estes transplantes verificou-se que, pelo menos alguns neurónios são capazes de regenerar os seus axónios utilizando as propriedades do ambiente de crescimento mais favorável do nervo periférico, permitindo que cresçam ao longo de muitos centímetros de distância, chegando a formar sinapses viáveis com as células alvo (1, 5).

ii) Tratamento com moléculas que anulem a actividade das moléculas inibidoras libertadas pelos astrócitos e pela mielina em degeneração (3 - 5, 24, 25, 42).

Uma das moléculas inibidoras presente na mielina do SNC, a Nogo-A, pode ser anulada através da aplicação de anticorpos anti-Nogo-A. Quando aplicados no tratamento do SNC lesionado de mamíferos adultos (roedores e primatas), estes anticorpos ligam-se à Nogo-A neutralizando-a, promovendo assim a regeneração e recuperação funcional dos axónios lesados (figura 8) (1, 5, 24, 25, 43, 46).



**Figura 8.** Cone de crescimento intacto (A) e cone de crescimento colapsado (B) pela actividade da molécula Nogo-A (fonte: Joset, *et alii.*, 2010) (24).

Outro método consiste na aplicação de moléculas competidoras pelos mesmos locais de ligação (nos axónios) das moléculas inibidoras libertadas pela mielina em degeneração. Esta técnica impede a ligação das moléculas inibidoras aos axónios possibilitando a sua recuperação (5).

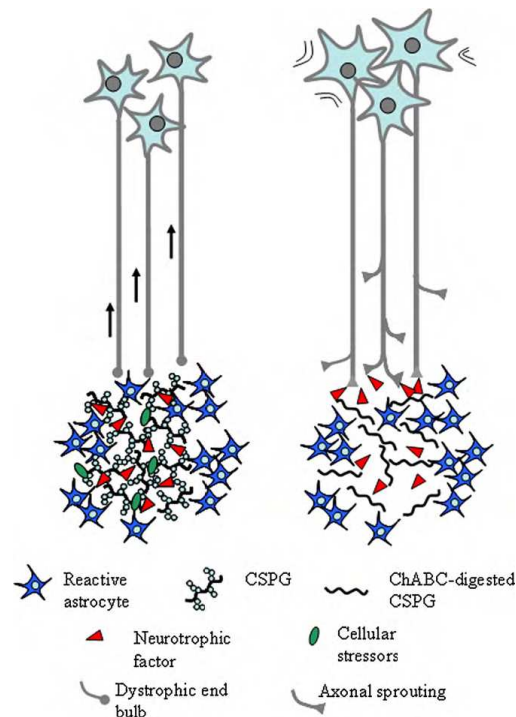
A utilização de uma enzima bacteriana, a chondroitinase ABC, também apresentou resultados positivos na anulação das moléculas inibidoras. Esta enzima provoca a degradação de uma classe de moléculas inibidoras produzidas pelos astrócitos, as proteoglicano condroitina sulfato (CSPG), contribuindo para a regeneração dos axónios (3, 4, 42).

iii) Tratamento com moléculas neurotróficas de forma a promover o crescimento axonal e a neurogénese (7, 11, 24, 36, 42 - 44, 46).

As neurotrofinas ou moléculas neurotróficas são uma classe de proteínas que aumentam a sobrevivência neural (2, 7, 36). Em caso de lesão ou doença do SN, as neurotrofinas podem atenuar o comportamento e as consequências neurobiológicas dos danos (2, 7, 36, 42). Por exemplo, a neurotrofina-3 (NT-3) pode aumentar a capacidade de regeneração na medida em que, activa um receptor no corpo celular dos neurónios lesados que conduz a um aumento da resposta celular à lesão (11, 44). Quando os axónios lesionados são tratados de imediato com a NT-3, conseguem crescer através do ambiente inibidor provocado pelos astrócitos. O crescimento pára apenas quando o tecido é invadido pelas células de microglia que iniciam a degeneração da mielina, cerca de uma semana após a lesão (44). Nesta fase, encontram-se poucos axónios em regeneração na massa branca, mas na massa cinzenta muitos continuam em crescimento, provavelmente porque aí se encontra menos bainha de mielina do que na massa branca (19, 44). Quando o tratamento ocorre já na presença de degeneração dos axónios e da mielina, o tratamento falha, o que sugere que as moléculas libertadas neste processo (degeneração) representam uma barreira inibidora mais potente do que aquela provocada pelos astrócitos (44).

O tratamento com a NT-3 não altera a resposta dos astrócitos à lesão nem o processo degenerativo, o que confirma que a promoção da regeneração por parte da NT-3 não está relacionada com uma alteração nas células de glia, mas sim nos neurónios (44).

iv) Tratamento combinado de diversas estratégias de regeneração axonal. O transplante de nervos periféricos associado à aplicação de moléculas neurotróficas e moléculas que anulam a actividade das moléculas inibidoras, mostrou sucesso na regeneração dos axónios lesionados e promoveu alguma recuperação funcional (figura 9) (3 - 5).



**Figura 9.** Representação da actividade conjunta dos astrócitos, das moléculas inibidoras do crescimento axonal (Cellular stressors), moléculas inibidoras produzidas pelos astrócitos (CSPG), da enzima Chondroitinase ABC (ChABC) e dos factores ou moléculas neurotróficas, na regeneração dos axónios lesionados (fonte: Bradbury e Carter, 2010) (42).

#### 4.5. Lesão no Corpo Celular

Uma lesão no corpo celular de um neurónio geralmente leva a um processo de morte neuronal. Embora os prolongamentos possam estar intactos, se o corpo celular estiver danificado, estes não o conseguem regenerar (20).

Se ocorrer morte num número considerável de neurónios de uma mesma população, pode ser estimulada a proliferação compensatória a partir das CEN (9, 20, 36). A perda neuronal, na ausência de uma grande lesão anatómica, é seguida por uma reposição celular e os novos neurónios gerados enviam prolongamentos celulares por distâncias consideráveis para reinervar os alvos apropriados (7, 12). Contudo, não são produzidos neurónios em número suficiente para repor os neurónios perdidos numa grande lesão (7, 10, 11). Parece que os mesmos factores que contribuem para um ambiente molecular não permissivo à regeneração dos axónios lesionados, também contribuem para a incapacidade dos progenitores em se diferenciarem e dos novos neurónios sobreviverem e se integrarem (1, 4, 7, 42, 43).

Este conceito de que é necessário um microambiente local permissivo para a produção e integração de novos neurónios tem ganho considerável apoio nos últimos anos (2, 4, 5, 7, 11, 17, 36, 42). Foram feitos estudos de forma a induzir a neurogénese, nas áreas não neurogénicas, como resposta à lesão e verificou-se que as zonas não neurogénicas do cérebro de roedores restituíam os neurónios perdidos após receberem uma injeção com os factores FGF-2 e EGF, nos ventrículos adjacentes à lesão, revelando que estes factores neurotróficos fazem parte do microambiente necessário para que ocorra neurogénese (7).

Quando ocorre lesão no SNC, a resposta imunológica cria um ambiente que promove a remielinização e formação da cicatriz astrocitária (4, 7, 11, 42). Os sinais pró-inflamatórios recrutam os oligodendrócitos para a remielinização dos axónios e influenciam a indução da neurogénese. Contudo, esses mesmos sinais parecem travar o processo neurogénico, impedindo a formação de novos neurónios (7). Assim, será necessário atenuar os sinais pró-inflamatórios de forma a permitir a formação e sobrevivência dos neurónios, e ampliar os sinais que promovem a maturação e integração neural correcta (7, 11, 17, 42).

A administração de anti-inflamatórios não esteroides pode atenuar alguns desses sinais, promovendo assim a neurogénese e aumentando a sobrevivência dos progenitores neurais que migram para as zonas não neurogénicas (7). A aplicação da enzima Chondroitinase ABC também parece ter efeitos anti-inflamatórios. Quando aplicada em

situação de lesão inibe os sinais inflamatórios que impedem os axónios de se regenerar, contribuindo para um ambiente molecular mais permissivo à formação e sobrevivência de novos neurónios (42).

## **5. TERAPIAS DE REPOSIÇÃO CELULAR – potencial das células estaminais**

O transplante de CE tornou-se uma estratégia muito promissora para o tratamento de inúmeras doenças, incluindo as lesões e desordens neurológicas, sendo já uma realidade como terapia em diversos tipos de transplante tais como medula, pele, córnea, traqueia, entre outros (2, 4, 9, 12, 14, 17).

Uma razão para a grande importância da terapia celular nas lesões do SNC é que, em comparação à maioria dos tecidos e órgãos, o SNC adulto tem menor capacidade para gerar novas células de forma a repor o tecido perdido (11, 13).

