



COLEGIADO DO CURSO DE MEDICINA

AIKE DE OLIVEIRA BERBERT

**USO DAS CÉLULAS-TRONCO DE
PLURIPOTÊNCIA INDUZIDA NA MEDICINA
REGENERATIVA**

**ITABUNA – BAHIA
05/2024**

AIKE DE OLIVEIRA BERBERT

**USO DAS CÉLULAS-TRONCO DE PLURIPOTÊNCIA
INDUZIDA NA MEDICINA REGENERATIVA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
como requisito parcial à obtenção do título de
médico/a pela Afya Faculdade de Ciências
Médicas de Itabuna, sob a orientação da
Professora Adriana Bozzi

B535u

BERBERT, Aike de Oliveira

Uso das células-tronco de pluripotência induzida na medicina regenerativa/ Aike de Oliveira Berbert, --Itabuna: AFYA ITABUNA, 2024.1
38p.

Orientadora: Prof.^a Adriana Bozzi

Trabalho de Conclusão do Curso de Bacharelado em Medicina
pela Afya Faculdade de Ciências Médicas Itabuna, BA – AFYA ITABUNA.

1.Fatores de transcrição.2. Terapêutica. 3.Tratamento.4. Diferenciação celular
I. BERBERT, Aike de Oliveira. II. BOZZI, Adriana.
III. Afya Faculdade de Ciências Médicas Itabuna. IV. Título.

CDU:616

Catálogo Biblioteca Dr.^a Maria Odília Teixeira
Aline Andrade Ferraz – Bibliotecária CRB 5 -001881/O

BERBERT, Aike de Oliveira. **Uso das células-tronco de pluripotência induzida na medicina regenerativa.** Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como requisito parcial à obtenção do título de médico/a pela Afya Faculdade de Ciências Médicas Itabuna, sob a orientação do(a) Professor(a) Adriana Bozzi. Itabuna: Afya Faculdade de Ciências Médicas Itabuna, 2024.

FOLHA DE APROVAÇÃO

USO DAS CÉLULAS-TRONCO DE PLURIPOTÊNCIA INDUZIDA NA MEDICINA REGENERATIVA

**AIKE DE OLIVEIRA BERBERT
ADRIANA BOZZI**

Aprovado em 23 de maio de 2024

BANCA EXAMINADORA

Professor Dr. Luciano de Oliveira Souza Tourinho
Afya Faculdade de Ciências Médicas Itabuna

Professor Doutor Pedro Costa Campos Filho
Afya Faculdade de Ciências Médicas Itabuna

Professora Mestra Mércia Margotto
Afya Faculdade de Ciências Médicas Itabuna

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Tecidos presentes em teratomas derivados de células iPS-MEF4 7. Painel A, teratoma. Painel B, cartilagem. Painel C, sistema nervoso central. Painel D, músculo. Painel E, adipócito. Painel F, epitélio

Figura 2 - Diagrama da seleção dos artigos para o presente estudo baseado nos critérios de inclusão e exclusão

Figura 3 - Mapa mundial de estudos clínicos com células-tronco de pluripotência induzida

Figura 4 - Caracterização fenotípica e funcional de células de pluripotência induzida. Painel A, atividade da fosfatase alcalina e marcadores de pluripotência *Oct4*, *Sox2*, *Nanog*, *SSEA-3*, *SSEA-4* e *Tra-1-81*, evidenciados por microscopia de fluorescência. Painel B, células originárias do ectoderma, mesoderma e endoderma, evidenciados por marcadores específicos em microscopia de fluorescência

Figura 5 - Progressão do transcriptoma mesenquimal para o de células-tronco. Painel A, ampliação estrutural da fibronectina. Painel B, ampliação por microscopia eletrônica dos micropadrões revestidos com fibronectina (matriz extracelular).

