

Liliana dos Santos Tavares Correia

CÉLULAS ESTAMINAIS PLURIPOTENTES INDUZIDAS NO ESTUDO DE MECANISMOS DE DOENÇA E AVALIAÇÃO DE NOVAS TERAPIAS

Dissertação de Mestrado em Biotecnologia Farmacêutica, orientada pelo Professor Doutor Luís Pereira de Almeida e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Setembro 2013



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

PREFÁCIO

Esta monografia foi realizada no âmbito do Mestrado em Biotecnologia Farmacêutica, na Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, sob a orientação do Professor Doutor Luís Pereira de Almeida.

Esta monografia foi escrita de acordo com o antigo acordo ortográfico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos os que contribuíram para a realização desta monografia, que dedico aos meus pais, marido, irmãos, sobrinhos e amigos pela força, companheirismo e ternura em todos os momentos.

Agradeço ao Professor Doutor Luís Pereira de Almeida pela orientação, esclarecimento de dúvidas, disponibilidade e apoio.

Agradeço à Dr.^a Isabel Onofre pela ajuda, esclarecimento de dúvidas, disponibilidade e apoio.

Agradeço à minha amiga Ana pela força, dedicação e amizade.

Agradeço ao Raúl, pela paciência, ternura e presença em todos os momentos.

A todos, os meus sinceros agradecimentos.

RESUMO

A obtenção de células estaminais pluripotentes induzidas (piscas) a partir da reprogramação directa de células somáticas foi um dos avanços mais importantes da biologia, nos últimos anos.

As iPSCs são células somáticas que foram reprogramadas para um estado de pluripotência através da introdução de um conjunto de factores específicos. Podem ser obtidas a partir de diferentes tipos de células, como os fibroblastos, queratinócitos, hepatócitos e células do sangue. As iPSCs são similares às células estaminais embrionárias, quer na morfologia e na expressão de marcadores de pluripotência, como também na capacidade de desenvolver teratomas. Como células estaminais pluripotentes podem diferenciar-se em todas as linhagens celulares, incluindo neurónios, células do sangue e células cardíacas.

O progresso da investigação no domínio das iPSCs veio demonstrar o seu enorme potencial e adquiriu uma considerável relevância científica, social e económica por contribuir para o conhecimento dos processos do desenvolvimento dos organismos vivos e os mecanismos de regeneração, e potencialmente vir a permitir transplante celular, a descoberta de novos fármacos, a identificação dos mecanismos de doenças e seu tratamento.

Apesar dos imensos problemas técnicos que ainda têm que ser ultrapassados, nomeadamente no que diz respeito à segurança e eficácia destas células, espera-se que a sua utilização venha a trazer benefícios inimagináveis, em medicina humana.

Nesta dissertação faz-se uma revisão da literatura sobre os diferentes tipos de células estaminais e as suas características específicas, focando-se nas células estaminais pluripotentes induzidas.

ABSTRACT

Obtaining induced pluripotent stem cells (iPSCs) from direct reprogramming of somatic cells is one of the most important biology advances in recent years.

The iPSCs are somatic cells that have been reprogrammed to a pluripotent state by introducing a number of specific factors. These cells can be obtained from different types of cells, such as fibroblasts, keratinocytes, hepatocytes and blood cells. iPSCs are similar to embryonic stem cells, both in morphology and expression of pluripotency markers, but also on the ability to develop teratomas. As pluripotent stem cells, they can differentiate into all cell lines, including neurons, blood and heart cells.

The progress of iPSCs research has demonstrated its enormous potential and has acquired considerable scientific, social and economic relevance, by contributing to the increase of knowledge about living organisms development processes, improving regeneration mechanisms, organ transplantation and gene therapy, discovering new drugs, identifying the mechanisms of emergency and development of diseases and finding new treatments.

Despite the huge technical problems that have yet to be overcome, particularly regarding safety and efficacy, it is expected that the use of these cells will bring unimaginable benefits to human medicine.

In this sense, this dissertation is intended to review literature on the different types of stem cells and their specific characteristics, focusing on pluripotent stem cells.

ÍNDICE

1. Introdução	10
1.1. Células estaminais	10
1.2. Origem e fonte das células estaminais	10
1.3. Células estaminais embrionárias versus adultas	14
1.4. Questões éticas	14
2. Reprogramação	16
2.1. Reprogramação nuclear	16
2.2. Células estaminais pluripotentes induzidas	19
2.2.1. Origem das iPSCs e plasticidade	20
2.2.2. Metodologia	21
2.3. Aplicações das iPSCs	24
2.3.1. Modelos de doença	24
2.3.2. Screening de fármacos	29
2.3.2.1. Recrutamento de doentes	31
2.3.2.2. Derivação e expansão das iPSCs	31
2.3.2.3. Diferenciação direccionada	32
2.3.3. Terapia celular	33
3. Portugal e as iPSCs	35
4. Perspectivas futuras	36
5. Conclusão	38
6. Bibliografia	39

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Propriedades das células estaminais	10
Figura 2: Características das células estaminais embrionárias	12
Figura 3: Origem dos diferentes tipos de células estaminais	13
Figura 4: Reprogramação realizada por Gurdon	16
Figura 5: Principais avanços científicos que conduziram à obtenção das iPSCs	17
Figura 6: Métodos de reprogramação de células somáticas	18
Figura 7: Representação esquemática da reprogramação e diferenciação de iPSCs	22
Figura 8: Diagrama esquemático mostrando a formação das iPSCs e as suas aplicações	24
Figura 9: Modelação de doenças neurológicas usando a tecnologia das iPSCs	30
Figura 10: Modelo integrado para a descoberta e desenvolvimento de novos fármacos baseado na tecnologia das iPSCs	31
Figura 11: Aplicação das iPSCs	34

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Vectores virais e não virais usados na obtenção iPSCs	23
Tabela 2: Sumário dos modelos de doença publicados recorrendo à tecnologia das iPSCs	27

LISTA DE ABREVIÇÕES

A β – peptídeo β amiloide

CE – células estaminais

EpiSC – células estaminais do epiblasto (epiblast stem cells)

ESC – células estaminais embrionárias (embryonic stem cells)

hESC – células estaminais embrionárias humanas (human embryonic stem cells)

hiPSC – células estaminais pluripotentes induzidas humanas (human induced pluripotent stem cells)

iPSCs – células estaminais pluripotentes induzidas (induced pluripotent stem cells)

LRRK2 – leucine-rich repeat kinase 2

PINK1 – PTEN-induced putative kinase I

PSC – células estaminais pluripotentes (pluripotent stem cells)

SCNT – somatic cell nuclear transfer

I. INTRODUÇÃO

I.1. CÉLULAS ESTAMINAIS

As células estaminais definem-se pela sua capacidade de se auto-renovarem indefinidamente num estado indiferenciado e possibilidade de se diferenciarem num ou mais tipos de células especializadas (Figura 1).

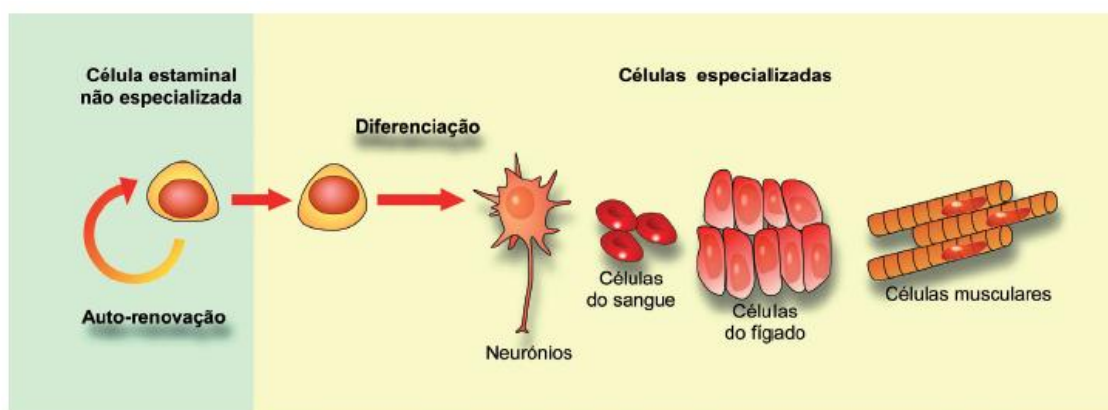


Figura 1: Propriedades das Células Estaminais.

As células estaminais são capazes de se auto-renovar indefinidamente e de se diferenciar num ou vários tipos de células especializadas. Retirado de Bragança et al., 2010.

I.2. ORIGEM E FONTE DAS CÉLULAS ESTAMINAIS

Durante a embriogénese, observa-se uma diminuição gradual do potencial de diferenciação das células constituintes do embrião.

Quando o ócito (contendo 23 cromossomas de origem materna) é fecundado pelo espermatozoide (contendo 23 cromossomas de origem paterna), forma-se uma célula cujo núcleo contém 23 pares de cromossomas. Esta célula sofre repetidas divisões formando um embrião, que vai implantar-se no útero e desenvolver-se até formar um feto e, finalmente, um adulto.

O ócito fecundado e os blastómeros são as únicas células totipotentes, isto é, que têm a capacidade de originar todas as células diferenciadas do organismo adulto. Depois de alguns ciclos de divisão celular, estas células totipotentes formam uma estrutura oca, o blastocisto, composto por uma parede de células externas (trofoblasto) que forma uma

cavidade (blastocélio) e que encerra, num dos pólos, um agregado de células denominado botão embrionário ou massa celular interna. Nesta fase, as células começam a especializar-se e a perder o potencial de se diferenciarem em todas as linhagens do organismo adulto.

As células do trofoblasto dão origem aos tecidos extra-embrionários, tal como a placenta, o córion e o saco amniótico, e as células do botão embrionário vão dar origem ao epiblasto, precursor do embrião propriamente dito, e que é a origem das três camadas germinativas do embrião (ectoderme, mesoderme e endoderme), das quais derivam todos os tecidos e órgãos. As células do botão embrionário são pluripotentes e após implantação geram as células embrionárias (ES), com capacidade para formar todos os 220 tipos de células que constituem um organismo adulto (Figura 2), menos a placenta e tecidos extra-embrionários (Bragança et al., 2010).