Os principais objectivos para qualquer terapia de reposição celular com base nas CE são, a sobrevivência e eficácia funcional das células transplantadas e evitar potenciais efeitos adversos como o desenvolvimento de tumores e rejeição imunitária (2, 9). Apesar da reposição dos neurónios lesados através do transplante ser actualmente bastante explorada como potencial tratamento para muitas doenças neurodegenerativas e lesões traumáticas do SNC, a aplicação da medicina regenerativa no tratamento do SNC ainda está longe de atingir esses objectivos (2, 9, 14). Ainda não está totalmente claro de que forma as células transplantadas produzem benefícios, havendo mesmo a possibilidade de provocar efeitos lesivos não específicos devido à implantação de um grande número de células proliferativas ou ainda, devido a reacções imunitárias (7, 9, 11).

A maioria dos circuitos neurais é construída muito cedo durante o desenvolvimento e vai sendo modificada durante um longo período. Desta forma, é difícil imaginar que uma única parte do circuito neural possa ser prontamente substituída por outra nova (15). Adicionalmente, o facto das doenças neurodegenerativas variarem na sua complexidade e tipos celulares mais afectados dificulta o tratamento com CE, pois é necessário o tipo celular adequado a cada patologia (2, 7, 9, 17).

A criação de tipos celulares adequados que sobrevivam e enviem os prolongamentos aos alvos apropriados após transplante tem sido extremamente difícil (7, 9, 15). As células transplantadas não conseguem realizar tal função num cérebro saudável e muito menos no ambiente hostil de um cérebro em degeneração (2, 7). Mesmo nos poucos casos em que se conseguiu atingir a reposição celular através das CE, as doenças acabaram por progredir (2, 7, 9). Para contornar este problema poderá ser necessário recorrer a estratégias combinadas de forma a prevenir a progressão da degeneração e melhorar a sobrevivência e manutenção da função das células transplantadas (2, 4, 7, 9, 15, 17).

Estudos recentes revelaram que, o transplante celular combinado com estratégias de protecção neural melhora bastante a sobrevivência e integração das células transplantadas (4, 42). Assim, estratégias que utilizam a protecção neural associada a uma reposição celular local poderão ser mais eficazes para alcançar a restauração completa dos sistemas neurais afectados e a cura total (2, 4, 7, 9, 12, 17, 42).

A protecção neural pode ser baseada na remoção das moléculas inibidoras e inflamatórias, aplicação de fármacos, factores de crescimento e moléculas neurotróficas, distribuídos pela via sistémica ou através de transportadores celulares (biosondas) (4, 7, 9, 11, 17, 42). As neurotrofinas difundem-se pouco através da barreira hematoencefálica e a sua distribuição pela via sistémica produz uma abundância de efeitos secundários negativos (2, 7). Assim, o recurso a células que migrem até ao parenquima e aí produzam um suplemento local estável de factor neurotrófico parece constituir uma condição mais favorável (7, 12, 17). Pelas suas características, tais como, capacidade de migração até aos locais de lesão e possibilidade de segregar factores neurotróficos, as CE podem ser utilizadas para este tipo de aplicações (7, 11, 12). Logo, ainda que a total reposição de um sistema neural degenerado seja um objectivo longe de ser alcançado, pelo menos os sintomas das doenças degenerativas poderão ser aliviados através da aplicação das CE (7, 15).

As CEE e as CEN humanas, além de se diferenciarem em neurónios, também conseguem originar células de glia. Esta capacidade é bastante útil uma vez que a produção de progenitores de oligodendrócitos poderá ser muito valiosa para a terapia de doenças desmielinizantes (7, 9, 15, 47). Contudo, verificou-se que estes transplantes só

são eficazes quando as células são transplantadas logo após a lesão (até 7 dias), indicando a existência de uma fase temporal crucial para o sucesso da terapia celular (4, 15).

Para melhorar a sobrevivência pós transplante das células fenotipicamente apropriadas, é necessário que as células transplantadas sejam imunocompatíveis com as do receptor e a utilização de imunossuppressores se necessário (7, 9, 11, 15). Uma total compatibilidade seria o desejado, mas extremamente difícil de conseguir quando se recorre a transplantes alogénicos (transplantes de dadores). A utilização de imunossuppressores provoca algumas melhorias na terapia, mas ainda assim, não é suficiente para tornar a terapia de reposição celular um método de tratamento eficaz (7).

O grau de rejeição aumenta não só com o grau de incompatibilidade entre o dador e o receptor, mas também com o grau de trauma produzido pela lesão ou doença degenerativa e pelo procedimento do transplante (7, 11). As características de uma perda celular massiva e as reacções inflamatórias do SNC, podem criar um ambiente local desfavorável, limitando a eficácia de uma terapia celular aplicada logo após a lesão (11). A inflamação reduz a neurogénese e a sobrevivência dos poucos neurónios que são produzidos e até influencia a diferenciação dos progenitores neurais transplantados em direcção a astrócitos ou oligodendrócitos (7).

Uma vez que a sobrevivência das células transplantadas está directamente relacionada com a recuperação funcional, é importante garantir que as células são transplantadas para um ambiente que favoreça a sua sobrevivência e integração no tecido hospedeiro (2, 11). Assim, juntamente com a reposição neural, será necessário desenvolver outras estratégias terapêuticas que permitam ultrapassar os efeitos das reacções inflamatórias e imunitárias de forma a promover a recuperação funcional (7, 11).

## **5.1. Estratégias de tratamento**

A reposição celular por si não garante a reversão de todos os efeitos da lesão. Desta forma, as terapias celulares devem contemplar várias estratégias, complementares entre si, aumentando assim a probabilidade de reparação (4, 7, 9, 11).

Das várias estratégias destacam-se:

i) O transplante de CE alteradas de forma a fornecer moléculas neuroprotectoras, impedindo assim a progressão da doença ou lesão (7, 11, 17). A disponibilização de tais mediadores pode ocorrer quer pela produção a partir das próprias CE, quer pela sua distribuição a partir destas (biosondas), de forma a abrandar ou mesmo interromper o processo degenerativo e promover a recuperação dos circuitos afectados (7).

ii) O aumentando do sinal nos circuitos restantes mediante o transplante de CE que tenham sido modificadas de forma a fornecer neurotransmissores (quer pela produção a partir das próprias CE, quer pela sua distribuição através de biosondas) e assim, melhorar os sistemas não afectados, compensando as perdas noutros sistemas (7).

iii) Regenerar os circuitos perdidos através do transplante de células pré-diferenciadas nos tipos celulares em falta (pode ser uma mistura de precursores) para repor as células perdidas, de forma a reconstruir os circuitos afectados pelas lesões ou doenças. As células devem ter capacidade de se integrar (estender os seus prolongamentos celulares para as regiões adequadas), funcionar (formar sinapses) e sobreviver (7, 9, 12, 15).

O estudo da terapia celular para o SNC é recente e embora as técnicas de substituição celular, remielinização e fornecimento local de neurotransmissores e factores neurotróficos se estejam a aproximar dos grandes objectivos clínicos de segurança e eficácia nos modelos animais, ainda não está claro qual destas aplicações chegará primeiro à terapia clínica (7, 9).

## **5.2. A Célula Estaminal ideal**

As CE humanas provenientes de diferentes tecidos possuem atributos únicos que afectam a sua aplicabilidade na terapia. Desta forma, têm vindo a ser estudadas células de várias origens (embrionárias, fetais e adultas) de forma a investigar a sua potencialidade na terapia de reposição celular do SNC (2, 7, 9, 12, 14, 16, 47).

### 5. 2. 1. Células Estaminais Embrionárias

As CEE são células mais imaturas que as CEN fetais e adultas, sendo portanto as que apresentam o maior potencial de diferenciação neural (7, 15). Contudo, ainda que estejam a ser desenvolvidas estratégias para induzir a diferenciação das CEE nos diferentes subtipos celulares, actualmente ainda não é possível a geração eficiente de todos os subtipos de células neurais (9, 15).

As CEE são reproduzidas com facilidade em cultura e mantêm a pluripotencialidade e estabilidade genética ao longo de divisões sucessivas, sendo normalmente descritas como imortais, o que representa uma grande vantagem em relação às CEN fetais e adultas que requerem imortalização via mutação ou introdução de proto-oncogenes (7, 9, 12, 15). A expressão de proto-oncogenes, ainda que útil para a expansão, introduz o risco de formação de tumores nos transplantes (7, 12).

As CEE humanas são extraídas da massa celular interna do blastocisto de embriões excedentários, gerados por fertilização *in vitro* na gravidez assistida. Estas células fornecem uma fonte ilimitada de células para transplante (7, 9, 14, 15). Podem gerar milhões de células com potencial ilimitado (totipotentes) e quando induzida a sua diferenciação em precursores neurais geram neurónios e células de glia, tanto em cultura como quando transplantadas para o SNC adulto (7, 9, 14). Quando diferenciadas *in vitro* são indistinguíveis das células neurais *in vivo*, sugerindo que a sua integração funcional poderá ser enorme. Também podem ser facilmente modificadas de forma a segregar neurotransmissores ou factores de crescimento favoráveis ao abrandamento da degeneração ou aumentar os circuitos intactos (7). No entanto, quando transplantadas no seu estado indiferenciado, geram rapidamente teratomas (tipo de tumor das células germinativas derivado das células multipotentes) pós transplante, sendo o risco de cancro associado aos transplantes contaminados com CEE indiferenciadas, o maior obstáculo para a sua utilização clínica (2, 7, 9, 15).