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Perfil dos estudos clínicos intervencionistas utilizando iPSC completos e em andamento

Quadro 2 – Principais experimentos realizados e suas respectivas aplicações clínicas segundo autores

Quadro 3 - Principais vantagens e desvantagens do uso de iPSC e seus respectivos autores

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Estudos encontrados no *Clinical Trials*, agrupados por sistema orgânico e divididos por porcentagem

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABPA - Aspergilose broncopulmonar alérgica

AR - Autossômico recessivo

BMP - *Bone morphogenetic protein*

CD - *Cluster of differentiation*

CGH array - *Comparative genomic hybridization array*

c-Myc - Proteína da família dos oncogenes

DNA - Ácido desoxirribonucleico

DGC - Doença granulomatosa crônica

ESC - *Embryonic stem cell*

FGF - Fator de crescimento fibroelástico básico

HLA - Sistema de antígenos leucocitários humanos

HNK1+ - *Human neural protein*

Int - Integrase

iPSC – *Induced pluripotent stem cell*

ISSCR - *International Society for Stem Cell Research*

Klf4 - *Kruppel-like factor 4*

MYT1L - *Myelin transcription factor 1 like*

NAFLD - *Non-alcoholic fatty liver disease*

NADPH - Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

NIH – *National Institutes of Health*

Nox2 - NADPH Oxidase 2

Oct3/4 - *Octamer-binding transcription factor* $\frac{3}{4}$

PBMC - *Peripheral blood mononuclear cell*

PCNA - *Proliferating cell nuclear antigen*

PDGF-BB - *Platelet-derived growth factor – BB*

POU - Pit-Oct-Unc

PVA - Álcool polivinílico

RNA - Ácido ribonucleico

RNA_m - RNA mensageiro

SHANK - *SH3 and multiple ankyrin repeat domains*

SHH - *Sonic Hedgehog*

SMAD - *Spinal muscular atrophy e mothers against decapentaplegic*

SOX – *SRY box*

SRY – *Sex determining region Y*

SSEA - *Stage-specific embryonic antigen*

TGF- β - *Transforming growth factor beta*

TALE - *Transcription activator-like effector*

TEA - Transtorno do espectro autista

TRA - Marcador de pluripotência

Wg - *Wingless*

Zic - *Zinc finger protein of the cerebellum*

Sumário

1 INTRODUÇÃO	15
2 JUSTIFICATIVA	19
3 OBJETIVO GERAL	20
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	20
4 MATERIAIS E MÉTODOS	20
5 RESULTADOS	23
6 DISCUSSÃO	29
7 CONCLUSÃO.....	37
8 REFERÊNCIAS	37
9 ANEXO 1 – Análise de Plágio (CopySpider)	40

Uso das células-tronco de pluripotência induzida na medicina regenerativa

Use of induced pluripotent stem cells in regenerative medicine

BERBERT, Aike¹

BOZZI, Adriana²

RESUMO

Introdução. As células-tronco pluripotentes induzidas (iPSC) surgiram por meio de reprogramação de uma célula somática para o estágio embrionário, utilizando os fatores de pluripotência *Oct-3/4*, *Sox-2*, *c-Myc*, *Klf-4* (OSKM). Estudos *in vitro* confirmaram o potencial pluripotente dessas células, sugerindo o seu uso na medicina regenerativa. **Objetivos.** Avaliar a aplicação das iPSC na clínica humana por meio da análise de estudos clínicos depositados no *Clinical Trials*. **Justificativa.** Os métodos terapêuticos atuais carecem de inovação principalmente para a resolução de enfermidades que ainda buscam alternativas clínicas efectoras, como doenças degenerativas, genéticas e traumáticas. Nesse sentido, o uso das iPSC demonstra potencial para novas abordagens terapêuticas e promoção de maior qualidade de vida dos pacientes. O advento da tecnologia da iPSC abre um leque de inovações na pesquisa clínica, com aplicações na medicina regenerativa, modelagem de doenças, desenvolvimento de medicamentos e estudos de biologia básica, contribuindo para a formação acadêmica de ponta e qualificação de novos profissionais na área da saúde. **Metodologia:** Trata-se de uma revisão narrativa de literatura e análise da plataforma *Clinical Trials*. Foram analisados estudos clínicos intervencionistas, depositados de 2010 a 2024, com e sem resultados informados, em andamento e concluídos, nas fases 1, 2, 3 ou 4 de estudo clínico, independente de sexo e idade. **Resultados e discussão.** Cerca de 30 estudos foram selecionados envolvendo sistema cardiovascular, respiratório, osteomuscular, tegumentar, oftálmico, hemolinfopoiético, nervoso, endócrino e neoplasias. A maioria eram estudos *in vitro*, trazendo a diferenciação de novos tecidos a partir de iPSC para o tratamento de doenças específicas, análise da resposta metabólica a fármacos e investigação do comportamento de doenças genéticas. Foi constatado que a aplicação *in vivo* da iPSC ainda é limitada por embates éticos e potencial oncogênico devido à manipulação genética. **Conclusão.** Foram demonstrados avanços no esclarecimento de mecanismos fisiopatológicos e na aplicação clínica das iPSC, sendo necessários esforços para assegurar o potencial terapêutico e uso *in vivo* dessas células.