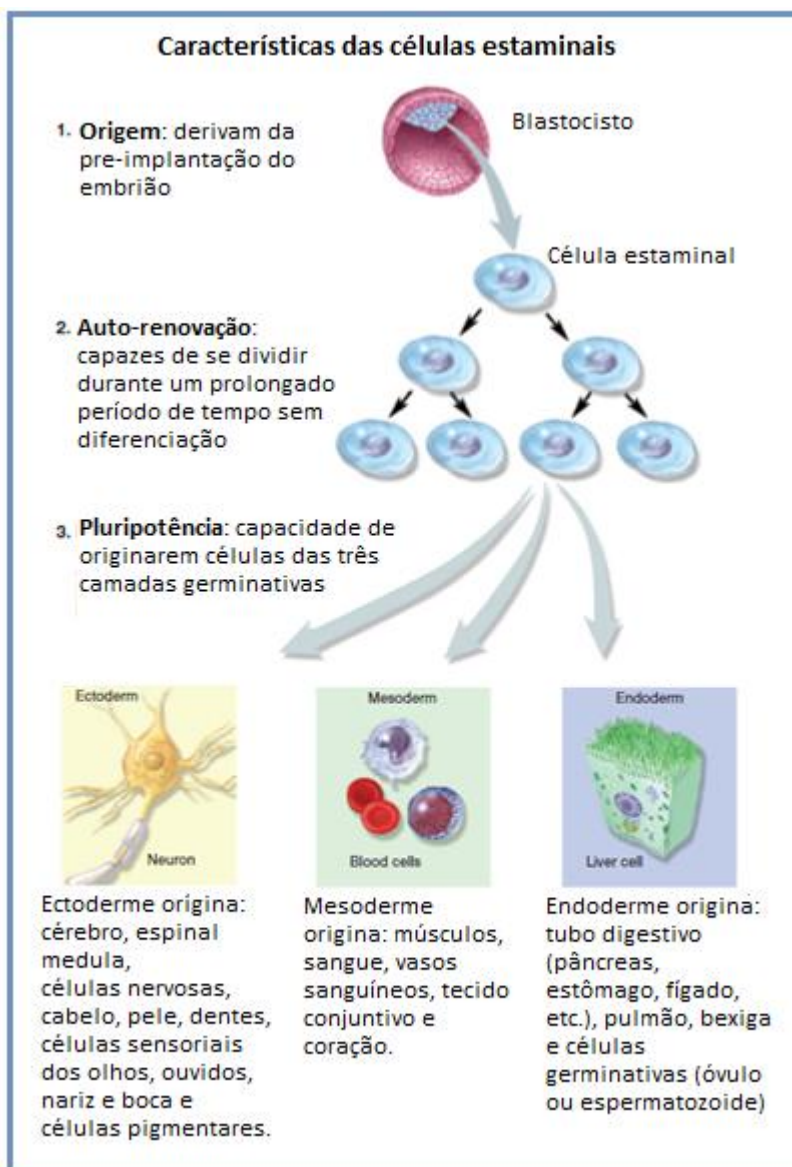


Figura 2: Características das células estaminais embrionárias.

As ES têm origem embrionária e são isoladas a partir da massa interna de blastócitos pré-implantados. Têm um potencial de diferenciação quase ilimitado, podendo originar quase todos os tipos celulares, salvo algumas exceções, não podendo, por exemplo, originar células da placenta, e são consideradas células estaminais pluripotentes. Retirado de Regenerative Medicine, 2006.

Logo a seguir à implantação do blastocisto no útero, podem-se derivar células estaminais pluripotentes a partir do epiblasto (Figura 3), que se chamam células estaminais do epiblasto (*Epiblast stem cells* ou EpiSC) (Tesar et al., 2007).

Nos tecidos e órgãos adultos existem células estaminais designadas de células estaminais adultas. Estas células possuem as mesmas características básicas de todas as células estaminais, como a capacidade de se auto-renovarem e de se diferenciarem em alguns

tipos de células específicas dos tecidos ou órgãos onde estão localizadas (Lerou et al., 2005) (Figura 3).

A principal função das células estaminais adultas é a manutenção e reparação dos tecidos específicos e órgãos onde se encontram. Elas constituem um repositório celular usado na renovação e reparação dos vários tecidos, contribuindo para a sua homeostase. O seu potencial de diferenciação é, intrinsecamente, mais reduzido, comparativamente às células estaminais embrionárias (Leeper et al., 2010).

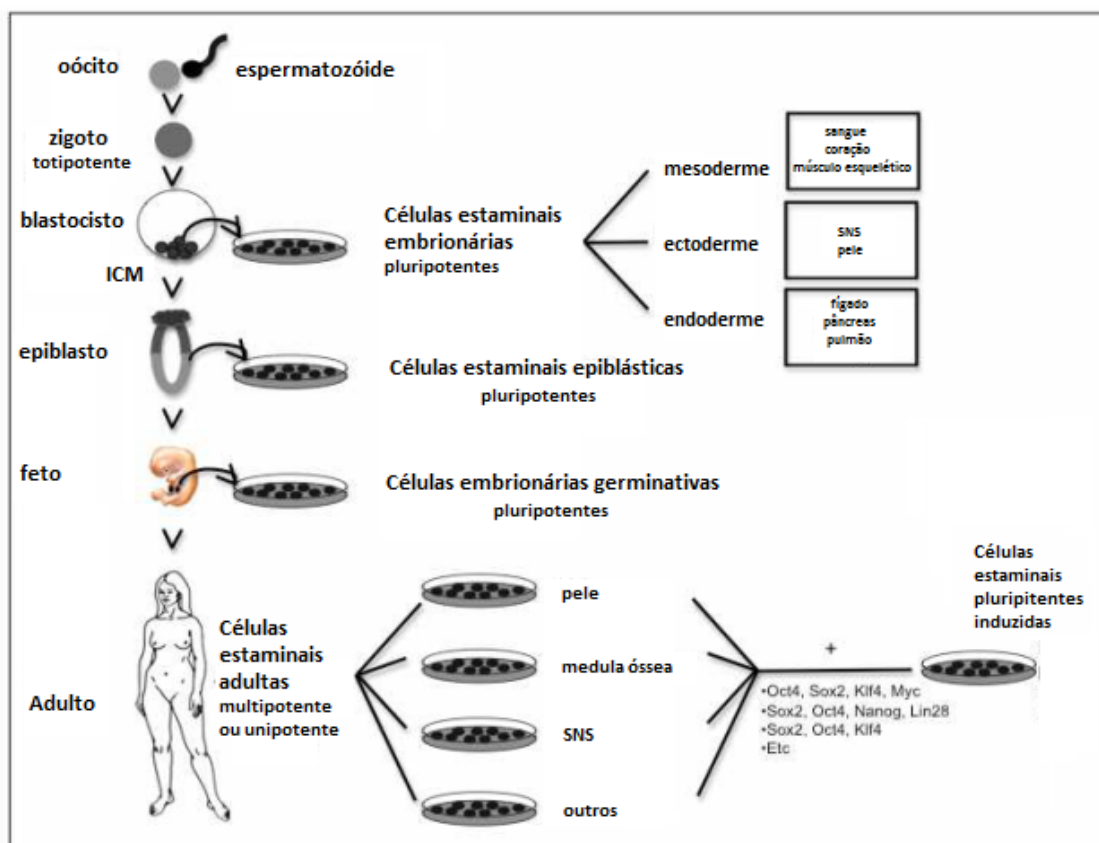


Figura 3: Origem dos diferentes tipos de células estaminais.

As células da massa celular interna ou botão embrionário do blastocisto pré-implantado podem ser isoladas e cultivadas *in vitro*, e assim dar origem a células ES capazes de se auto-renovar. Estas células são pluripotentes, ou seja apresentam um potencial elevado de diferenciação, originando todos os tipos celulares de um organismo adulto. As EpiSC têm uma capacidade restrita de diferenciação em comparação com as células ES, mas ainda são pluripotentes e podem dar origem a células das três camadas germinativas (ectoderme, mesoderme e endoderme) e a células derivadas dessas camadas. Muitos tecidos dos organismos adultos contêm células estaminais adultas que servem para recuperar as células perdidas por morte celular normal do tecido ou para reparar o tecido danificado após uma doença ou lesão. As células estaminais somáticas têm menor plasticidade em comparação com as células ES ou EpiSC, e são apenas multipotentes (ou por vezes unipotentes). As células estaminais dos tecidos fetais (neuronaes, sangue do cordão umbilical ou líquido

amniótico, por exemplo) têm propriedades intermédias entre as células estaminais embrionárias e adultas em termos de potência. Retirado de Genesia et al., 2011.

1.3. CÉLULAS ESTAMINAIS EMBRIONÁRIAS VERSUS ADULTAS

Apesar das células estaminais embrionárias se apresentarem, aparentemente, como uma solução mais vantajosa, dado a sua pluripotência natural, capacidade proliferativa e ao facto de, teoricamente, possuírem uma gama de aplicações mais extensa do que as células estaminais adultas, a sua enorme plasticidade e capacidade proliferativa são propensas à formação de tumores no local alvo ou periféricamente sob a forma de metástases, quando usadas em transplantes. O uso das células estaminais embrionárias é também limitado pelas dificuldades técnicas em conduzir a sua diferenciação para o tipo celular pretendido (Martin et al., 1981). Para além de serem menos propensas à formação de tumores, as células estaminais adultas estão programadas para originar células-filhas, o que permite regenerações ou integrações mais eficazes. No entanto, apresentam também algumas desvantagens, como a: menor capacidade de proliferação comparativamente com as células estaminais embrionárias e difícil identificação e isolamento, uma vez que existem em pequenas populações celulares no seio dos tecidos e órgãos de interesse (Martin et al., 1981).

1.4. QUESTÕES ÉTICAS

As células estaminais, pelas propriedades que apresentam, podem ser úteis como fonte de células ou de tecidos para terapias regenerativas, terapia génica, descoberta de novos fármacos e identificação dos mecanismos de doenças.

A aplicação das células estaminais para tratar as doenças humanas só poderá ser concretizada depois de serem compreendidos um conjunto complexo de mecanismos biológicos e dos procedimentos técnicos serem melhorados. É importante isolar as células estaminais e mantê-las em cultura num estádio biomolecular indiferenciado, para que possam ser submetidas a manipulações laboratoriais de modo a induzir a sua diferenciação no tipo celular pretendido e, futuramente a sua introdução nas regiões lesadas para que aí possam regenerar os tecidos danificados (Brivanlou et al., 2003). Depois de concretizar este

objectivo, poder-se-á substituir as zonas lesadas de um determinado órgão-alvo, para que possa retomar o funcionamento normal e permanente, mas não deve ser ignorada a possibilidade de se desenvolverem doenças secundárias, por exemplo, tumores a partir das células inoculadas.