Vários estudos demonstraram que a diferenciação das CEE humanas antes do transplante pode melhorar a segurança dos transplantes (7, 9, 15). Para atingir maior segurança é necessário conseguir a diferenciação pré ou pós transplante da totalidade

destas células e/ ou a capacidade de as modificar de forma a provocar a sua morte selectiva após transplante se assim necessário (7, 15). Contudo, a indução da diferenciação destas células *in vitro* restringe a sua capacidade de diferenciação nos diferentes subtipos neurais (14, 15).

Outra forma de tentar assegurar um transplante livre de CEE é através da remoção, após diferenciação, das células não neurais nas culturas celulares (2, 9, 15). Este procedimento é bastante importante uma vez que, além de remover qualquer CEE que não se tenha diferenciado também elimina qualquer possível célula não neural que interfira com a diferenciação dos neurónios (15).

A criação de culturas puras, com progenitores específicos ou neurónios imaturos derivados das CEE, também poderá eliminar a contaminação com CEE e células de linhagens não neurais, e ainda, evitar outras linhagens neuronais que poderão causar efeitos indesejados (2, 15). As culturas puras também poderão fornecer um meio para produzir, em maior quantidade, os subtipos neuronais mais necessários para as terapias de reposição celular (9).

O transplante de CEE humanas pré-diferenciadas para as zonas germinativas do cérebro de ratos adultos, resultou na diferenciação dessas células em neurónios nas zonas germinativas e células de glia na massa branca. O transplante do mesmo tipo de células para o cérebro de ratos durante o desenvolvimento embrionário promoveu a diferenciação dessas células em neurónios que se assemelhavam aos neurónios da mesma região do cérebro do hospedeiro. Os novos neurónios formados eram activos, formavam sinapses funcionais com os neurónios envolventes e não se verificou formação de teratomas. Estes dados revelam que, o transplante de CEE pré-diferenciadas para as zonas germinativas do cérebro em desenvolvimento ou do adulto, também torna a sua utilização mais segura, com menor probabilidade de reterem um estado indiferenciado. Demonstram ainda, a eficácia neural das CEE humanas pré-diferenciadas *in vitro* e a sua capacidade de resposta aos sinais ambientais tornando-se funcionais quando colocadas num ambiente condutor (15).

A diferenciação das CEE é assim um processo complexo que envolve várias fases, incluindo algumas ainda não bem compreendidas. Mesmo quando se obtém um transplante livre de CEE não diferenciadas, algumas células interrompem a sua diferenciação no estado de CEN, continuando a proliferar após o transplante, aumentando por isso a possibilidade de provocar efeitos adversos. Assim, alguns autores defendem que a solução para o problema da contaminação dos transplantes com células proliferativas poderá estar no recurso à manipulação genética. Pensa-se que tal poderá ser alcançado através de vários métodos tais como, o bloqueio da proliferação e dos mecanismos de sobrevivência das células que continuam a proliferar, através da manipulação de genes relevantes; tornar as CEE mais susceptíveis a substâncias antimicrobianas através da inserção de um gene suicida sob o controlo de um antibiótico; introdução de genes repórteres de forma a possibilitar a sua identificação e extracção pós-transplante. Outras estratégias envolvem a utilização de anticorpos de superfície celular conjugados com beads magnéticos de forma a permitir a extracção celular e finalmente, a utilização de fármacos que tenham como alvo células em divisão (9). Estes métodos poderão ser utilizados para eliminar não só, as CEE pré-diferenciadas que possam causar efeitos adversos, mas também qualquer célula proliferativa, como as CEE que tenham escapado aos processos de indução da diferenciação (9, 15).

Foi demonstrado entretanto que os neurónios totalmente diferenciados *in vitro* a partir das CEE humanas, quando colocados em cultura juntamente com as células alvo, podem formar sinapses funcionais e ser bloqueados por transmissores farmacológicos específicos. Tais evidências confirmam que os neurónios formados *in vitro* a partir das CEE, podem tornar-se funcionais quando colocados num ambiente condutor. Demonstra ainda a semelhança entre as especificações das linhagens neurais *in vitro* e *in vivo*, bem como a possibilidade de controlar a acção das células transplantadas (15). Contudo, quando se transplantaram células totalmente diferenciadas a partir de CEE, para o cérebro de ratos e de macacos com doença degenerativa, verificou-se apenas uma pequena recuperação funcional e ainda assim, somente em alguns dos animais que apresentavam maior sobrevivência de células transplantadas (9, 15). Não se sabe ainda o porque dessa recuperação, especula-se que se deva aos factores tróficos fornecidos pelo enxerto bem como ao facto de existirem astrócitos nas cultura transplantadas, podendo o

transplante de misturas celulares (neurónios e glia) ser uma forma de ajudar à sobrevivência dos neurónios (15).

A reduzida sobrevivência e eficácia dos neurónios derivados das CEE humanas nos modelos animais poderão estar, em parte, relacionados com a relativa maturidade dos neurónios. Os neurónios transplantados são derivados de células geradas em cultura durante longos períodos de tempo, o que poderá levar a um aumento na morte celular. Ainda que a diferenciação pré transplante das CEE reduza o perigo de formação de tumores pós transplante, uma diferenciação e maturação extensiva também poderá provocar efeitos adversos que prejudicam a sobrevivência das células transplantadas (9).

Apesar do grande potencial das CEE como fonte celular para o tratamento de lesões no SNC, isso apenas se tornará realidade na aplicação clínica, quando e se for alcançada maior eficácia na produção dos subtipos neuronais mais necessários para a terapia e maior sobrevivência e capacidade funcional pós transplante, sem que ocorram efeitos adversos (9). Porém, mesmo que se consigam atingir esses objectivos, a utilização de CEE apresenta ainda várias limitações de natureza imunológica e sobretudo ética difíceis de ultrapassar, sendo por isso tão debatida quanto a utilização de tecido fetal de abortos (7, 11, 18, 45). Desta forma, a utilização de CE endógenas (adultas) aparenta ser uma alternativa com maior potencial terapêutico para uma ampla aplicação no tratamento do SNC (2, 17, 18, 37, 47).

Não obstante, as pesquisas com CEE para tratamento do SNC já se encontram numa fase de desenvolvimento suficientemente avançada para que tenha sido considerado seguro a sua utilização em testes clínicos, sendo que, em Janeiro de 2009 a “Food and Drug Administration” (FDA) aprovou o primeiro teste clínico com CEE no tratamento de lesões da espinal medula (2, 11, 18).

### **5. 2. 2. Células Estaminais Neurais Fetais**

As CEN fetais são obtidas a partir de embriões e fetos após a sua morte (2, 7, 9, 14, 47). Apesar de conterem menor potencial proliferativo que as CEE, a sua relativa capacidade de proliferação permite uma produção celular suficiente para aplicação em muitos

pacientes a partir de um único dador (7, 9, 14). Mantêm estabilidade genética em cultura durante um número significativo de passagens, dando origem a uma grande quantidade de neurónios e células de glia quer *in vitro* quer *in vivo*, quando transplantados para zonas saudáveis do SNC de ratos adultos ou em desenvolvimento (7, 9, 12, 14). As células de glia e neurónios assim gerados sobrevivem e estendem os seus prolongamentos, formando ligações com as células vizinhas. No entanto, se transplantadas para zonas em degeneração, sobrevivem mas geralmente não estendem os seus prolongamentos e como tal, não produzem melhorias funcionais, verificando-se uma relação directa entre a localização do transplante e benefícios associados. A potencialidade terapêutica dos transplantes está ainda relacionada com a idade das células transplantadas e tratamento imunossupressor, sendo as CEN fetais retiradas dos fetos mais jovens as que produzem mais melhorias, bem como, quando se realiza tratamento imunossupressor (9).

Apesar de algumas CEN fetais continuarem a proliferar após transplante para o SNC, não se verificou, até à actualidade, formação de tumores derivados destas células, sendo consideradas como não tumorogénicas, o que representa uma grande vantagem para a sua aplicação clínica em oposição às CEE (7, 9, 14).

As CEN fetais, retiradas de qualquer parte do SNC, têm capacidade de proliferar em cultura na presença dos factores de crescimento EGF e FGF, e quando se utiliza um substrato aderente obtém-se uma cultura homogénea, pouco diferenciada e com pouca perda celular (9, 14). Usando estas condições, foram geradas linhagens celulares tanto directamente a partir de culturas celulares primárias de tecido neural, bem como, a partir de neurosféricas reproduzidas por longos períodos de tempo (de cultura e expansão). Enquanto que nas neurosféricas as CE constituem apenas uma fracção da população total, nas culturas em que se utiliza o substrato aderente todas as células são CE. Esta técnica já foi aplicada a células fetais do cérebro de humanos mas ainda não se conseguiu definir na totalidade a sua capacidade de expansão e subsequente diferenciação (14). Se os resultados obtidos com ratinhos forem reproduzíveis para as células humanas, estas células podem ser expandidas para aplicação em milhares de pacientes (7, 14).