Palavras-chave: Fatores de transcrição. Terapêutica. Células-tronco pluripotentes. Diferenciação celular.

¹ Graduando em Medicina pela Afya Faculdade de Ciências Médicas de Itabuna.

² P.D. Biologia e Imunologia das células-tronco. Docente do Curso de Medicina da Afya Faculdade de Ciências Médicas de Itabuna.

ABSTRACT

Introduction. Induced pluripotent stem cells (iPSCs) have emerged through the reprogramming of a somatic cell to an embryonic stage, using the pluripotency factors Oct-3/4, Sox-2, c-Myc, Klf-4 (OSKM). *In vitro* studies have confirmed the pluripotent potential of these cells, suggesting their use in regenerative medicine. **Objectives.** Evaluate the application of iPSCs in human clinical settings through the analysis of clinical studies deposited in Clinical Trials. **Justification.** Current therapeutic methods lack innovation, especially for addressing diseases that still seek effective clinical alternatives, such as degenerative, genetic, and traumatic conditions. In this sense, the use of iPSCs demonstrates potential for new therapeutic approaches and the promotion of a higher quality of life for patients. The advent of iPSC technology opens up a range of innovations in clinical research, with applications in regenerative medicine, disease modeling, drug development, and basic biology studies, contributing to cutting-edge academic training and the qualification of new professionals in the healthcare field. **Methodology:** This is a narrative literature review and analysis of the Clinical Trials platform. Interventional clinical studies deposited from 2010 to 2024 were analyzed, with or without reported results, ongoing and completed, in phases 1, 2, 3, or 4 of clinical study, regardless of gender and age. **Results and Discussion.** Approximately 30 studies were selected involving the cardiovascular, respiratory, musculoskeletal, integumentary, ophthalmic, hematopoietic, nervous, endocrine, and neoplastic systems. Most were *in vitro* studies, involving the differentiation of new tissues from iPSCs for the treatment of specific diseases, analysis of metabolic response to drugs, and investigation of genetic disease behavior. It was found that the *in vivo* application of iPSCs is still limited by ethical debates and potential oncogenicity due to genetic manipulation. **Conclusion.** Advances have been demonstrated in understanding pathophysiological mechanisms and the clinical application of iPSCs, requiring efforts to ensure their therapeutic potential and *in vivo* use of these cells.

Keywords: Transcription factors. Therapeutics. Pluripotent stem cells. Cell differentiation.

1 INTRODUÇÃO

As iPSC, termo derivado do inglês “*Induced pluripotent stem cell*” traduzido como “células-tronco de pluripotência induzida” são células reprogramadas por processos genéticos e/ou bioquímicos, acessando seus fatores de transcrição que ativam a função de pluripotência, natural das células-tronco embrionárias (ESC) (Fonte, *et al*, 2021). Seu uso se torna convencional pelo fato de poder ser transformada em um tecido biológico de interesse do manipulador através do processo de regressão ao seu estágio inicial de pluripotência.

Células somáticas, previamente diferenciadas, podem ser reprogramadas para sua forma indiferenciada ao se transferir seu núcleo a oócitos ou através de fusão com células-tronco pré-existentes (Takahashi e Yamanaka 2006). Em 2006, Kazutoshi Takahashi e Shinya Yamanaka em seus estudos “*Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors*” descreveram pela primeira vez

os fatores de transcrição que fazem com que qualquer tecido alvo possa ser alcançado a partir do iPSC. Estes fatores ficaram conhecidos como “fatores de Yamanaka” e compreendem: *Oct3/4* (*Octamer-binding transcription factor 3/4*); *Sox2* (*sex-determining region Y*) *c-Myc*, (proteína da família dos oncogenes) e *Klf4* (*Kruppel-like factor 4*).