Admite-se que a utilização de CE para regenerar tecidos poderá ainda diminuir as dificuldades em obter órgãos dadores em número suficiente para as necessidades actuais e futuras de transplantação de órgãos, o que constitui um relevante problema de saúde pública.

No entanto, surgem questões éticas e morais que estão relacionadas com a origem das células estaminais, principalmente quando implica a destruição de embriões. Isto tem levado os investigadores a desenvolverem métodos alternativos que permitam obter células estaminais para a derivação de linhas celulares, mediante procedimentos técnicos que não impliquem a morte do embrião: biopsia da MCI com colheita de um blastómero, construção de estruturas similares a embriões, colheitas de células ainda vivas em embriões em que ocorreu morte natural, entre outros.

Estas dificuldades podem ainda ser ultrapassadas, induzindo o estado de pluripotência em células somáticas, através da reprogramação directa (Takahashi e Yamanaka, 2006).

2. REPROGRAMAÇÃO

2.1. REPROGRAMAÇÃO NUCLEAR

Em 1962, John Gurdon conseguiu obter com sucesso rãs clonadas através da transferência do núcleo de células somáticas para oócitos (Gurdon, 1962) (Figura 4).

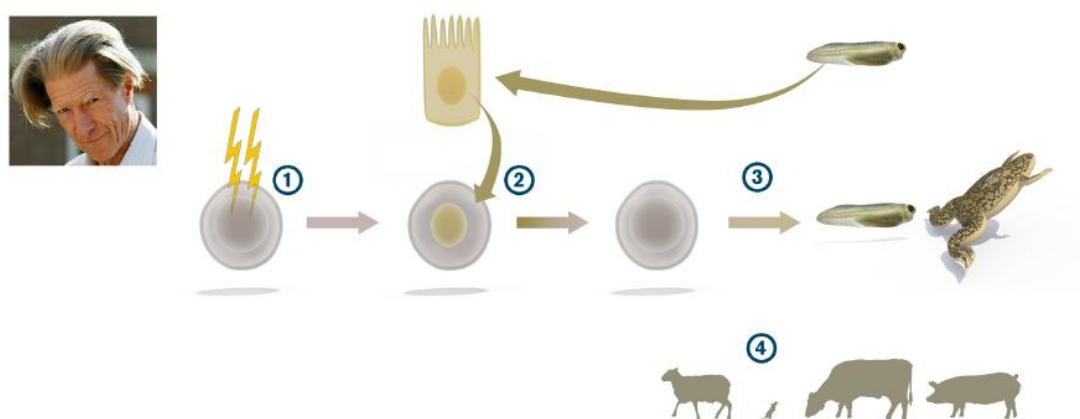


Figura 4: Reprogramação realizada por Gurdon.

O investigador Gurdon usou luz ultravioleta para destruir o núcleo do oócito de uma rã (1) e transferiu o núcleo de uma célula epitelial diferenciada para o oócito enucleado (2). Foram obtidas rãs clonadas (3). Este estudo demonstrou que a informação genética necessária para obter as células diferenciadas das rãs permanece intacta no núcleo da célulaadora. Estudos realizados mais tarde demonstraram ser possível clonar mamíferos recorrendo a esta técnica (4). Retirado de Scientific Background “Mature cells can be reprogrammed to become pluripotent”, 2012.

O investigador Gurdon transferiu o núcleo de células epiteliais intestinais diferenciadas para oócitos, aos quais tinha destruído o núcleo por incidência de radiações ultravioleta, e conseguiu originar rãs clonadas (Figura 5A). Este notável estudo demonstrou a possibilidade das células epiteliais intestinais serem reprogramadas e passarem novamente para um estado de pluripotência (Takahashi and Yamanaka, 2013).

Outra descoberta notável foi realizada por Davis, em 1987, demonstrando a conversão directa de células noutras de fenótipo diferente, através de factores de transcrição definidos (Davis et al., 1987) (Figura 5B).

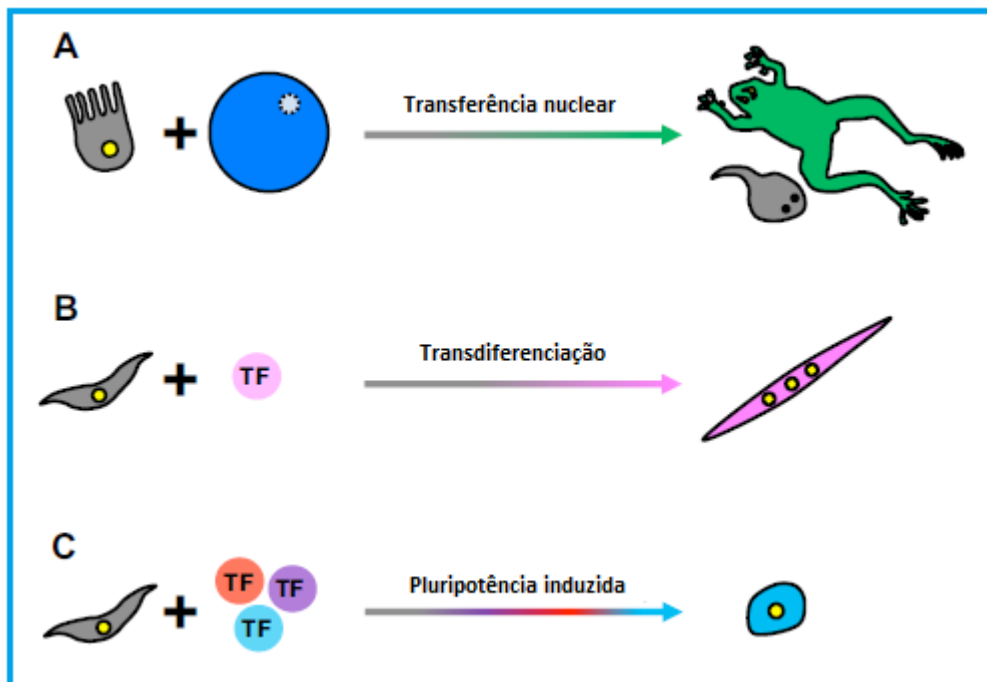


Figura 5: Principais avanços científicos que conduziram à obtenção das iPSCs.

- (A) Reprogramação mediada por oócitos. A memória do núcleo da célula somática pode ser apagada quando incorporado num oócito sem núcleo. A criação de rãs clonadas por transferência nuclear ocorreu em 1962.
- (B) Transcrição induzida por factores de conversão (Davis et al., 1987).
- (C) Indução de pluripotência através de factores definidos. A combinação dos conceitos adquiridos durante a reprogramação mediada por oócitos e a transcrição induzida por factores conduziu à descoberta da tecnologia das iPSCs.

Adaptado de Takahashi and Yamanaka, 2013.

Em 1997, com o nascimento do primeiro clone mamífero, a ovelha Dolly, provou-se ser possível alterar o estado epigenético de um núcleo diferenciado pela sua integração num oócito enucleado, sendo esta célula híbrida uma célula totipotente que contém o genoma da célula diferenciada original (Wilmut et al, 1997). A técnica utilizada por este grupo de investigação foi a transferência do núcleo somático (SCNT).

A reprogramação nuclear veio assim demonstrar que o núcleo das células somáticas, não só contém toda a informação genética necessária para a geração de um organismo, como também podem ser rejuvenescidas, por manipulação artificial, para adquirir novamente pluripotência. Durante a embriogénese, as células somáticas, uma vez diferenciadas, muito dificilmente mudam de um estado de diferenciação para outro. No entanto, o estado de diferenciação das células somáticas pode ser experimentalmente revertido através da reprogramação nuclear (Gurdon and Melton, 2008).

A reprogramação nuclear pode ser definida como o processo que permite que o estado de diferenciação de uma célula possa ser mudado para outro e apresenta-se como uma técnica de interesse por três razões:

1. uma vez identificada a reprogramação, poderá compreender-se como a diferenciação celular e a expressão de genes especializados são mantidos;
2. poderá vir a ser útil na terapia de regeneração, onde as células e tecidos defeituosos serão substituídos por outros normais;
3. espera-se que possa permitir estudar a natureza das doenças e descobrir novos fármacos.

Através da reprogramação nuclear as células têm a capacidade de dar origem a um tipo celular para o qual não estavam inicialmente programadas (Gurdon et al., 2013).

A reprogramação de células somáticas pode ser induzida por diferentes métodos, sendo eles: transferência nuclear de células somáticas (SCNT: somatic cell nuclear transfer), fusão celular e, mais recentemente, a utilização de factores de transcrição específicos (Figura 6) (Gurdon et al., 2013).

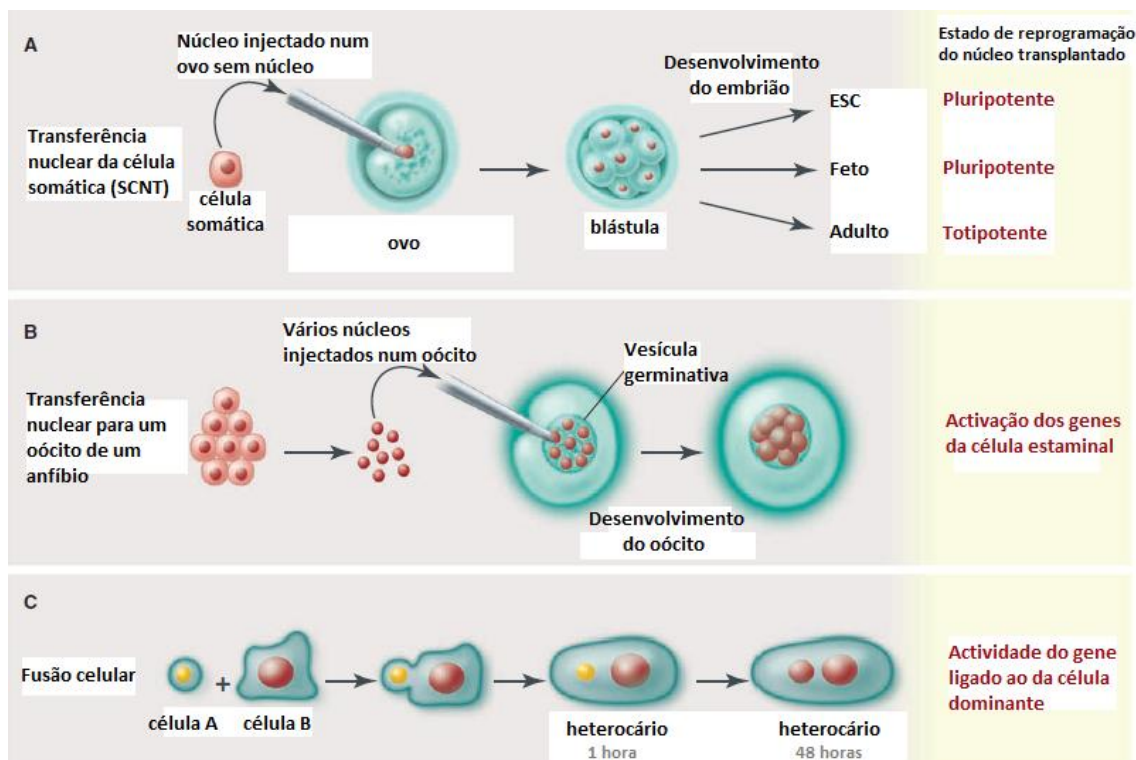


Figura 6: Métodos de reprogramação de células somáticas.