O poder de divisão das CEN fetais também poderá ser ampliado através da manipulação genética. À semelhança das CEE, tanto as CEN fetais quanto as adultas, são susceptíveis de manipulações genéticas, possibilitando a criação de linhagens celulares estáveis e imortais (12, 14).

Entretanto, já foram criadas linhagens de CEN estáveis e imortais, a partir de CEN fetais humanas, manipuladas geneticamente através da alteração na expressão de um oncogene. As CEN fetais imortalizadas podem ser multiplicadas rapidamente *in vitro*, induzida a sua diferenciação em neurónios e células de glia - fornecendo uma população renovável de neurónios e células de glia - e revelam o potencial de produzir vários factores neuroprotectores. Verificou-se ainda que, quando transplantadas para diferentes áreas do SNC embrionário de ratinhos, geram os mesmos tipos celulares que estão a ser produzidos pelas células endógenas nessas áreas. Esta capacidade de se diferenciar *in situ* no cérebro do animal receptor, poderá permitir uma introdução alvo das CEN fetais imortalizadas em regiões definidas do cérebro de forma a corrigir alterações específicas e eventualmente, restaurar a função neurológica em muitos tipos de doenças e lesões do SNC com patologia bastante disseminada (12).

Alguns estudos mostraram que, quando transplantadas para o cérebro lesionado de ratos, um largo número CEN fetais imortalizadas sobrevivem e migram para as zonas da lesão, diferenciaram-se em astrócitos e neurónios, e promovem melhorias no comportamento (12). Ainda que a manipulação genética das CEN introduza a possibilidade de formação de tumores pós transplante, não foi observado formação de tumores em nenhum desses estudos (7, 12). No entanto, poderá ser necessário a observação dos animais transplantados por períodos mais alargados de forma a esclarecer até que ponto essas células são realmente estáveis e compreender melhor como se processam as melhorias, uma vez que, melhorias funcionais a longo prazo requerem a incorporação dos neurónios transplantados no circuito neural endógeno (15).

Já foram utilizadas CEN fetais humanas no tratamento de algumas doenças neurodegenerativas, apresentando resultados variáveis de paciente para paciente (2, 7, 9). Alguns pacientes apresentaram melhorias apenas durante o período de tratamento imunossupressor (6 a 9 meses) ao fim do qual as doenças acabaram por progredir. Nos

exames pós-mortem verificou-se a existência de células de microglia activas e linfócitos nos tecidos transplantados e em zonas circundantes (9).

Outros pacientes mostraram benefícios clínicos variáveis durante dois a três meses pós transplante, contudo, só morreram ao fim de nove a catorze anos após o transplante. Outros ainda, mostraram evidentes melhorias clínicas durante três anos e morreram de causas não relacionadas com a doença, três a quatro anos após o transplante. Os exames pós-mortem mostraram integração dos tecidos, com bastantes células sobreviventes, sobretudo na periferia dos transplantes. Nos pacientes transplantados há mais tempo (9 a 14 anos) havia ainda, bastantes células de microglia a rodear os tecidos transplantados, mas sobretudo num estado inactivo (9).

Foi descrito um caso de um paciente (sessenta e um anos) com história de doença neurodegenerativa durante vinte e dois anos, quando transplantado com CEN fetais, apresentou melhorias clínicas significantes durante onze anos, após os quais começou a degenerar gradualmente. As análises pós-mortem, catorze anos após o transplante, mostraram que as células transplantadas tinham sobrevivido e apresentavam extensiva inervação. Contudo, havia perda de neurónios e muitos apresentavam a patologia para a qual o paciente tinha sido tratado e células de microglia activas. Outros casos semelhantes, também apresentaram os mesmos resultados nos exames pós-mortem, mas com morte dos pacientes ao fim de apenas quatro anos. Outros ainda, apresentaram melhorias clínicas mínimas e nos exames pós-mortem, onze a dezasseis anos pós-transplante, apresentaram sobrevivência e integração de poucos neurónios transplantados, e mais uma vez, com desenvolvimento da mesma patologia que os neurónios restantes (9).

Um paciente que recebeu dois transplantes consecutivos, apresentou patologia em 80% dos neurónios transplantados dezasseis anos antes e 40% nos transplantes com catorze anos, sugerindo que a patologia também evoluiu com o tempo nas células transplantadas. Existia ainda, células de microglia acumuladas à volta do tecido transplantado, mas não se apresentavam activas (9).

Estas observações, de que em alguns pacientes os neurónios transplantados desenvolvem a patologia do cérebro hospedeiro, sugerem que as doenças neurodegenerativas também podem afectar neurónios jovens. Permanece incerto contudo, o significado destas evidências para a aplicação das CE na terapia uma vez que, não se desenvolveu patologia em todos os casos e naqueles em que se desenvolveu, foi apenas numa pequena fracção das células e com um significado incerto para a viabilidade e eficácia do transplante (2, 9).

Embora os resultados tenham variado de paciente para paciente, na generalidade dos casos as CEN fetais transplantadas tornaram-se funcionais e integradas, produzindo algumas melhorias funcionais (9). Contudo, os benefícios clínicos obtidos não chegam a ter um relevo que justifique a sua utilização na terapia (2, 9). A razão para a ineficácia terapêutica desses transplantes continua por descobrir, mas pensa-se que poderão estar relacionados com factores como:

- Efeito placebo que poderá assim justificar as melhorias iniciais (7).
- Selecção de pacientes inadequados: Os pacientes mais jovens e ainda numa fase inicial da doença têm em geral, melhores resultados do que pacientes com mais idade e/ ou doença mais avançada (7, 9).
- Selecção e transplante do tecido: Factores como a qualidade, a consistência, a idade e a quantidade do tecido fetal transplantado, tempo de armazenamento pré-transplante e as técnicas utilizadas na transplantação, poderão não ter sido as melhores afectando a sobrevivência e integração dos neurónios transplantados (7, 9).
- Terapia imunossupressora inadequada que poderá ter resultado na rejeição imunitária do transplante devido a, falha, período de aplicação ou imunossuppressores inadequados (7, 9).

Todos estes factores poderão ter comprometido, no seu conjunto ou individualmente, a sobrevivência dos tecidos transplantados (9).

O transplante de neurónios diferenciados, a partir de CEN fetais, para o SNC em degeneração também apresentou resultados diversos. Foram relatados casos em que não se verificaram melhorias, até aos casos em que se verificaram melhorias funcionais significativas, tanto nos modelos animais bem como nos testes clínicos. Contudo, a sobrevivência pós transplante de alguns subtipos neuronais muito importantes para a terapia tem sido muito baixa (9).

As CEN fetais e as adultas já possuem alguma diferenciação, estando dessa forma direccionadas para evoluir no sentido da formação de certos tipos celulares, sendo portanto mais difícil, embora possível, induzir a sua diferenciação em subtipos celulares diferentes daqueles para os quais estão direccionadas. Por outro lado, parecem necessitar de menos processos de diferenciação, pré ou pós transplante, para se diferenciarem nos subtipos para os quais estão direccionadas (7, 15). Mesmo após prolongada expansão *in vitro*, as CEN fetais parecem reter algumas das propriedades específicas da região da qual foram retiradas, sendo a diferenciação de cada subtipo neural maior a partir das CEN fetais retiradas das zonas onde esses subtipos se formam durante o desenvolvimento (9). Contudo, tal como acontece com as CEE, ainda não foi possível diferenciar as CEN fetais em todos os subtipos neurais necessários para o tratamento do SNC em degeneração (7, 12).

Para que as CEN fetais se tornem uma fonte celular viável para o tratamento de reposição celular do SNC, são necessárias mais pesquisas de forma a desenvolver um protocolo eficiente para a produção dos subtipos neuronais mais adequados a cada terapia (9). A utilização de CEN fetais apresenta ainda, as mesmas limitações de carácter imunológico e ético que as CEE em termos de disponibilidade de tecidos fonte, uma vez que são obtidas a partir de embriões e fetos abortados (7, 9, 11, 12, 47). Também ainda não está claro qual o tempo óptimo de desenvolvimento (embrionário ou fetal) em que estas células devem ser extraídas (9). Devido a estas dificuldades, alguns autores defendem que seria mais vantajoso para o desenvolvimento dos transplantes celulares, isolar CE “adultas” específicas de cada tecido e multiplicar essas células como células de distintas linhagens celulares (7, 11, 14, 47).