Em relação às suas funções, foi constatado no estudo de Takahashi e Yamanaka (2006) que o *c-Myc* foi capaz engajar a proliferação e transformação celular através de complexos de histona acetiltransferase. O *Klf4* demonstrou capacidade de supressão da proteína p53, diretamente ligada à supressão da diferenciação de células-tronco. Por sua vez, *Oct3/4* e *Sox2* demonstraram dependência de *c-Myc* no quesito ligação ao seus loci alvo específicos, dependendo assim da acetilação das histonas realizado por *c-Myc*. Neste estudo, os pesquisadores reprogramaram com sucesso uma célula somática em embrionária, abordando não apenas os conceitos metodológicos como todos os embates éticos da presente época (Takahashi e Yamanaka, 2006).

As ESC derivam da massa celular interna de embriões previamente implantados com 4 ou 5 dias de fecundação, os blastocistos (Alves, *et al*, 2019). Ambos os tipos celulares, ESC e iPSC, são pluripotentes, dotados de capacidade de crescimento em colônias multicelulares, além de poder se diferenciar em todas as três camadas germinativas embrionárias, sendo elas ectoderma, mesoderma e endoderma (Shamblott, *et al*, 1998). O ectoderma é o folheto externo, que forma a epiderme, o sistema nervoso central e periférico e os órgãos sensoriais, por exemplo. O mesoderma é o folheto intermediário, que dá origem aos tecidos musculares, tecidos conectivos, ossos, sistema circulatório e órgãos internos, como rins e gônadas. O endoderma é o folheto interno que reveste a cavidade do tubo digestivo, forma o epitélio dos sistemas respiratório, gastrointestinal e urogenital, por exemplo (Langman, J. & Sadler, T. 2018).

A diferença da pluripotência entre as ESC e iPSC se faz no momento em que as ESC são capazes de diferenciar em qualquer tipo celular, inclusive tecidos extraembrionários como o mesoderma extraembrionário, enquanto as iPSC se limitam em formar apenas células dos três folhetos germinativos acima citados (Shamblott, *et al*, 1998; Torres e Pessoa, 2018). Além disto, o custo de “fabricação” das iPSC é alto. Apesar das limitações, o uso das iPSC continua a ser vantajoso devido aos menores riscos de rejeição imunológica, assim como embates éticos envolvidos no uso das ESC (Finotti *et al*, 2015).

No cenário global contemporâneo, segundo Diniz e Avelino (2009), no Brasil as pesquisas com ESC são regidas pela Lei da Biossegurança, nº 11.105, de 24 de março de 2005. Em seu 5º artigo são impostas algumas restrições à manipulação de embriões humanos,

sendo sua produção exclusiva por fertilização *in vitro*, para a posterior coleta de células-tronco. Com o advento do Decreto nº 5.591, de 22 de novembro de 2005, foi regulamentado que só poderão ser utilizados para coleta de ESC *in vitro* aqueles embriões considerados inviáveis decorrentes de alterações genéticas que comprovadamente impediriam o desenvolvimento por ausência de clivagens. No entanto, foi ajuizada a Ação Direta de Inconstitucionalidade nº 3.510 pelo Procurador Geral da República em maio de 2005 como um embate ao artigo 5º recentemente aprovado pela Lei de Biossegurança, argumentando que vida humana estava diretamente ligada à fecundação, logo, fazer uso de células-tronco para fins terapêuticos impossibilitaria o desenvolvimento do embrião e consequentemente da vida.

Em relação aos ensaios clínicos em curso, seu desfecho está repleto de boas prerrogativas e prováveis complicações, no entanto, algumas clínicas precocemente têm se beneficiado da prerrogativa de tratamento, disseminando a ideia entre os pacientes e obtendo lucro financeiro, atitude tal condenada pela Sociedade Internacional para a Pesquisa com Células-Tronco (ISSCR -*International Society for Stem Cell Research*) a menos que haja comprovação da terapia e resultados (Lo e Parham, 2009). Tais estudos clínicos necessitam passar por testes de aprovação, demonstrando os riscos, benefícios e necessitando de consentimento dos voluntários

Além disso, a segurança e a eficácia de novas intervenções devem ser demonstradas em ensaios clínicos bem concebidos e conduzidos por especialistas, com aprovação dos reguladores, antes de as intervenções serem oferecidas aos pacientes em ambientes diretos ao consumidor ou incorporadas nos cuidados clínicos padrão. Finalmente, qualquer teste clínico prematuro de uma nova tecnologia promissora pode comprometer o seu desenvolvimento se surgir algum evento adverso devido à concepção inadequada do ensaio ou ao fabrico do produto. A ciência das células-tronco está melhor posicionada para cumprir o seu potencial aderindo a um conjunto robusto e comumente aceite de diretrizes para o desenvolvimento de terapias baseadas em evidência.