(A) e (B) Transferência nuclear das células somática (SCNT). (C) Fusão celular. Retirado de Gurdon et al, 2008.

Antes desta descoberta, a diferenciação considerava-se ser unidirecional e irreversível, partindo de um estado imaturo (progenitor ou célula estaminal) para um estado diferenciado. Pensava-se ser impossível recuperar o estado de auto-renovação ilimitada e pluripotência, que caracteriza as células estaminais. Estas experiências vieram mudar o entendimento da plasticidade celular ao abalar um dogma da Biologia postulado por Weissmann, em 1893 (Weissman, 1893) (Luís Almeida, 2011).

A transferência nuclear e a reprogramação directa (ou transdiferenciação) contribuíram para a descoberta da pluripotência induzida (Figura 5C). Tal como acontece na transferência nuclear, também na obtenção das iPSCs é alcançado o estado de pluripotência e as iPSCs obtidas são semelhantes às células estaminais embrionárias (ESCs). A tecnologia das iPSCs foi descoberta partindo da reprogramação directa através da expressão forçada de factores de transcrição específicos (Takahashi and Yamanaka, 2006).

2.2. CÉLULAS ESTAMINAIS PLURIPOTENTES INDUZIDAS

Todas as células que existem no organismo, somáticas e germinativas, são originadas a partir das células pluripotentes do embrião (Yamanaka et al, 2013). Esta capacidade da célula estaminal embrionária dar origem a todas as células do embrião e do adulto designa-se de pluripotência.

A reprogramação das células somáticas permitiu obter células pluripotentes semelhantes a células estaminais embrionárias, foi um dos progressos mais importantes no campo da biologia celular, na última década, e promete avanços significativos na terapia celular e medicina regenerativa.

Em 2006, o grupo japonês liderado por Shynia Yamanaka descobriu uma combinação de quatro factores de transcrição (Oct4, Sox2, Klf4 and cMyc) que, quando introduzidos em fibroblastos de murganhos adultos por retrovírus, induzem a reprogramação das células somáticas para um estado de pluripotência, semelhante a células estaminais embrionárias (Takahashi e Yamanaka, 2006). Estas células foram designadas de células estaminais pluripotentes induzidas ou iPSCs.

As iPSCs são similares às ESCs: crescem como colónias, expressam marcadores de superfície e nucleares de pluripotência (TRA-1-60, TRA-1-80, SSEA-3, SSEA-4, Oct4, Sox2 e Nanog) e formam teratomas, por injeção em tecidos de animais imunocomprometidos,

mostrando o seu potencial de diferenciação nas três camadas germinativas embrionárias: endoderme, mesoderme e ectoderme.

Após esta primeira reprogramação, outros grupos usaram, com sucesso, os mesmos factores, ou outras combinações, para reprogramar uma grande variedade de células somáticas de murganho ou humanas.

Em 2007, Takahashi et al. e Yu et al. geraram as primeiras iPSCs humanas a partir de fibroblastos, usando factores de transcrição diferentes. Os primeiros usaram novamente Oct4, Sox2, Klf4 e cMyc, enquanto que os segundos usaram Oct4, Sox2, Nanog e LIN28. A caracterização destas iPSCs mostrou, mais uma vez, que se comportam como células estaminais embrionárias.

2.2.1. ORIGEM DAS iPSCs E PLASTICIDADE

As iPSCs não se formam apenas a partir de fibroblastos. Diferentes grupos de investigação geraram iPSCs a partir de outras células somáticas, demonstrando a possibilidade de reprogramar células de diferentes origens.

Apesar das iPSCs poderem ser obtidas a partir de células originárias das três camadas germinativas (ectoderme, mesoderme e endoderme), talvez mais importante seja identificar as células mais acessíveis, eficientes e seguras para reprogramar e tirar partido das suas futuras aplicações clínicas.

Foi demonstrado que a reprogramação de queratinócitos primários por transdução retroviral, com Oct4, Sox2, Klf4 E c-Myc, é 100 vezes mais eficiente e 2 vezes mais rápido do que a reprogramação de fibroblastos humanos (Aasen et al, 2008). Os queratinócitos podem ser obtidos a partir da pele, cabelo ou sangue, sendo estas as fontes mais práticas de células para a obtenção de iPSCs específicas dos doentes. As células do sangue requerem cuidados mínimos de manutenção para reprogramar e demora cerca de duas semanas para aparecerem colónias (Loh et al., 2009).

Em 2010, Liu et al reportaram as primeiras iPSCs humanas derivadas da endoderme, a partir da reprogramação de hepatócitos primários humanos. Até aqui, as iPSCs humanas tinham sido produzidas a partir da mesoderme (fibroblastos e células do sangue) ou ectoderme (queratinócitos e células estaminais neuronais). Ao contrário das iPSCs derivadas de fibroblastos, as colónias das iPSCs derivadas de hepatócitos aparecem apenas 6 a 9 dias após a transdução retroviral com Oct4, Sox2, Klf4 e c-Myc.

É importante comparar iPSCs humanas provenientes de diferentes origens e determinar o impacto que as diversas fontes têm na segurança e no potencial de diferenciação (Liu et al., 2010).

Todas as iPSCs referidas anteriormente foram obtidas usando os quatro factores de transcrição descritos por Takahashi et al. (2006). No entanto, é possível induzir a pluripotência de células somáticas usando apenas alguns deles. Foi demonstrado que as células estaminais neuronais, que endogenamente expressam Sox2, c-Myc e Klf4, podem ser reprogramadas, usando apenas um factor, Oct4. Este sistema tem a vantagem de evitar a transfecção dos oncogenes c-Myc e Klf4, que podem contribuir para a formação de tumores. No entanto, a eficiência da reprogramação é muito baixa (Kim et al., 2009; Miura et al., 2009). Os queratinócitos também expressam níveis elevados de Klf4 e cMyc, mas neste caso, estes factores não podem ser eliminados do cocktail de transdução. Na ausência de cMyc, formam-se iPSCs derivadas de queratinócitos, apesar do número de colónias ser mais baixo e do seu aparecimento ser atrasado, enquanto que, na ausência de Klf4, não há formação colónias (Aasen et l., 2008).

2.2.2. METODOLOGIA

A técnica mais citada e utilizada para reprogramar e induzir pluripotência em células somáticas é aquela inicialmente proposta por Yamanaka e Takahashi (2006).

Depois de analisarem 24 genes capazes de funcionar como factores indutores de pluripotência, Takahashi e Yamanaka determinaram que os factores Oct4, Klf3, Sox2 e c-Myc desempenham um papel importante na obtenção de iPSCs a partir dos fibroblastos embrionários de murganhos. Esta combinação de 4 factores funciona também em fibroblastos humanos.

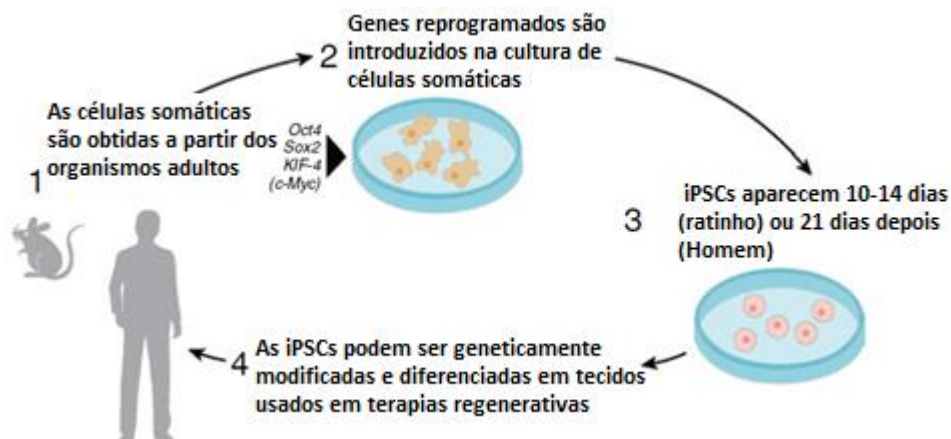


Figura 7: Representação esquemática da reprogramação e diferenciação de iPSCs.

As células somáticas são obtidas a partir de organismos adultos e os factores de transcrição são introduzidos *in vitro*. Obtêm-se populações de células pluripotentes que podem ser diferenciadas em diferentes tipos celulares, de modo a permitir a investigação de doenças específicas e a utilização em medicina regenerativa. Adaptada de Müller et al, 2009.

Foram utilizadas diferentes técnicas capazes de induzir a expressão dos factores de pluripotência nos vários tipos de células adultas. O método mais usado é a transferência de genes através de retrovírus ou lentivírus, usando quatro factores de transcrição (Figura 7). Durante a infecção, estes transgenes são integrados de forma estável no genoma, sendo posteriormente silenciados assim que se formam as iPSCs.

Porém, a indução de pluripotência por retrovírus ou lentivírus apresenta algumas limitações, como a potencial indução de tumores por mutação insercional, e o risco de reactivação do transgene durante a diferenciação das iPSCs, que poderia afectar a identidade da linhagem celular e o comportamento das células derivadas destas (YU et. al., 2011).

Em complemento às técnicas que utilizam vetores virais, têm vindo a ser identificadas moléculas que por influenciarem a reprogramação epigenética das células somáticas, permitem otimizar o processo de reprogramação celular e assim levar à criação de iPSCs sem sequências transgênicas no seu genoma.