### 5. 2. 3. Células Estaminais Neurais Adultas

As CEN adultas podem ser obtidas a partir de tecidos pós-mortem ou de biopsias de pacientes (células autólogas) e reproduzidas em cultura (2, 7, 10, 11, 17). Persistem no SNC durante toda a vida e medeiam uma limitada reparação do SNC do adulto (7, 9, 10, 11, 17, 36). Além de multipotentes, também podem ser pluripotentes (capacidade para gerar células de outros órgãos e tecidos), podendo originar células tão diferentes como as células hematopoiéticas (9, 10, 29, 36). Exibem estabilidade genética ao longo de muitas divisões e diferenciam-se em neurónios e células de glia, tanto *in vitro* quanto *in vivo* após transplante para o SNC, sem que haja formação de teratomas (7, 9). Apresentam ainda capacidade para migrar por longas distâncias até aos locais de lesão (10, 11, 17).

No entanto, as CEN adultas são as que menos se dividem *in vitro* - factor limitante para a sua produção em cultura em quantidades suficientes para tratamento, dificultando a sua utilização na maioria das aplicações médicas (7). E tal como as CEE e as CEN fetais, quando se tenta promover a diferenciação das CEN adultas em células especializadas, estas não reproduzem todos os fenótipos das células neurais *in vivo* (7, 12, 15). Verifica-se ainda que, a capacidade proliferativa das CE se correlaciona negativamente com a idade do dador, o que torna mais difícil obter células em número suficiente de pacientes ou dadores com idades mais avançadas (7, 36). De qualquer forma, tanto as CEN fetais quanto as adultas, geram rapidamente células de glia que poderão ser geneticamente alteradas de forma a transportar ou segregar factores neuroprotectores (7).

Uma vez que, a maior limitação da utilização das CEN adultas na terapia resulta da sua limitada capacidade de divisão em cultura, se a sua capacidade proliferativa e potencial neurogénico pudessem ser significativamente aumentados, seria então muito mais vantajoso utilizar transplantes celulares autólogos, obtidos a partir de pequenas biopsias de tecido neural, em vez de transplantes de dadores (transplantes alogénicos) (7). Os transplantes autólogos evitam a necessidade de encontrar dadores compatíveis e terapias imunossupressoras, aumentando assim a possibilidade de recuperação (7, 9, 10, 11, 17). No entanto, a biopsia necessária para obter CEN é um método invasivo que implica

cirurgia e destruição de tecido nervoso, sendo assim, também um factor limitante para a sua aplicação clínica (10, 17).

Uma forma para aumentar capacidade proliferativa e o potencial neurogénico das CEN adultas poderá residir no facto de que, tal como as CEN fetais, as CEN adultas de ratinhos podem ser expandidas em meios aderentes contendo factores de crescimento, auto-multiplicando-se com pouca diferenciação e perda celular (14, 38). A dificuldade está em reproduzir com as células humanas os mesmos resultados obtidos com as células dos animais de laboratório (7, 14). Além disso, as células poderão sofrer alterações genéticas devido às excessivas amplificações para além do seu número normal de ciclos celulares, conseguido através da aplicação de grandes quantidades de factores de crescimento (15).

Outra técnica que visa o aumento da sua capacidade de divisão é recorrer à manipulação genética (15). Tal como as CEN fetais, as CEN adultas também são susceptíveis de manipulações genéticas, possibilitando a criação de linhagens celulares estáveis e imortais (12).

Entretanto, já foi realizado um transplante autólogo com CEN adultas. As células foram expandidas *in vitro* durante meses, diferenciadas em neurónios e transplantadas para o cérebro de um paciente com doença neurodegenerativa. Os testes funcionais, efectuados doze meses após o transplante, revelaram uma melhoria de 88% no desempenho motor. Porém, esse teste clínico nunca foi devidamente publicado (9).

Outro estudo clínico, efectuado em seis pacientes com lesão na espinal-medula, mostrou que o tratamento com um tipo particular de CEN do adulto, as CE do nervo olfactivo, pode ser um método fiável e seguro para o tratamento do SNC. Testes laboratoriais demonstraram que, as CE do nervo olfactivo do adulto promovem uma elevada regeneração dos axónios e a extracção destas células não produz lesão uma vez que, tal como as CE da pele, têm uma grande capacidade de divisão. Contudo, os resultados do teste clínico devem ser considerados como inconclusivos devido ao ainda pequeno número de pacientes envolvidos no estudo. Além disso, veio a verificar-se que as CE do

nervo olfactivo podem provocar um crescimento anormal dos axónios, tornando necessários mais estudos antes de se poder considerar a sua utilização clínica (11).

As CEN do embrião e do adulto podem ser muito semelhantes e a sua diferenciação parece ser regulada pelos mesmos factores de crescimento e citocinas (37). Assim, os novos conhecimentos que vão surgindo a partir do estudo das células do SNC em desenvolvimento, poderão ser aplicáveis às CEN do adulto e dessa forma ajudar a melhorar a sua utilização na medicina (7, 37).

O futuro das CEN adultas na terapia dependerá da melhoria da compreensão da neurogénese presente no SNC adulto (10, 17, 36). É necessário identificar, de uma forma mais concreta, qual a verdadeira identidade das CEN adultas, compreender melhor as suas funções, desenvolvimento e diferenciação, bem como os mecanismos envolvidos na regeneração e respectiva contribuição das CEN (9 - 11, 17). Este conhecimento poderá contribuir para o desenvolvimento de técnicas que permitam aumentar a capacidade de proliferação das CEN adultas e ainda utilizar esta fonte celular de uma forma mais eficaz na regeneração do SNC (7, 10, 36).

#### **5. 2. 4. Células Estaminais Não Neurais Adultas**

Vários estudos demonstraram que as CE não neurais do adulto podem ter capacidade pluripotente, representando uma fonte muito acessível de células para a terapia de reposição celular (7, 9, 10, 11). Podem ser facilmente obtidas a partir dos próprios pacientes e assim, possibilitar transplantes autólogos para tratamento de doenças neurodegenerativas (7, 9, 11). Outra vantagem é que, ao contrário dos transplantes com CEE, não parecem provocar carcinogénese (11). No entanto, ainda não se descobriu uma forma de condicionar a sua diferenciação no sentido de se obter células autênticas do SNC (7).

O transplante de progenitores neurais bem como de células neurais diferenciadas, geradas *in vitro* a partir de CE não neurais adultas, para o SNC lesado, mostrou que essas células migram para o local da lesão, diferenciam-se em células de glia e neurónios, e promovem recuperação funcional (9, 11). Verificou-se ainda que parece

existir uma janela temporal crucial para o tratamento - quando as células são transplantadas apenas sete dias após a lesão, promovem a recuperação funcional, contudo, quando são transplantadas dez meses após a lesão não há recuperação (11).

Embora possa haver diferenciação das CE não neurais adultas em neurónios, provavelmente não será esse o factor contribuinte principal para a recuperação funcional apresentada após o seu transplante para o SNC lesado, mas sim outros mecanismos que incluem a neuroprotecção, formação de um ambiente favorável à regeneração e expressão de factores de crescimento ou citoquinas (11).

Ainda que estas células possuam capacidade para adquirir algumas propriedades fenotípicas de neurónios e de células de glia quando transplantadas para o SNC de roedores, também retêm propriedades celulares dos tecidos de origem e poderão não funcionar como autênticos tipos celulares do SNC - condição que as poderá excluir para a aplicação nas terapias de reposição celular do SNC (7).

Antes que se possa considerar esta fonte celular nas terapias regenerativas do SNC, é necessário esclarecer as incertezas em relação ao seu potencial de diferenciação *in vivo* e mecanismos de acção pós transplante (9, 11). Contudo, enquanto isso não é possível, estas células poderão ser extremamente valiosas para a produção de biosondas autólogas facilitando a distribuição de factores neuroprotectores (7).

### **5. 2. 5. Células Estaminais Induzidas**

De forma a ultrapassar os problemas éticos e imunitários relacionados com a utilização de CEE e CEN fetais, foram feitas várias tentativas para reprogramar células somáticas adultas de forma a gerar CE pluripotentes sem o recurso a embriões ou a oócitos humanos (clonagem) (2, 9, 13, 16, 18, 47 - 49).

As primeiras células adultas alvo de reprogramação para obtenção de células semelhantes a CE foram os fibroblastos. Desde então já se conseguiu obter CEi a partir de vários outros tipos celulares do adulto (9, 47, 48).

Os fibroblastos embrionários e do adulto, tanto de ratos como de humanos, podem gerar células semelhantes a CEE através de um aumento na expressão de alguns factores de transcrição (Oct 3/4, Sox 2, Klf 4, c-Myc) (9, 13, 18, 47, 48, 50, 51). Contudo, ainda que as CEi a partir de fibroblastos apresentem várias propriedades de CEE, nomeadamente, formação de teratomas e capacidade de diferenciação em vários tipos celulares distintos, algumas características, tais como a expressão genética, são semelhantes mas não totalmente idênticas (9, 18, 48).