Fonte: <https://www.isscr.org/guidelines/blog-post-title-one-ed2td-6fcdk-5zr5l>
Acesso em 23/03/2024

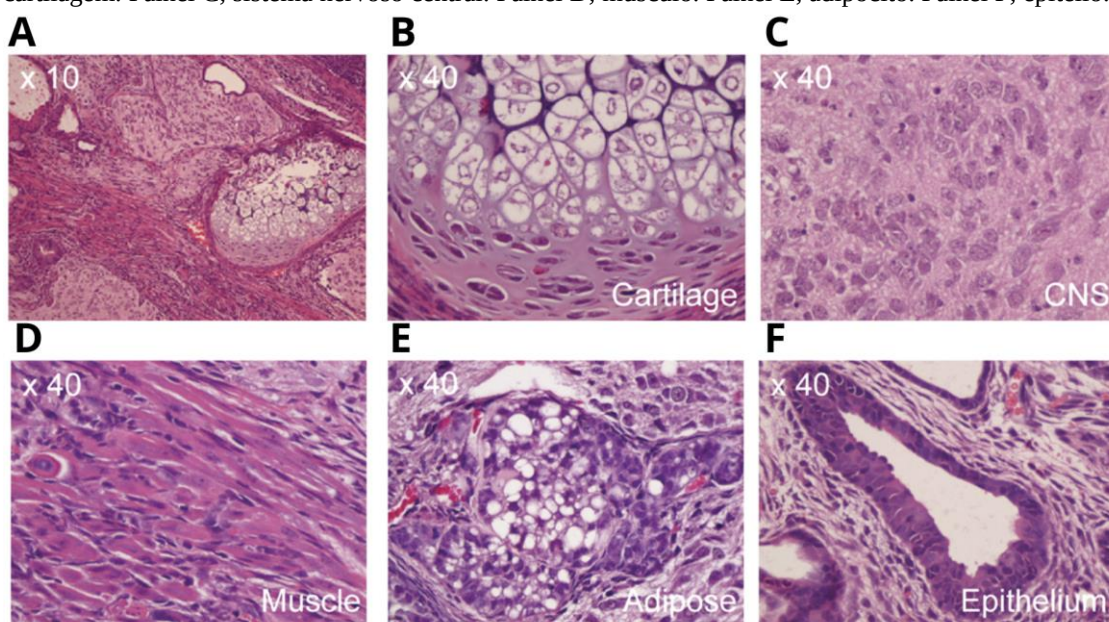
O primeiro transplante de iPSC ocorreu no Japão em 2014 em um paciente de 70 anos de idade diagnosticado com degeneração macular, causando perda de visão progressiva. O procedimento durou cerca de duas horas, sem efeitos adversos no pós-operatório, trazendo, assim, melhoras na morfologia da mácula e na neovascularização, garantindo o Nobel de Medicina ao professor Shinya Yamanaka em 2012 (Gomes, *et al*, 2017).

As iPSC são de extrema importância na medicina regenerativa, tendo o potencial de restituir a função de tecidos debilitados, como constatado por Takahashi e Yamanaka (2006).

Os pesquisadores testaram 24 genes candidatos a indução de pluripotência em células

somáticas e obtiveram a pluripotência em fibroblastos de embrião de camundongo (sendo iPS-MEF10 e iPS-MEF4 as linhagens de iPSC geradas a partir destes fibroblastos), através dos fatores de transcrição *Oct3/4*, *Sox2*, *c-Myc* e *Klf4* (abreviados por OSKM). Dessa forma, como exposto por Gomes e colaboradores (2016) é possível intervir em patologias como degeneração macular, degenerações nervosas crônicas, como o Alzheimer e Parkinson, lesões no cordão espinal, diabetes, infarto do miocárdio, lesões traumáticas em tecidos não regenerativos como o cartilaginoso, dentre outras (Alves, *et al*, 2019). Outrossim, a área da farmacologia se beneficia das vantagens proporcionadas pelos estudos com células reprogramadas que podem gerar tecidos específicos do corpo para avaliação da toxicidade e efeitos colaterais de medicamentos *in vitro* (Miranda, Zapién e Monroy, 2013).

Figura 1 - Tecidos presentes em teratomas derivados de células iPS-MEF4-7. Painei A, teratoma. Painei B, cartilagem. Painei C, sistema nervoso central. Painei D, músculo. Painei E, adipócito. Painei F, epitélio.