Tabela 1: Vectores virais e não virais usados na obtenção iPSCs.

Adaptado de Robinton et al., 2013.

VECTOR	TIPO CELULAR	EFICIÊNCIA (%)	VANTAGENS	DESVANTAGENS	REFERÊNCIAS
Retrovírus	Fibroblastos, células estaminais neurais, células do estômago, queratinócitos, células amnióticas, células do sangue, adipócitos	≈0.001-1	Eficiência razoável	Integração genómica, silenciamento proviral incompleto e cinética baixa	Takahashi and Yamanaka, 2006 Takahashi et al., 2007
Lentivírus	Fibroblastos e queratinócitos	≈0,1-1,1	Eficiência razoável e aplicável a células em divisão e células quiescentes	Integração genómica e silenciamento proviral incompleto	Yu et al., 2009 Chang et al., 2009 Brambrink et al., 2008
Adenovírus	Fibroblastos e hepatócitos	≈0.001	Ausência de Integração genómica	Eficiência baixa	Stadtfeld et al., 2008
Plasmídeo	Fibroblastos	≈0.001	Apenas integração genómica ocasional	Eficiência baixa e integração genómica ocasional do vector	Si-Tayed et al., 2010
Vírus Sendai	Fibroblastos	≈1	Ausência de integração genómica	Replicase sensível à sequência de RNA	Ban et al., 2011
Proteínas	Fibroblastos	≈0.001	Ausência de integração genómica, entrega directa dos factores de transcrição e ausência de complicações relacionadas com o DNA	Eficiência baixa, semi-vida curta e requer grandes quantidades de proteína pura	Kim et al., 2009 Zhou et al., 2009
mRNA	Fibroblastos	≈1-4.4	Ausência de integração, cinética de reprogramação rápida, eficiência alta e controlável	Requer múltiplos rounds de transfecção	Warren et al., 2010
MicroRNA	Adipócitos e fibroblastos	≈0.1	Eficiente, cinética de reprogramação rápida, ausência de factores de transcrição exógenos, sem risco de integração	Eficiência mais baixa quando comparada com outros métodos	Yoo et al., 2011

2.3. APLICAÇÕES DAS iPSCs

Devido à capacidade de renovação ilimitada sem perderem as suas características e por serem diferenciáveis, em teoria, em qualquer tipo celular, as iPSCs são consideradas uma fonte ideal para diferentes aplicações terapêuticas (Figura 8):

1. criação de modelos de doença para estudar os respectivos mecanismos;
2. “screening” de fármacos em tipos celulares específicos, como os cardiomiócitos, hepatócitos, neurónios, entre outros;
3. produção de células e tecidos para transplante em diversas patologias.

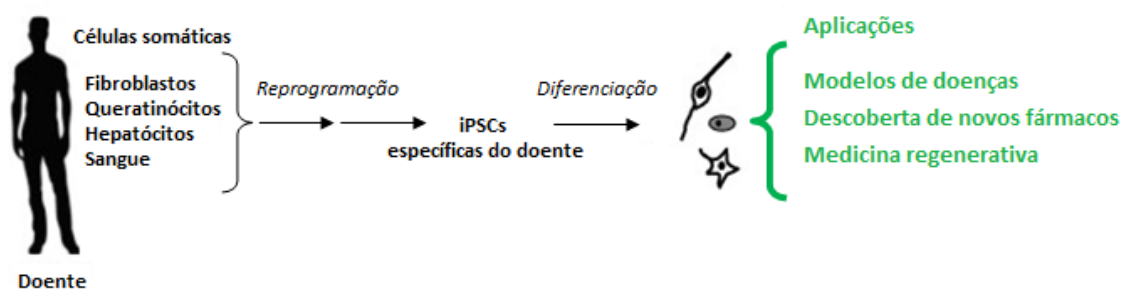


Figura 8: Diagrama esquemático mostrando a formação das iPSCs e as suas aplicações.

Células somáticas humanas, como os fibroblastos, queratinócitos, hepatócitos e células do sangue, podem ser reprogramadas para um estado de pluripotência, obtendo-se iPSCs. Estas células podem ser diferenciadas em diferentes linhagens celulares e podem ser usadas como modelo de doença, estudo de novos fármacos e medicina regenerativa. Adaptado de Vitale et al., 2011.

2.3.1. MODELOS DE DOENÇA

Os métodos convencionais que permitem estudar as doenças apresentam algumas limitações. Em primeiro lugar, as amostras de células e tecidos humanos são difíceis de obter e, por vezes, requerem intervenções invasivas, como no caso do cérebro e do coração, ou só estão disponíveis depois do doente falecer e em condições deficientes. Em segundo lugar, as células isoladas têm de ser mantidas em meios de cultura apropriados. Em terceiro lugar, os modelos animais só poderão ser úteis se a fisiologia da espécie animal for semelhante à humana. Por último, os modelos celulares heterólogos, ainda que convenientes, acessíveis e

muito utilizados, falham nas características biológicas, físicas e fisiológicas das células humanas (Young et al., 2012).

Uma das aplicações mais importantes das iPSCs é a criação de modelos de doenças, principalmente nas doenças que são difíceis de reproduzir em modelos animais, permitindo ultrapassar os obstáculos referidos anteriormente.

A possibilidade de modular doenças *in vitro* recorrendo à tecnologia das iPSCs é bastante atractiva e baseia-se na capacidade destas células se auto-renovarem indefinidamente e de originarem todas as células do nosso organismo (Young et al., 2012).

É necessário que as doenças estudadas recorrendo à tecnologia das iPSCs possam ser reproduzidas *in vitro*, o que não é possível para todas as doenças. Idealmente, a doença deverá manifestar-se com alterações a nível celular e com fenótipo reproduzível numa cultura celular. As doenças que estão associadas à produção insuficiente de proteínas conhecidas são possíveis de modular *in vitro*, especialmente se os níveis dessas proteínas poderem ser detectados por imunofluorescência. Exemplos dessas doenças são: atrofia espinhal muscular, disautonomia familiar e distrofia muscular (Grskovic et al., 2011).

O artigo publicado por Park et al, em 2008, mostrou, pela primeira vez, a possibilidade de obter iPSCs a partir de fibroblastos de indivíduos com doenças genéticas complexas, incluindo a doença de Parkinson e Huntington, diabetes mellitus e síndrome de Down.

A investigação das últimas décadas permitiu identificar mecanismos moleculares de doença que têm vindo a contribuir para o desenvolvimento de novas terapias. Este processo de descoberta exige a utilização de modelos celulares que reproduzam os fenómenos moleculares associados às patologias. Destacam-se as linhas celulares derivadas de tumores, assim como células imortalizadas por introdução de oncogenes, modelos com limitações dado que não permitem reproduzir de forma rigorosa os fenómenos que ocorrem em patologias como a doença de Alzheimer e outras. Espera-se que as iPSCs forneçam novos modelos de doença que permitam testar novas terapias, dado que podem ser retiradas células de doentes, reprogramadas em células estaminais induzidas e novamente diferenciadas, por exemplo em neurónios que vão permitir estudar patologias como a doença de Alzheimer, de Parkinson, Machado-Joseph entre muitas outras.

Espera-se que as iPSCs possam ajudar no estudo e tratamento das doenças neurodegenerativas (Gao et al., 2013). Estas doenças estão relacionadas com a idade e com a perda progressiva da função e estrutura dos neurónios e células da glia. As alterações genéticas são uma das principais causas destas doenças. As iPSCs específicas de doentes com

doenças neurodegenerativas contêm as variações genéticas que contribuem para o aparecimento da doença e poderão ajudar a determinar o seu fenótipo (Inoue et al., 2010). O potencial de diferenciação das iPSCs inclui a possibilidade de se diferenciarem em tipos celulares do sistema nervoso inacessíveis, que permitem compreender as doenças neurológicas e testar novos fármacos.

Uma das fases críticas da modelação de doenças neurodegenerativas através das hiPSCs é a elaboração de protocolos fiáveis que possam permitir a diferenciação das células estaminais em tipos celulares do sistema nervoso afectados pela doença em estudo. A maior parte dos protocolos inicia-se com a diferenciação de células estaminais pluripotentes em células neurais progenitoras. Estas células são depois moduladas, usando factores de crescimento (Han et al., 2011).

As iPSCs podem também ajudar na prevenção e gestão de doenças de forma personalizada para o doente, permitindo revelar mecanismos sobre o desenvolvimento da doença e assim definir os fármacos mais apropriados.

Tabela 2: Sumário dos modelos de doença publicados recorrendo à tecnologia das iPSCs.

Adaptado de Wu et al., 2011 e Robinton et al., 2013.

TIPO DE DOENÇA	DOENÇA	CAUSA GENÉTICA	TIPO CELULAR	CONTROL LINE
NEUROLÓGICAS	Parkinson	Monogénica (mutação LRRK2)	Neurónios dopaminérgicos	HiPSC
	Esclerose lateral amiotrófica	Poligénica	Neurónios motores	Hesc
	Atrofia muscular espinhal	Monogénica	Neurónios motores	HiPSC
	Disautonomia familiar	Monogénica	Células da crista neural	hiPSC, Hesc
	Síndrome RETT	Monogénica	Neurónios	hiPSC
	Huntington	Monogénica	ND	hiPSC, hESC
	Ataxia de Friedreich	Monogénica	ND	hESC
HEMATOLÓGICAS	Anemia de Fanconi	Monogénica	Células do sangue	hiPSC, hESC
	Síndrome X frágil	Monogénica	ND	hiPSC, hESC
	β -talassemia	Monogénica	Células hematopoiéticas	hiPSC
	Mielofibrose primária	Monogénica	Progenitores hematopoiéticos (CD34+CD35+)	hiPSC
METABÓLICAS	Diabetes tipo I	Poligénica	Céls. produtoras de glucagon e insulina	hESC
	Doença de Gaucher tipo III	Monogénica	ND	hiPSC

HEPÁTICA	Deficiência de alfa I antitripsina	Monogénica	Hepatócitos	hiPSC
OUTRAS	Síndrome de Prader-Willi	Monogénica	Neurónios	hiPSC, hESC
	Síndrome de Angelman e Prader-Willi	Monogénica	Neurónios	hiPSC, hESC
	Síndrome de Down	Monogénica	Neurónios	hiPSC, hESC
	Retinite pigmentosa	Poligénica	Cel. progenitoras da retina e dos fotorreceptores	hiPSC
CARDIOVASCULARES	Síndrome QT 1 longo	Monogénica	Cardiomiócitos	hiPSC
	Síndrome QT 2 longo	Monogénica	Cardiomiócitos	hiPSC
	Síndrome de Leopard	Monogénica	Cardiomiócitos	hiPSC, hESC
	Síndrome de Timothy	Monogénica	Cardiomiócitos	hiPSC
	Síndrome de Hutchinson Gilford	Monogénica	Células musculares lisas, CE mesenquimais	hiPSC, hESC
	Distrofia muscular de Duchenne	Monogénica	ND	hiPSC, hESC

ND: não determinado

2.3.2. SCREENING DE FÁRMACOS

Actualmente, o modelo de desenvolvimento de novos fármacos é um processo ineficiente e apresenta algumas limitações, uma vez que a resposta aos fármacos avaliada em modelos animais nem sempre permite prever a sua eficácia no Homem. A maior parte dos candidatos a novos fármacos não consegue chegar ao mercado por questões relacionadas com a segurança e eficácia. A tecnologia das iPSCs poderá replicar os tipos celulares específicos das doenças e permitir a realização de testes e ensaios, de modo a escolher o fármaco com a maior eficácia e menor toxicidade. Por outro lado, o uso das hiPSC pode ajudar na redução do número de animais sacrificados durante a fase de avaliação e desenvolvimento de novos fármacos (Young et al., 2012).