Quando se transplantou neurónios diferenciados a partir de fibroblastos para o SNC lesionado de ratos, quatro em cada cinco ratos transplantados apresentaram recuperação funcional, mas ao fim de algum tempo desenvolveram teratomas. No entanto, quando se eliminou, antes do transplante, as células que não se diferenciaram em neurónios permanecendo como CEi, os animais transplantados apresentaram uma recuperação funcional semelhante mas sem o desenvolvimento de teratomas (9).

As CEi apresentam várias vantagens para as terapias celulares na medida em que, possibilitam a utilização células autólogas para a terapia, a criação de modelos celulares das doenças e lesões do SNC e estudo de fármacos. Contudo, existem vários problemas a resolver antes de se poder considerar a sua utilização clínica (2, 9, 16, 18, 47 - 49). No geral, a eficácia em gerar CE a partir de fibroblastos adultos tem sido relativamente baixa (9). Os fibroblatos do período pós-natal ou do adulto têm uma capacidade de reprogramação muito baixa quando comparados aos fibroblastos fetais ou embrionários, sendo necessário melhorar a eficácia e qualidade do processo de indução e subsequente diferenciação (9, 48). Além disso, os protocolos actualmente existentes para a formação de CEi, envolvem manipulações genéticas que impedem a sua utilização na medicina (9, 18, 48, 49, 51). Tal como as CEE, as CEi apresentam um risco aumentado de formação de teratomas pós-transplante que necessita ser reduzido através da eliminação pré-transplante das células ainda indiferenciadas, permanecendo o risco de algumas de tais células (indiferenciadas) escaparem a esse processo (9, 18).

O desenvolvimento de técnicas de formação de CEi, com um recurso mínimo ou total ausência de manipulações genéticas, seria o ideal (48 - 50). Actualmente, já se encontra

em desenvolvimento técnicas de formação de CEi que tentam atingir esse objectivo (48 - 51).

Apesar do estudo das CEi se encontrar ainda numa fase inicial, esta parece ser uma das áreas de pesquisa das CE que mostra uma evolução mais rápida. Se for possível resolver os problemas que actualmente impossibilitam a sua utilização na terapia, esta fonte celular poderá, no futuro, superar a potencialidade das CEE e das CEN fetais, uma vez que são passíveis de se obter a partir de dadores vivos, constituindo assim uma fonte celular de grande utilidade para a medicina (13, 18, 47 - 51).

---

---

## **III. Conclusão**

---

---

O estudo das CE parece extremamente promissor na medida em que abre caminho a novas terapias na abordagem a doenças neurodegenerativas e traumatismos que afectam o SNC. De acordo com os diferentes aspectos mencionados ao longo deste trabalho de revisão foi possível concluir que, o desenvolvimento de uma terapia celular eficaz com recurso a CE tem ainda um longo percurso a desenvolver. Por outro lado, sendo este um campo de estudo bastante recente e em rápida evolução, acredita-se que a recuperação do SNC lesado através da aplicação das CE é uma hipótese bastante realista (7, 9, 11).

Dos diferentes tipos de CE pesquisadas para aplicação na terapia do SNC, as CEE são as que possuem maior capacidade de divisão e geram maior variabilidade de subtipos celulares (7, 9). Contudo, os efeitos adversos implicados na utilização destas células, tais como a formação de teratomas e a rejeição imunitária, tornam a sua utilização num futuro próximo, pouco provável. Adicionalmente, mesmo quando ultrapassados tais efeitos, a utilização de CEE apresenta ainda questões éticas passíveis de discussão (7, 9, 11, 15).

As CEN fetais, embora possuam menor capacidade de divisão e de diferenciação do que as CEE, apresentam a grande vantagem de não desenvolverem teratomas pós-transplante, tornando a sua utilização mais eficaz. Desta forma, as CEN fetais são as que, actualmente, apresentam maior possibilidade de aplicação como terapia celular para o SNC. Constituem por isso a fonte celular que mais se tem vindo a desenvolver, encontrando-se já na fase de testes clínicos (2, 7, 9).

De facto, os testes clínicos com transplantes de CEN fetais demonstraram que apesar de alguns pacientes obterem melhorias significativas, ao fim de um tempo variável as doenças voltaram a progredir. Suspeita-se que estes resultados não se tenham devido à ineficácia do tratamento, mas sim a factores como a selecção dos pacientes, quantidade e modo de transplantação de tecido, fase de desenvolvimento do tecido fetal e a terapia imunossupressora (9, 7). Porém, mesmo que muitos desses factores possam vir a ser esclarecidos e solucionados experimentalmente, a utilização de CEN fetais apresenta, tal como as CEE, questões éticas que podem impossibilitar a sua utilização (7, 9, 11, 13). Assim, a pesquisa de outras fontes celulares para transplante é de grande interesse para o desenvolvimento de terapias celulares eficazes, especialmente no que toca ao

desenvolvimento de terapias com células autólogas, de forma a eliminar problemas relacionados com a rejeição imunitária e terapias imunossupressoras que prejudicam a saúde do paciente (9, 11, 13, 47).

As CE adultas (neurais ou não neurais) e as CEi aparentam ser uma alternativa muito real à utilização das CEE e CEN fetais (2, 7, 9, 13, 15, 48). Além de resolverem os problemas éticos envolvidos na utilização de CEE e CEN fetais, também evitam a necessidade de encontrar dadores compatíveis e terapias imunossupressoras, utilizando células autólogas específicas, aumentando assim a possibilidade de recuperação (7, 9 - 11, 13, 16, 17).

A confirmação de que ocorre neurogênese no adulto e de que permanecem CEN no SNC durante toda a vida, veio criar uma nova esperança para o tratamento do SNC, possibilitando o acesso a células autólogas para aplicação clínica (1, 7, 9 - 11). É actualmente claro que pelo menos algumas CE do SNC podem gerar tanto neurónios quanto células de glia, mas permanece por esclarecer se os três tipos de células de glia (astrócitos, células de GR e os endimócitos) identificados como células com funções de CE, são realmente CEN, ou se pelo contrário, terá havido erro na identificação das células encontradas nas diferentes pesquisas (14, 15, 28, 29, 38).

A teoria de que serão células semelhantes a astrócitos parece ser, actualmente, a mais aceite entre a comunidade científica. Contudo, talvez não se trate de astrócitos ou células de GR, mas sim um tipo celular que ainda não está bem caracterizado, uma vez que apresenta características intermédias entre esses dois tipos celulares. De qualquer forma, é improvável que todos os astrócitos, endimócitos e GR sejam CEN, mas sim, apenas subpopulações destes grupos celulares (10, 28).

A compreensão de como os neurónios e células glia podem ser gerados pela mesma CE multipotente e de como células diferenciadas do SNC podem funcionar como CE, encontra-se ainda numa fase inicial (29). São necessários mais esforços de forma a identificar marcadores de superfície específicos para cada subtipo celular neural - condição crucial para que seja possível identificar, de uma forma mais concreta, a verdadeira identidade das CEN. Tal conhecimento poderá ainda revelar quais os

mecanismos que contribuem para a neurogênese e renovação das CEN, facilitando assim, a manipulação experimental da neurogênese e a sua utilização como terapia neural no futuro (15). Assim, compreende-se que os esforços para esclarecer qual a identidade das CE presentes no cérebro adulto e quais os mecanismos moleculares que levam à regeneração e à diferenciação dos diferentes tipos neurais a partir das CEN, são parte integrante do grande objectivo do estudo das CE, que é a reparação do SNC (10, 11, 15). Estes estudos são, pelo menos no presente, essenciais para desenvolver a produção dos subtipos neurais necessários para a terapia e também poderão possibilitar a indução da regeneração através de CEN endógenas (7, 10, 15). A dificuldade na utilização desta fonte celular está em conseguir células em número suficiente para um tratamento eficaz, sem os riscos de desenvolvimento de tumores relacionados com o seu transplante, devido a indução da sua divisão muito além da sua capacidade normal (7, 10, 17).

A utilização de outras fontes de CE adultas (não neurais) poderá resolver a dificuldade em obter células em quantidade suficiente para aplicação clínica, uma vez que podem ser extraídas de vários órgãos e tecidos do adulto (7, 9, 10, 11). E ao contrário das CEE, não parecem provocar carcinogênese (11). Contudo, ainda não se conseguiu a sua diferenciação em verdadeiros tipos celulares neurais. Para que seja possível a sua aplicação na terapia do SNC, é necessário que se encontre uma forma de ultrapassar este obstáculo (7).

Outra fonte celular bastante promissora para aplicação na terapia, relaciona-se com a utilização de CEi. As recentes evidências de que se pode induzir células adultas especializadas de forma a obterem características de CE, abriram uma nova possibilidade para solucionar os problemas relacionados com a necessidade de uma fonte celular autóloga, acessível e em quantidade considerável, para utilização na terapia. Porém, esta abordagem é a mais recente entre as diferentes fontes celulares pesquisadas para aplicação na terapia sendo, conseqüentemente, a que apresenta mais obstáculos ainda a ultrapassar (2, 9, 16, 18, 47, 48, 51).