Fonte: Takahashi e Yamanaka, 2006. DOI: 10.1016/j.cell.2006.07.024

Como relatado por Miranda (2013), Gomes (2017) e colaboradores, a indução biogenética para que se programe células ao nível de pluripotência se dá a partir da inserção de quatro genes de pluripotência de células-tronco em células somáticas já especializadas, como as células epiteliais a exemplo, convertendo-as em estado embrionário novamente. Fontes e Souza (2021), explicam que os queratinócitos obtidos a partir de folículos capilares são boas fontes de células somáticas a serem induzidas por seu procedimento de retirada ser rápido e pouco invasivo. Silva e Cruz (2019) especificam que os quatro genes externos

introduzidos na célula a ser reprogramada são tratados como fatores de transcrição. Os principais fatores de transcrição utilizados são *Oct3/4*, *Sox2*, *c-Myc*, e *Klf4*, atualmente conhecidos como “Fatores de Yamanaka” como referência ao pesquisador Shinya Yamanaka, descobridor da técnica. Segundo Corbinea e colaboradores (2017), os fatores OSKM são proteínas amplamente encontradas nos organismos vivos. Corbinea reprogramou células testiculares de camundongos utilizando iniciadores de replicação de DNA (primers) específicos aos genes OSKM. O fator *Oct3/4* pertence à família dos fatores *POU* (Pit-Oct-Unc). O *Sox2* é expresso em diversos tecidos do corpo, em especial no sistema nervoso central ainda na época embrionária. Por sua vez, o *c-Myc* é responsável pela regulação do processo de crescimento, proliferação, apoptose celular e, segundo Fontes e Souza (2021), indução da acetilação global de histonas, permitindo assim com que *Oct-4* e *Sox-2* se liguem aos devidos locos gênicos. Por fim, o *KLF4* está presente amplamente no trato gastrointestinal e pele, tendo como funções a regulação do ciclo celular, resposta ao estresse e, segundo Fontes e Souza, 2021, bloqueio da expressão da proteína p53, permitindo assim a diferenciação embrionária.

Lim, e colaboradores (2015) especifica que estes fatores podem ser adicionados à célula alvo por métodos de integração genômico (utilizando retrovírus e lentivírus como co-transportadores) ou por métodos não integrativos, onde pode-se utilizar o vírus da parainfluenza murina tipo 1 (Sendai), Adeno vírus, vetor episomal de DNA de origem extracromossômica, vetor *piggyBac*, DNA em minicírculo, polipeptídeo marcado com poliarginina, RNA mensageiro sintético, dentre outros.

O uso do vírus de RNA Sendai é bastante útil, pois a replicação dos transgenes ocorrerá no citoplasma, não se integrando ao genoma da célula. Por sua vez, os vírus de DNA também podem ser utilizados, sendo detentores de mesma capacidade de não integração ao genoma celular, no entanto, suas taxas de reprogramação e eficiência são baixas, não sendo eficazes. O uso do vetor *piggyBac* também é promissor por sua capacidade de remover sua integração ao genoma celular após a reprogramação, no entanto, há um risco de quebra do gene no local de inserção. Outro vetor seria o DNA circular bacteriano, com grande estabilidade episômica e capacidade de inserção de grandes genes, no entanto, ainda tem baixa eficiência no quesito reprogramação, necessitando de melhores estudos. Quanto ao uso de RNAs modificados em laboratório, Lim, *et al* (2015) afirma que há maiores taxas de sucesso por não existir a chance de ativação de sistemas de defesa anti-virais como nos casos anteriores, fornecendo os genes ao interior celular de forma direta e sem interação genômica.

De acordo com tipo de tecido alvo a ser gerado, os fatores de transcrição podem ser

diferentes. Neste sentido, Zhang, Yamaguchi e Kawabata, 2023, abordaram em seu estudo os processos de maturação de iPSC a partir de células endoteliais da veia umbilical humana em células endoteliais microvasculares do cérebro, tendo os fatores de transcrição SOX 18, Zic3A e Zic3B como proteínas codificadoras de extrema importância no processo de reprogramação, diferentemente do fator SOX 2, componente básico da tétrade de Yamanaka. O gene *SOX18* atua na tradução da proteína SOX18, necessário para o desenvolvimento de vasos sanguíneos e linfáticos na fase de embriogênese, assim como na angiogênese que ocorre na cascata de coagulação e processo de regeneração tecidual.