Muitos dos estudos com hiPSCs para a avaliação de novos fármacos têm sido realizados no campo das doenças neurológicas, como por exemplo: síndrome Rett, disautonomia familiar, atrofia muscular espinhal, Alzheimer e Parkinson.

Cooper e os seus colegas obtiveram hiPSCs a partir de doentes com a doença de Parkinson, com mutações nos genes PINK1 e LRRK2. Estas hiPSCs foram diferenciadas em células neurais e procederam à análise da função mitocondrial. A disfunção mitocondrial em hiPSCs derivadas de células neurais de doentes com Parkinson pode ser corrigida com coenzima Q10, rapamicina e inibidor da cinase LRRK2. O que sugere que o resgate farmacológico das funções mitocondriais nestas células pode resultar num possível tratamento desta doença (Cooper et al., 2012).

A doença de Alzheimer, uma doença neurodegenerativa caracterizada pela formação do peptídeo β amiloide ($A\beta$), tem sido estudada usando iPSCs específicas de doentes. Estas hiPSCs foram diferenciadas em neurónios que expressam marcadores e também os precursores do peptídeo β amiloide. As células diferenciadas são capazes de sintetizar $A\beta$. A produção de $A\beta$ pode ser inibida, não só pelos inibidores de β -secretase e γ -secretase, como também pelo sulfeto de sulindac, um anti-inflamatório não esteroide. Este sistema será viável para testar possíveis fármacos usados no tratamento da doença de Alzheimer (Yagi et al., 2011) (figura 9).

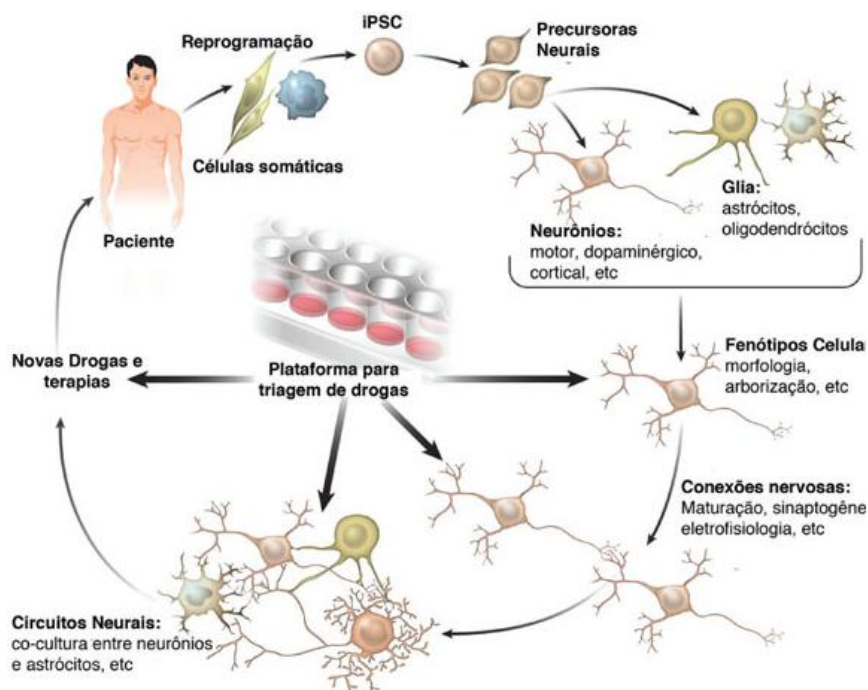


Figura 9: Modelação de doenças neurológicas usando a tecnologia das iPSCs.

A reprogramação de células somáticas de doentes permite gerar iPSCs isogénicas, isto é, com o mesmo genoma do paciente. As células progenitoras neurais são derivadas das iPSCs e diferenciadas em células da glia e neurónios. Os neurónios podem ser diferenciados em subtipos diferentes, de acordo com a célula alvo de cada doença. Uma vez identificado o fenótipo, podem ser utilizadas plataformas para a triagem de fármacos capazes de reverter ou atenuar o fenótipo. Esta abordagem permite descobrir novas terapias e novos fármacos para tratar as doenças neurológicas. Adaptado de Marchetto et al., 2010.

O uso da tecnologia das iPSCs como plataforma para a descoberta de novos fármacos requer a combinação de diversas fases (figura 10):

- (1) Recrutamento de um grupo de doentes;
- (2) Obtenção de iPSCs e armazenagem em biobancos;
- (3) Diferenciação das iPSCs derivadas dos doentes nas células que são afectadas pela doença em estudo;
- (4) Descoberta do fenótipo da doença;
- (5) Preparação de todas as condições do ensaio de acordo com o fenótipo da doença.

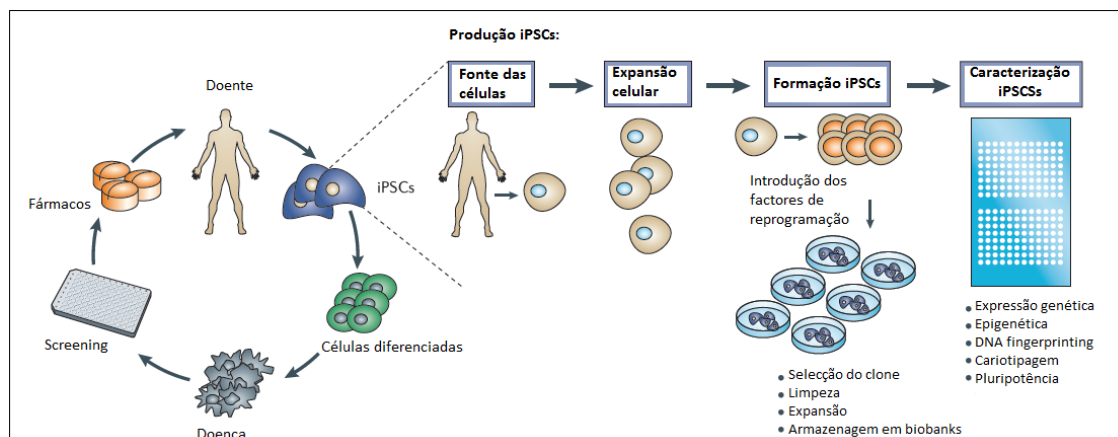


Figura 10: Modelo integrado para a descoberta e desenvolvimento de novos fármacos baseado na tecnologia das iPSCs.

Neste modelo, o processo de descoberta de novos fármacos tem início nas células do doente que são usadas para obter iPSCs. O primeiro passo consiste no isolamento de células do doente, que, em seguida, são expandidas e depois reprogramadas em iPSCs e, finalmente, diferenciadas nas células de interesse que desempenham um papel importante na doença em estudo. O processo é seguido pela caracterização, expansão e armazenagem das iPSCs em biobancos. O que torna esta tecnologia válida na descoberta de novos fármacos é a capacidade de reproduzir a doença e criar um modelo de doença que permite a avaliação dos fármacos. Adaptado de Grskovic et al., 2011.

2.3.2.1. RECRUTAMENTO DE DOENTES

O recrutamento de doentes para biópsia da pele ou recolha de amostras de sangue requer a coordenação entre doentes e instituições de saúde onde são acompanhados e tratados. É necessário obter o consentimento do doente para o uso das iPSCs na descoberta e comercialização de novos fármacos (Grskovic et al., 2011).

2.3.2.2. DERIVAÇÃO E EXPANSÃO DE iPSCs

Os fibroblastos têm sido as células de eleição para a reprogramação pelas características que apresentam: acessibilidade, fácil armazenamento e manuseamento e elevado rendimento na obtenção de iPSCs. Através da punção da pele anestesiada localmente, sem sutura, é possível obter fibroblastos para reprogramação. A escolha da fonte de células para obtenção das iPSCs pode depender também da diferenciação nos tipos celulares que reflectem o fenótipo da doença.

O crescimento e expansão das iPSCs é tecnicamente exigente e requer especialistas quando comparado com outras células.

Têm sido optimizadas as condições da reprogramação de modo a obter iPSCs uniformes e com comportamentos estáveis. A identificação de marcadores celulares que possam prever o potencial de diferenciação das iPSCs contribuirá para uma selecção mais rápida das linhagens celulares que apresentam maior qualidade (Grskovic et al., 2011).

2.3.2.3. DIFERENCIAÇÃO DIRECCIONADA

Teoricamente, as hiPSCs podem originar todas as células do organismo adulto, no entanto, na prática, os protocolos de diferenciação *in vitro* têm sido desenvolvidos apenas para determinados tipos celulares: neurónios, células progenitoras hematopoiéticas, hepatócitos, cardiomiócitos e queratinócitos.

Na maioria dos casos, o processo de diferenciação é ineficiente e origina populações celulares heterogéneas (contendo células com diferentes estádios de maturação) e/ou populações de células diferentes. O estabelecimento de protocolos eficientes para a diferenciação dirigida têm sido dificultados pelo conhecimento deficiente do desenvolvimento embrionário humano e os longos períodos de tempo associados ao desenvolvimento de células estaminais pluripotentes (PSCs) humanas. Os métodos existentes para a diferenciação das iPSCs de ratinhos nem sempre se aplicam às células humanas.