Os resultados obtidos nas pesquisas com CE adultas e com as CEi, têm vindo a quebrar conceitos vigentes ao demonstrar que, uma célula adulta proveniente de um tecido

altamente diferenciado e com capacidade bastante limitada de proliferação, quando colocada num ambiente adequado, pode seguir um rumo de diferenciação bastante diverso, independentemente do seu tecido de origem. Esta possibilidade de se usar qualquer CE ou qualquer célula adulta especializada, para obter uma qualquer linhagem celular que se pretenda, é assim uma possibilidade extremamente atractiva. Elimina não só, as questões éticas que envolvem o uso de embriões e fetos humanos, mas também, a dificuldade em se obter células em número suficiente e ainda, os problemas de rejeição imunitária inerentes ao recurso a um dador, já que as células do próprio paciente podem ser usadas para regenerar os seus tecidos lesados (7, 9, 11, 13, 15, 16). Contudo, no que respeita a utilização de células autólogas, qualquer que seja a sua origem, é necessário assegurar que as células derivadas dos próprios pacientes não herdam a doença para a qual estão a ser utilizadas (9, 13).

Apesar de todos os obstáculos a ultrapassar para que as CE adultas (neurais e não neurais) e as CEi se tornem uma fonte celular segura para aplicação na terapia, este campo de estudo tem mostrado uma grande evolução, com muitas pesquisas em desenvolvimento de forma a permitir avaliar, mais concretamente, a sua potencialidade para a terapia e ainda, ultrapassar as várias dificuldades relacionadas com a sua utilização (7, 9, 13, 15, 16). Porém, enquanto esses objectivos não forem alcançados, as CEN fetais permanecem a fonte celular com maior potencial para as terapias de reposição celular do SNC (9).

À parte as questões relacionadas com o tipo celular ideal para aplicação na terapia, existem ainda vários obstáculos a ultrapassar na obtenção dos subtipos celulares necessários. Uma produção em larga escala de subtipos de células de glia e neurónios seria o ideal, facilitando significativamente as aplicações médicas (15). No entanto, ainda não foi possível desenvolver uma técnica de diferenciação eficaz de forma a obter maior número de diferentes subtipos neuronais e sobretudo, maior produção dos subtipos mais necessários para aplicação clínica (7, 10, 11, 15). Para isso, é necessário identificar marcadores de superfície específicos para os subtipos neurais, em fases de diferenciação específicas e determinar as condições de cultura que possam manter ao expandir progenitores de certos subtipos neuronais (15).

Para que se consiga desenvolver técnicas de diferenciação celular *in vitro* e *in vivo*, mais eficazes e seguras, sem o risco de desenvolvimento de cancro pós transplante e com maior produção dos subtipos neuronais mais necessários, poderá ser essencial compreender melhor os factores presentes no estroma e nas zonas germinativas que promovem a diferenciação e a proliferação dos precursores neurais. O sucesso da utilização terapêutica das CE, qualquer que seja a sua natureza, poderá depender desse conhecimento (10, 11, 28, 37).

Para alcançar estabilidade e funcionalidade a longo prazo é necessário ainda que, os neurónios transplantados tenham capacidade para encontrar os seus alvos e os reinervar de uma forma funcional - necessitam de reinervar os alvos correctos nos circuitos correctos. Este objectivo requer não só, que se consiga produzir os subtipos neurais correctos, mas também o desenvolvimento de uma técnica que possibilite guiar os neurónios transplantados de forma a promover ligações correctas e funcionais com as células alvo (7, 15). Porém, ainda se desconhece até que ponto, células que não são formadas em contacto com o ambiente de desenvolvimento de um embrião intacto, poderão ter capacidade para se adaptar ao ambiente desconhecido do SNC de forma a sobreviver e funcionar após o transplante, e ainda, se os alvos degenerados terão capacidade para serem reinervados pelos neurónios transplantados (15). A dificuldade no tratamento agrava-se mais ainda pelo facto de que, tudo isto tem que ser conseguido, muito provavelmente, numa zona não neurogénica do cérebro adulto e num ambiente patológico hostil, sendo portanto crucial assegurar que o transplante não sucumbe ao processo da doença. Compreende-se assim que, a esperança de uma terapia de reposição celular num futuro próximo poderá ser irrealista, pelo menos para a maioria das lesões e doenças neurodegenerativas do SNC (7, 15).

Entretanto, enquanto isso não é possível, o desenvolvimento de estratégias de protecção neural, tais como, o bloqueio das moléculas inibidoras do crescimento axonal e fornecimento de um suporte trófico adicional para os neurónios sobreviventes, parece ser uma hipótese mais realista para aplicação num futuro próximo. Alguns aspectos do comportamento das CE, tais como o fornecimento de um substrato favorável para a função neural e o fornecimento de factores neurotróficos de forma a limitar a destruição, poderão ter uma aplicação neste tipo de abordagem (7, 9, 11, 15). Estes métodos

poderiam, em princípio, aumentar a regeneração axonal e assim, possibilitar pelo menos alguma recuperação de forma a proporcionar aos pacientes melhor qualidade de vida (1, 7, 11).

Estratégias de protecção e regeneração neural associadas a uma reposição celular, também poderão tornar o tratamento mais eficaz. Para tal, será necessária mais uma vez, uma compreensão mais aprofundada dos factores que controlam a diferenciação, sobrevivência e maturação das CEN, no contexto de um cérebro hospedeiro em degeneração (7, 11).

Seja qual for o melhor caminho a seguir, existem ainda muitos obstáculos a ultrapassar. É necessário determinar os efeitos precisos do transplante de CE, bem como, aperfeiçoar os procedimentos para aplicação das CE na terapia neural, o que implica mais estudos até que seja possível a sua utilização de forma mais segura e viável para uma extensa aplicação no tratamento das doenças degenerativas e lesões do SNC (9, 11).

É de salientar que, apesar dos resultados obtidos nos diversos estudos com CE não se revelarem clinicamente úteis para o tratamento do SNC no presente, apoiam contudo a teoria de que será possível uma recuperação celular no SNC lesado (1, 2, 7, 9 - 12).

É ainda importante referir que, este é um tema em constante evolução, decorrendo novas investigações, sendo portanto necessário a sua sucessiva actualização de forma a manter um correcto conhecimento sobre o seu estado actual.

---

---

## **IV. Bibliografia**

---

---

- 1 - Purves, D. *et alii.* (2010). *Neurociências*. Porto Alegre, Artmed Editora.
- 2 - Ren, Z. e Zhang, Y. (2009). Cells therapy for Parkinson's disease - so close and so far away. *Science in China Series C-Life Sciences*, 52(7), pp. 610-614.
- 3 - Tom, V. *et alii.* (2009). Combining Peripheral Nerve Grafts and Chondroitinase Promotes Functional Axonal Regeneration in the Chronically Injured Spinal Cord. *The Journal of Neuroscience*, 29(47), pp. 14881-14890
- 4 - Karimi-Abdolrezaee, S. *et alii.* (2010). Synergistic Effects of Transplanted Adult Neural Stem/Progenitor Cells, Chondroitinase, and Growth Factors Promote Functional Repair and Plasticity of the Chronically Injured Spinal Cord. *The Journal of Neuroscience*, 30(5), pp. 1657-1676.
- 5 - Wang, Y. *et alii.* (2010). Aptamer Antagonists of Myelin-Derived Inhibitors Promote Axon Growth. *PLoS ONE*, 5(3), pp. 1-8.
- 6 - Ministério da Saúde. (2004). *Circular Normativa Nº: 13/DGCG - Programa Nacional para a Saúde das Pessoas Idosas*. Direcção-Geral da Saúde. [Em linha]. Disponível em <<http://www.portaldasaude.pt/NR/rdonlyres/1C6DFF0E-9E74-4DED-94A9-F7EA0B3760AA/0/i006346.pdf>>. [Consultado em 10/08/2010].
- 7 - Ormerod, B. Palmer, T. e Caldwell, M. (2008). Neurodegeneration and cell replacement. *Philosophical Transactions of Royal Society B*, 363, pp. 153-170.
- 8 - Instituto Nacional de Estatística. (2009). Projecções de população residente em Portugal 2008-2060. [Em linha]. Disponível em <<http://www.app.com.pt/wp-content/uploads/2009/11/ine.pdf>>. [Consultado em 07/05/2010].
- 9 - Wijeyekoon, R. e Barker, R. (2009). Cell replacement therapy for Parkinson's disease. *Biochimica et Biophysica Acta* 1792, pp. 688-702.