Um dos obstáculos para a aplicação das iPSCs no desenvolvimento de novos fármacos é a dificuldade em conseguir que a diferenciação nas células específicas da doença em estudo seja feita em larga-escala.

O desenvolvimento de bancos de iPSCs poderá reduzir o tempo de preparação das células e permitirá obter preparações celulares disponíveis para diversos estudos (Grskovic et al., 2011).

2.3.3. TERAPIA CELULAR

A criação de iPSCs específicas de doentes tem sido motivada pela possibilidade de obter células e tecidos imuno-compatíveis para transplante autólogo (Robinton et al., 2013).

Um dos propósitos mais promissores das iPSCs é a sua possível aplicação em medicina regenerativa. Um dos objectivos desta tecnologia passa por substituir as zonas lesadas de um determinado órgão-alvo, para que possa retomar o seu funcionamento normal e permanente, sem desencadear resposta imunitária e sem possibilidade de se desenvolverem doenças secundárias (por exemplo, tumores) a partir das células inoculadas.

O transplante de órgãos tem limitações associadas à falta de órgãos para transplante e à necessidade de imunossupressão durante toda a vida dos doentes. Espera-se que as iPSCs possam vir a ser utilizadas para transplante e terapia celular ultrapassando o problema da rejeição mediante utilização de células do próprio doente. Em doenças genéticas, após correcção do defeito genético por reparação génica, será possível produzir células saudáveis para transplante (figura 11), uma estratégia que já foi utilizada com sucesso num modelo animal de anemia de Fanconi (Raya et al., 2009).

As iPSCs apresentam, deste modo, vantagens clínicas quando comparadas com as ESCs, na medida em que o genoma das iPSCs coincide com o genoma do doente a partir do qual são derivadas e o risco de rejeição durante o processo de transplante de tecidos é reduzido. Os investigadores têm procurado desenvolver técnicas que usam genes alvo de modo a reparar as mutações genéticas causadoras das doenças. As iPSCs obtidas são isogénicas para o doente e não têm a mutação causadora da doença (Cherry et al., 2013).

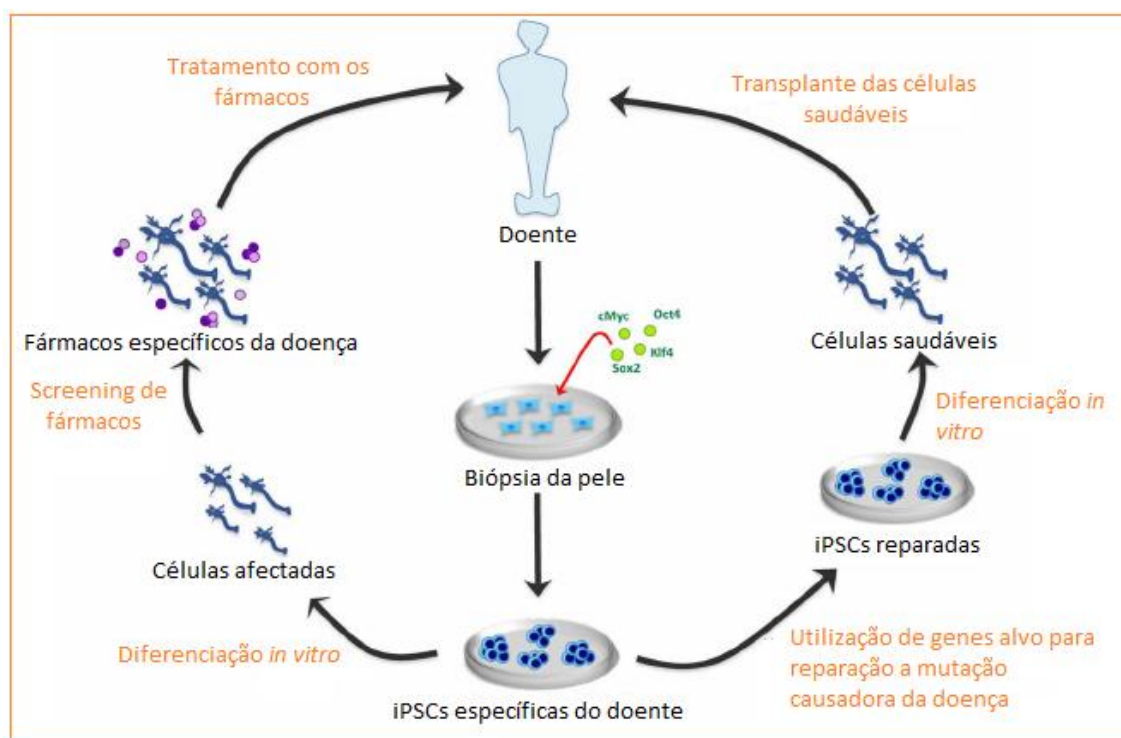


Figura 11: Aplicações das iPSCs.

A tecnologia das iPSCs poderá ser usada para modular e tratar as doenças. Neste exemplo, o doente tem uma doença neurodegenerativa. As iPSCs específicas do doente podem ser usadas seguindo dois mecanismos diferentes. No caso da mutação causadora da doença ser conhecida, genes alvo podem ser usados para reparar a sequência de DNA mutada (mecanismo da direita). As iPSCs reparadas serão diferenciadas nos neurónios que serão transplantados no doente, permitindo o tratamento da doença. Por outro lado, a criação do modelo de doença *in vitro* permitirá descobrir e desenvolver novos fármacos (mecanismo da esquerda). Retirado de Robinton et al., 2013.

3. PORTUGAL E AS iPSCs

A investigação das iPSCs em Portugal é uma área científica em expansão que tem despertado o interesse de muitos especialistas.

As aplicações das iPSCs na descoberta e desenvolvimento de novos fármacos, na modelação das doenças e em terapia regenerativa revelam-se promissoras e poderão contribuir para um retorno económico crescente, o que tem levado o país a investir no estudo destas células.

A comunidade científica espera que, num futuro próximo, as iPSCs possam vir a ser úteis para fins terapêuticos, nomeadamente no tratamento de doenças para as quais ainda não existe cura, e/ou nas doenças degenerativas e na reparação de tecidos danificados que não têm a capacidade de se auto-reparar (medicina regenerativa).

Em Portugal, existem diversos laboratórios nacionais que trabalham com iPSCs.

O Centro de Neurociências e Biologia Celular da Universidade de Coimbra (CNC) tem grupos de investigação que: estudam as alterações mitocondriais das iPSCs, usam as iPSCs para terapia de doenças cardiovasculares e optimização das condições de cultura e diferenciação por interacção de matrizes diversas (grupo coordenado pelo Professor Lino Ferreira), geram iPSCs a partir de fibroblastos da pele para investigação e terapia da doença de Machado-Joseph (grupo coordenado pelo Professor Luís Pereira de Almeida).

O Centro de Biomedicina Molecular e Estrutural da Universidade do Algarve (CBME) também tem desenvolvido diversas investigações na área das iPSCs. Um dos grupos de investigação, coordenado pelo Professor José Bragança, tem estudado os mecanismos moleculares envolvidos na pluripotência das células estaminais e nos processos de diferenciação que ocorrem nos ratinhos e nos humanos, com o objetivo de identificar novas terapêuticas.

A BIOCANT, em Cantanhede, recebeu o primeiro “Encontro Internacional de Células Estaminais para Medicina Regenerativa e Identificação de Fármacos”, a 19 de Julho de 2013. Este encontro foi organizado pela BIOCANT e o Centro de Neurociências e Biologia Celular, da Universidade de Coimbra.

4. PERSPECTIVAS FUTURAS

A comunidade científica tem-se mostrado interessada na reprogramação de células somáticas em iPSCs que foi reportada pela primeira vez, em 2006, pelo grupo de investigação liderado por Yamanaka (Yamanaka et al., 2006).

As iPSCs podem diferenciar-se em diferentes tipos celulares, sem limitações éticas e incompatibilidades imunológicas, o que as torna numa tecnologia bastante promissora e cobiçada.

Apesar dos progressos que têm sido feitos, ainda existem desafios que têm de ser ultrapassados, de modo a explorar todas as potencialidades das iPSCs.

Não existe unanimidade quanto ao melhor protocolo para obter iPSCs mais seguras. A utilização de protocolos mais uniformes e controlos mais rigorosos aumentará a solidez experimental e permitirá a obtenção de linhas celulares padronizadas que poderão ser usadas com confiança nas investigações (Robinton et al., 2013).

Uma vez que as iPSCs estão sujeitas à adaptação aos meios de cultura, que poderá afectar o cariótipo destas células (Harrison et al., 2007), torna-se necessário definir protocolos que reduzam o tempo de cultura. As linhas celulares obtidas devem ser controladas, de modo a detectar aberrações cromossómicas que podem ocorrer durante o seu cultivo. A compreensão das alterações cromossómicas que ocorrem durante a reprogramação, cultura e diferenciação das iPSCs será essencial para garantir que as células-filhas sejam funcionais, puras e apropriadas para terapia e investigação (Mayshar et al., 2010).

Os investigadores procuram compreender a reprogramação e desenvolver novos protocolos, que possam permitir o estudo da fisiopatologia das doenças e a investigação de novos fármacos (Robinton et al., 2013). Espera-se também que as iPSCs possam ser utilizadas em medicina regenerativa e terapia celular para tratar doentes afectados por doenças neurodegenerativas, entre outras.

Pretende-se criar plataformas com iPSCs humanas para estudar a patologia das doenças, avaliar potenciais agentes terapêuticos e fornecer fontes sustentáveis para medicina regenerativa. Apesar do transplante de células estaminais ser possível em laboratório, não se consegue garantir que tal se possa concretizar *in vivo*. Ainda existem algumas perguntas por responder: como é que a injeção de iPSCs nos modelos de doença pode promover a reparação dos tecidos? Como é que estas células se diferenciam em linhas celulares específicas, no cérebro, depois do transplante? (Gao et al., 2013).

Dada a falta de padronização no processo de reprogramação, a tecnologia das iPSCs ainda tem de percorrer um longo percurso até que se possa tirar partido de todos os seus possíveis benefícios.

Se estas dificuldades forem ultrapassadas, conseguir-se-á no futuro alcançar benefícios inimagináveis no tratamento das doenças, pesquisa de novos fármacos, ensaios clínicos, terapia regenerativa, entre outros.