- 10 - Taupin, P. (2007). Adult neural stem cells: The promise of the future. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*, 3(6), pp. 753-760.
- 11 - Jain, K. (2009). Cell Therapy for CNS Trauma. *Mol Biotechnol*, 42, pp. 367-376.
- 12 - Lee, H. *et alii*. (2007). Brain transplantation of immortalized human neural stem cells promotes functional recovery in mouse intracerebral hemorrhage stroke model. *Stem Cells*, 25, pp. 1204-1212.
- 13 - Abeliovich, A. e Doege, C. (2009). Reprogramming Therapeutics – iPS Cell Prospects for Neurodegenerative Disease. *Neuron*, 61 (Fevereiro), pp. 337-339.
- 14 - Pollard, S. e Conti, L. (2007). Investigating radial glia in vitro. *Progress in Neurobiology*, 83, pp. 53-67.
- 15 - Zhang, S. *et alii*. (2008). Human embryonic stem cells for brain repair. *Philosophical Transactions of Royal Society B*, 363, pp. 87-99.
- 16 - Inoue, H. (2010). Neurodegenerative disease-specific induced pluripotent stem cell research. *Experimental Cell Research*, 316 (Outubro), pp. 2560-2564.
- 17 - Taupin, P. (2007). Potential of adult neural stem cells for cellular therapy. *Biologics: Targets & Therapy*, 1(1), pp. 53-58.
- 18 - Yamanaka, S. (2009). A Fresh Look at iPS Cells. *Cell*, 137(Abril), pp. 13-17.
- 19 - Junqueira, L. e Carneiro, J. (2008). *Histologia Básica*. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan.
- 20 - Carvalho, H. e Collares-Buzato, C. (2005). *Células: Uma Abordagem Multidisciplinar*. São Paulo, Editora Manole.

- 21 - Marieb, E. (2004). *Human Anatomy & Physiology*. São Francisco, Benjamin Cummings.
- 22 - Haines, D. (2006). *Neurociência fundamental: para aplicações básicas e clínicas*. Rio de Janeiro. Elsevier.
- 23 - Kierszenbaum, A. (2008). *Histologia e Biologia Celular: Uma introdução à patologia*. Rio de Janeiro, Elsevier.
- 24 - Joset, A. *et alii*. (2010). Pincher-generated Nogo-A endosomes mediate growth cone collapse and retrograde signaling. *The Journal of Cell Biology*, 188(2), pp. 271-285.
- 25 - Montani, L. *et alii*. (2009). Neuronal Nogo-A Modulates Growth Cone Motility via Rho-GTP/LIMK1/Cofilin in the Unlesioned Adult Nervous System. *The Journal of Biological Chemistry*, 284(16), pp. 10793-10807.
- 26 - Astudillo, B. (2009). Guias de Neuro - Estructura de los nervios. [Em linha]. Disponível em <<http://www.guiasdeneuro.com.ar/estructura-de-los-nervios/>>. [Consultado em 14/08/2010].
- 27 - Astudillo, B. (2008). Guias de Neuro - La Neuroglia. [Em linha]. Disponível em <<http://www.guiasdeneuro.com.ar/la-neuroglia/>>. [Consultado em 14/08/2010].
- 28 - Bonfantini, L. e Peretto, P. (2007). Radial glial origin of the adult neural stem cells in the subventricular zone. *Progress in Neurobiology*, 83, pp. 24-36.
- 29 - Barres, B. (2004). A New Role for Glia Generation of Neurons. [Em linha]. Disponível em <[http://www.sciencedirect.com/science?\\_ob=ArticleURL&\\_udi=B6WSN-4CR9BR4-M&\\_user=10&\\_rdoc=1&\\_fmt=&\\_orig=search&\\_sort=d&view=c&\\_version=1&\\_urlVersion=0&\\_userid=10&md5=0291986e05958d85d8d54e936d0ac982](http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6WSN-4CR9BR4-M&_user=10&_rdoc=1&_fmt=&_orig=search&_sort=d&view=c&_version=1&_urlVersion=0&_userid=10&md5=0291986e05958d85d8d54e936d0ac982)>. [Consultado em 06/09/2008].

- 30 - Martins, M. (2006). Junções comunicantes e migração celular em explantes de zona subventricular pós-natal de roedores. [Em linha]. Disponível em <[http://www.led.letras.ufrj.br/pdfs/TeseDoutMoniFinal221106%20\(2\).pdf](http://www.led.letras.ufrj.br/pdfs/TeseDoutMoniFinal221106%20(2).pdf)>. [Consultado em 07/04/2009].
- 31 - Sadler, T. (2010). *Langman: Embriologia Médica*. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan.
- 32 - Squire, L. *et alii*. (2008). *Fundamental Neuroscience*. Londres, Academic Press.
- 33 - Okano, H. e Temple, S. (2009). Cells types to order: temporal specification of CNS stem cells. *Current Opinion in Neurobiology*, 19, pp. 112-119.
- 34 - Pinto, L. e Götz, M. (2007). Radial glia cell heterogeneity - The source of diverse progeny in the CNS. *Progress in Neurobiology*, 83, pp. 2-23.
- 35 - Tojima, T. (2008). The Mechanism That Controls the Direction of Axon Elogation. [Em linha]. Disponível em <<http://www.brain.riken.jp/bsi-news/bsinews38/no38/research1e.html>>. [Consultado em 14/08/2010].
- 36 - Galven, V. e Jin, K. (2007). Neurogenesis in the aging brain. *Clinical Interventions in Aging*, 2(4), pp. 605-610.
- 37 - Frisén, J. *et alii*. (1999). Identification of neural stem cell in adult mammalian central nervous system. *Cell*, 96 (Janeiro), pp. 25-34.
- 38 - Riquelme, P. Drapeau, E. e Doetsch, F. (2008). Brain micro-ecologies: neural stem cells niches in the adult mammalian brain. *Philosophical Transactions of Royal Society B*, 363, pp. 123-137.

- 39 - Alvarez-Buylla, A. *et alii.* (2001). Astrocytes Give Rise to New Neurons in the Adult Mammalian Hippocampus. *The Journal of Neuroscience*, 21(18), pp. 7153-7160.
- 40 - Alvarez-Buylla, A. *et alii.* (2008). The Heterogeneity of Adult Neural Stem Cells and the Emerging Complexity of Their Niche. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 73, pp. 357-365.
- 41 - Tortora, G. e Derrickson, B. (2011). *Tortora - Principles of Anatomy and Physiology*. New York, Wiley.
- 42 - Bradbury, E. e Carter, L. (2010). Manipulating the glial scar: Chondroitinase ABC as a therapy for spinal cord injury. [Em linha]. Disponível em <[www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20620201](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20620201)>. [Consultado em 06/08/2010].
- 43 - Schwab, M. (2004). Nogo and axon regeneration. [Em linha]. Disponível em <[http://www.sciencedirect.com/science?\\_ob=ArticleURL&\\_udi=B6VS3-4BH6J9V-1&\\_user=10&\\_rdoc=1&\\_fmt=&\\_orig=search&\\_sort=d&view=c&\\_acct=C000050221&\\_version=1&\\_urlVersion=0&\\_userid=10&md5=ca32232905f9835aa5a53786158819d7](http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6VS3-4BH6J9V-1&_user=10&_rdoc=1&_fmt=&_orig=search&_sort=d&view=c&_acct=C000050221&_version=1&_urlVersion=0&_userid=10&md5=ca32232905f9835aa5a53786158819d7)>. [Consultado em 17/02/2009].
- 44 - Ramer, M. *et alii.* (2001). Two-Tiered Inhibition of Axon Regeneration at the Dorsal Root Entry Zone. *The Journal of Neuroscience*, 21(8), pp. 2651-2660.
- 45 - Rhodes, K. Moon, L. e Fawcett, J. (2003). Inhibiting cell proliferation during formation of the glial scar: effects on axon regeneration in the CNS. *Neuroscience*, 120 (Agosto), pp. 41-56.
- 46 - Huber, A. e Schwab, M. (2000). Nogo-A, a potent inhibitor of neurite outgrowth and regeneration. *Biol Chem*, 381(5-6), pp. 407-19.

- 47 - Tokumoto, Y. *et alii.* (2010). Comparison of efficiency of terminal differentiation of oligodendrocytes from induced pluripotent stem cells versus embryonic stem cells in vitro. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 109(6), pp. 622-628.
- 48 - Colman, A. (2008). Induced Pluripotent Stem Cells and Human Disease. *Cell Stem Cell*, 3 (Setembro), pp. 236-237.
- 49 - O'Malley, J. Woltjen, K. e Kaji, K. (2009). New strategies to generate induced pluripotent stem cells. *Current Opinion in Biotechnology*, 20, pp. 516-521.
- 50 - Amabile, G. e Meissner, A. (2009). Induced pluripotent stem cells - current progress and potential for regenerative medicine. *Trends in Molecular Medicine*, 15(2), pp. 59-68.
- 51 - Soldner, F. *et alii.* (2009). Parkinson's Disease Patient-Derived Induced Pluripotent Stem Cells Free of Viral Reprogramming Factors. *Cell*, 136 (Março), pp. 964-977.