5. CONCLUSÃO

A reprogramação de diferentes células para um estado de pluripotência provou tratar-se de uma ferramenta promissora.

As primeiras investigações na reprogramação celular, liderados pelo investigador japonês Yamanaka, surpreenderam a comunidade científica por quebrarem o dogma de que células especializadas do corpo humano teriam uma identidade vitalícia (Takahashi et al., 2007). A expressão forçada de um grupo de factores de transcrição tem a capacidade de redireccionar a identidade de células especializadas e representa uma forma extraordinária de demonstrar a flexibilidade celular. Este regresso induzido ao estágio embrionário pluripotente foi batizado de iPSCs (do inglês, *Induced Pluripotent Stem Cells*).

As iPSCs superam as preocupações éticas ligadas à origem embrionária das células estaminais embrionárias humanas e apresentam um grande potencial em Medicina. Ainda assim, torna-se necessário melhorar os processos de reprogramação e de diferenciação destas células.

Espera-se que as iPSCs possam ser utilizadas para a formação de tecidos que podem servir para transplante em pacientes com tecidos ou órgãos danificados. O seu uso em condições autólogas limita a necessidade de imunossupressão, ultrapassando o problema da rejeição mediante utilização de células do próprio doente.

Duas outras valências das iPSCs, potencialmente importantes para a medicina, são a sua utilização em processos de descoberta de novos fármacos e na modulação de doenças. Os investigadores poderão usar estas células como “tubo de ensaio” para testar a segurança e eficácia de novos fármacos. Populações homogéneas de células diferenciadas, a partir de iPSCs, poderão ser usadas para testar os efeitos farmacológicos, específicos para cada tipo de tecido, sob o efeito de um extenso número de compostos químicos. Estas populações celulares poderão também ser criadas a partir de células isoladas de pacientes que padeçam de uma determinada doença e serem usadas na descoberta de novos fármacos úteis no tratamento da doença, bem como na compreensão dos seus mecanismos patológicos.

6. BIBLIOGRAFIA

AASEN, T. [et al.] – Efficient and Rapid Generation of Induced Pluripotent Stem Cells from Human Keratinocytes. *Nat Biotechnol* 26 (2008) 1276–84.

ALMEIDA, L. P. – Células estaminais pluripotentes induzidas (iPSCs) – A mais recente revolução das ciências da vida e da saúde. *ROF* 97 (2011).

BAN, H. [et al.] – Efficient generation of transgene-free human induced pluripotent stem cells (iPSCs) by temperature-sensitive Sendai virus vector. *Proc Natl Acad Sci USA* 108 (2011) 13234-14239.

BRADLEY, A. [et al.] – Formation of germ-line chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines. *Nature*, 09 (1984) 255-256.

BRAGANÇA, J., TAVARES, A., BELO, J. A. – Células estaminais e medicina regenerativa, um admirável mundo novo. *Revista da Sociedade Portuguesa de Bioquímica Canal BQ*, 7 (2010).

BRAMBRINK, T. [et al.] – Sequential expression of pluripotency markers during direct reprogramming of mouse somatic cells. *Cell Stem Cell*, 2 (2008) 151-159.

BRIVANLOU, A.H. [et al.] – Stem cell: settings standards for human embryonic stem cells. *Science* 300 (2009) 913-916.

BRONS, I. G. M. [et al.] – Derivation of pluripotent epiblast stem cells from mammalian embryos. *Nature* 448 (2007) 191.

CHAPARRO, O., BELTRAN, O. – Reprogramación Nuclear y Células Pluripotentes Inducidas. *Revista Med* 17 (2009) 252-263.

COOPER, O. [et al.] – Pharmacological Rescue of Mitochondrial Deficits in iPSCs-Derived Neural Cells from Patients with Familial Parkinson's Disease. *Sci Transl Med* 4 (2012) 141-190.

GAO, A. [et al.] – Potential therapeutic applications of differentiated induced pluripotent stem cells (iPSCs) in the treatment of neurodegenerative diseases. *Neuroscience* 228 (2013) 47-59.

GRSKOVIC, M. [et al.] – Induced pluripotent stem cells – opportunities for disease modeling and drug discovery. *Nature Reviews Drug Discovery* | AOP, published online (2011) doi:10.1038/nrd3577.

GURDON, J. B., MELTON, D. A. – Nuclear Reprogramming in Cells. *Science* 322 (2008).

HALLEY-STOTT, R. P., PASQUE, V., GURDON, J. B. – Nuclear reprogramming. *Development* 140 (2013) 2468-2471.

HAN, S. S. W., WILLIAMS, L. A., EGGAN, K. C. – Constructing and deconstructing stem cell models of neurological disease. *Cell Press* 70 (2011) 626-644.

HANNA, J. [et al.] – Treatment of sickle cell anemia mouse model with iPS cells generated from autologous skin. *Science* 318 (2007) 1920-1923.

HARRISON, N. J., BAKER, D., ANDREWS, P. W. – Culture adaptation of embryonic stem cells echoes germ cell malignancy. *Int J Androl.* 30 (2007) 275-281.

HUA, H. [et al.] – iPSC-derived β cells model diabetes due to glucokinase deficiency. *The Journal of clinical investigation*, 123 (2013) 3146-3153.

INOUE, H. – Neurodegenerative disease-specific induced pluripotent stem cell research. *Exp Cell Res* 316 (2010) 2560-2564.

KIM, J. B. [et al.] – Direct reprogramming of human neural stem cells by OCT4. *Nature* 461 (2009) 649-53.

LEEPER, N. J., HUNTER, A. L., COOKE, J. P. – Stem cell therapy for vascular regeneration: adult, embryonic, and induced pluripotent stem cells. *Circulation* 122 (2010) 517-26.

LEROU, P. H., DALEY, G. Q. – Therapeutic potential of embryonic stem cells. *Blood Rev* 19 (2005) 321-331.

LIU, H. [et al.] – Generation of endoderm-derived human induced pluripotent stem cells from primary hepatocytes. *Hepatology* 51 (2010) 1810–1819.

LOH, Y. H. [et al.] – Generation of induced pluripotent stem cells from human blood. *Blood* 113 (2009) 5476-5479.

MANGANELLI, G., FICO, A., FILOSA, S. – Embryonic Stem Cells: from Blastocyst to in vitro Differentiation, Methodological Advances in the Culture, Manipulation and Utilization of Embryonic Stem Cells for Basic and Practical Applications, Prof. Craig Atwood (Ed.), ISBN: 978-953-307-197-8, InTech, 2011.

MARCHETTO, M. C. [et al.] – Transcriptional signature and memory retention of human-induced pluripotent stem cells. *PLoS One* 4 (2009) 7076.

MARTIN, G. – Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 78 (1981) 7634-7638.

MAYSHER, Y. [et al.] – Identification and classification of chromosomal aberrations in human induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 7 (2010) 521-531.

MIURA, K. [et al.] – Variation in the safety of induced pluripotent stem cell lines. *Nat Biotechnol* 27 (2009) 743–745.

MORITA, S., KOJIMA, T., AND KITAMURA, T. – Plat-E: an efficient and stable system for transient packaging of retroviruses. *Gene Ther.* 7 (2000) 1063–1066.

NAKAGAWA, M. [et al.] – Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nat Biotechnol* 26 (2008) 101–106.

OKITA, K. [et al.] – An Efficient Nonviral Method to Generate Integration-Free Human-Induced Pluripotent Stem Cells from Cord Blood and Peripheral Blood Cells. *Stem Cells* 31 (2013) 458-466.

PARK, I. H. [et al.] – Disease-specific induced pluripotent stem cells. *Cell* 134 (2008) 877–86.

RAYA, A. [et al.] – Disease-corrected haematopoietic progenitors from Fanconi anaemia induced pluripotent stem cells. *Nature* 460 (2009) 53-59.

ROBINTON, D. A., DALEY, G. Q. – The promise of induced pluripotent stem cells in research and therapy. *Nature* 481 (2013) 295-305.

SAHA, K., JAENISCH, R. – Technical challenges in using human induced pluripotent stem cells to model disease. *Cell Stem Cell* 5 (2009) 584–95.

SI-TAYED, K. [et al.] – Generation of human induced pluripotent stem cells by simple transient transfection of plasmid DNA encoding reprogramming factors. *BMC Dev Biol* 10 (2010) 81.

STADTFELD, M. [et al.] – Induced pluripotent stem cells generated without viral integration. *Science* 322 (2008) 945-949.

TAKAHASHI, K. [et al.] – Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131 (2007) 861–72.

TAKAHASHI, K., YAMANAKA, S. – Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126 (2006) 663–676.

TESAR, P. J. [et al.] – New cell lines from mouse epiblast share defining features with human embryonic stem cells. *Nature* 448 (2007) 196.

THOMSON, J. A. [et al.] – Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*. 282 (1998) 1145-1147.

VITALE, A. M., WOLVETANG, E., MACKAY-SIM, A. – Induced Pluripotent Stem Cells: a New Technology to Study Human Diseases. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 43 (2011) 843–846.

WAGNER, R. T., AND COONEY, A. J. – OCT4: less is more. *Cell Res.* 19 (2009) 527-528.

WARREN, L. [et al.] – Efficient Reprogramming to Pluripotency and Directed Differentiation of Human Cells with Synthetic Modified mRNA. *Cell Stem Cell* 7 (2010) 618-630.

WEISMANN, A. – In the germ-plasm: a theory of heredity, ed. WN Parker, H Ronnfeldt. London: Walter Scott (1893).

WILMUT, I. [et al.] – Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 385 (1997) 810-813.

WU, S. M., HOCHEDLINGER, K. – Harnessing the potential of induced pluripotent stem cells for regenerative medicine. *Nat Cell Biol.* 13 (2011) 497-505.

YAGI, T. [et al.] – Modeling Familial Alzheimer 's disease with Induced Pluripotent Stem Cells. *Hum Mol Genet* 20 (2011) 4530-4539.

YOO, A. S. [et al.] – MicroRNA-mediated conversion of human fibroblasts to neurons. *Nature* 476 (2011) 228-231.

YOUNG, W. [et al.] – Patient-specific Induced Pluripotent Stem Cells as a Platform for Disease Modeling, Drug Discovery and Precision Personalized Medicine. *J Stem Cell Res Ther* 10 (2010) 2157-7633.

YU, J. [et al.] – Efficient Feeder-Free Episomal Reprogramming with Small Molecules. *PLoS One* 6, (2011).