Lim, *et al* (2015) afirma que para se induzir tecido cerebral é necessário reprimir a tradução de certas proteínas, como as da família Wingless (Wg) e Integrase (Int), compondo as proteínas Wnt e a BMP (do inglês *Bone Morphogenetic Protein* que significa proteína Morfogênética Óssea) que fazem parte da família do fator de crescimento transformador-beta (TGF- β), habitualmente responsáveis pela osteogênese e condrogênese.

Barba e colaboradores (2021) demonstraram que para se reprogramar fibroblastos afim de torna-los células dopaminérgicas, se insere através dos métodos de integração genômico ou não genômico os fatores OSKM e adiciona-se outros fatores como o SHH (*Sonic Hedgehog*), fator de crescimento de fibroblastos 8 e fator neurotrófico derivado do cerebelo. Em seguida, é feito o cultivo *in vivo* e *in vitro* para, posteriormente, aplicação terapêutica.

Duelen e Sampaolesi (2017), afirmam que a diferenciação de iPSC em cardiomiócitos se dá a partir da presença de fatores cruciais como a família das proteínas TGF- β incluindo principalmente a proteína BMP4 e proteína Nodal. Sua estimulação em determinada ordem teria como resultado a formação do mesoderma cardíaco, sendo de forma sistemática pela adição da activina que funcionará como segundo mensageiro, ativando a via nodal, expressando enfim a proteína BMP4.

2 JUSTIFICATIVA

As iPSC tem ganhado atenção no cenário científico a nível de Brasil e mundo, decorrente da ampla gama de possibilidades de suas aplicações práticas desde suas aplicações clínicas evidenciadas por Shinya Yamanaka em 2006. No panorama da época e até nos dias atuais, existem embates éticos envolvidos na elaboração das pesquisas e realização dos ensaios clínicos. Tais embates permeiam o limite onde se pode manipular embriões e células pluripotentes a fim de ter acesso a novos tecidos, sem desrespeitar dessa forma o direito à vida, visto as atuais discussões sobre a exata faixa etária onde um embrião pode ou não ser considerado ser humano, baseando-se em seu desenvolvimento embrionário. Estes mesmos

embates estão submetidos às respectivas leis locais de cada país envolvido, podendo haver modificações de alguns quesitos a serem considerados, mas nunca desconsiderando os direitos humanos e o direito à vida. No entanto a técnica desenvolvida por Yamanaka para a geração de iPSC, utilizando fatores de transcrição específicos, abriu novas possibilidades para a pesquisa e terapia celular, evitando a necessidade de utilizar células-tronco embrionárias, que levantavam questões éticas e práticas. As formas terapêuticas atuais, presente na medicina e biologia molecular, carecem de atualização em diversos cenários, o que leva os profissionais em suas respectivas áreas de atuação a optarem por formas muitas vezes arcaicas ou pouco eficazes na recuperação de um paciente ou até mesmo no desenvolvimento de novas formas de tratamento e cura de doenças até então consideradas crônicas e irreversíveis. A exemplo, enxertos, que podem ser classificados como autógeno, onde o tecido ou órgão é transplantado do próprio indivíduo receptor, impossibilitando a rejeição imunológica (Zeng, *et al*, 2016); alógeno, onde o tecido é obtido de um doador pertencente à mesma espécie, porém geneticamente diferente do receptor, seja ele vivo ou morto, fazendo-se necessário medicamentos imunossupressores para reduzir a rejeição imunológica (Schmitz, *et al*, 2018); xenógeno onde um tecido ou órgão é transplantado de uma espécie para outra espécie diferente, havendo a possibilidade de induzir uma reação imunológica (Rodolfo, *et al*, 2017). Analisando o potencial das células tronco pluripotentes induzidas e suas diversas áreas de aplicação, observa-se um novo futuro disponível a nível molecular e biológico, sendo possível o desenvolvimento de novos tecidos para transplante e suas mais variadas formas de tratamento, fazendo-se necessários estudos mais aprofundados sobre a temática afim de conhecer seus limites de atuação e possibilidades terapêuticas.

3 OBJETIVO GERAL

Avaliar a aplicação das iPSC na clínica humana por meio da análise de estudos clínicos depositados no *Clinical Trials*.

3.1 Objetivos específicos

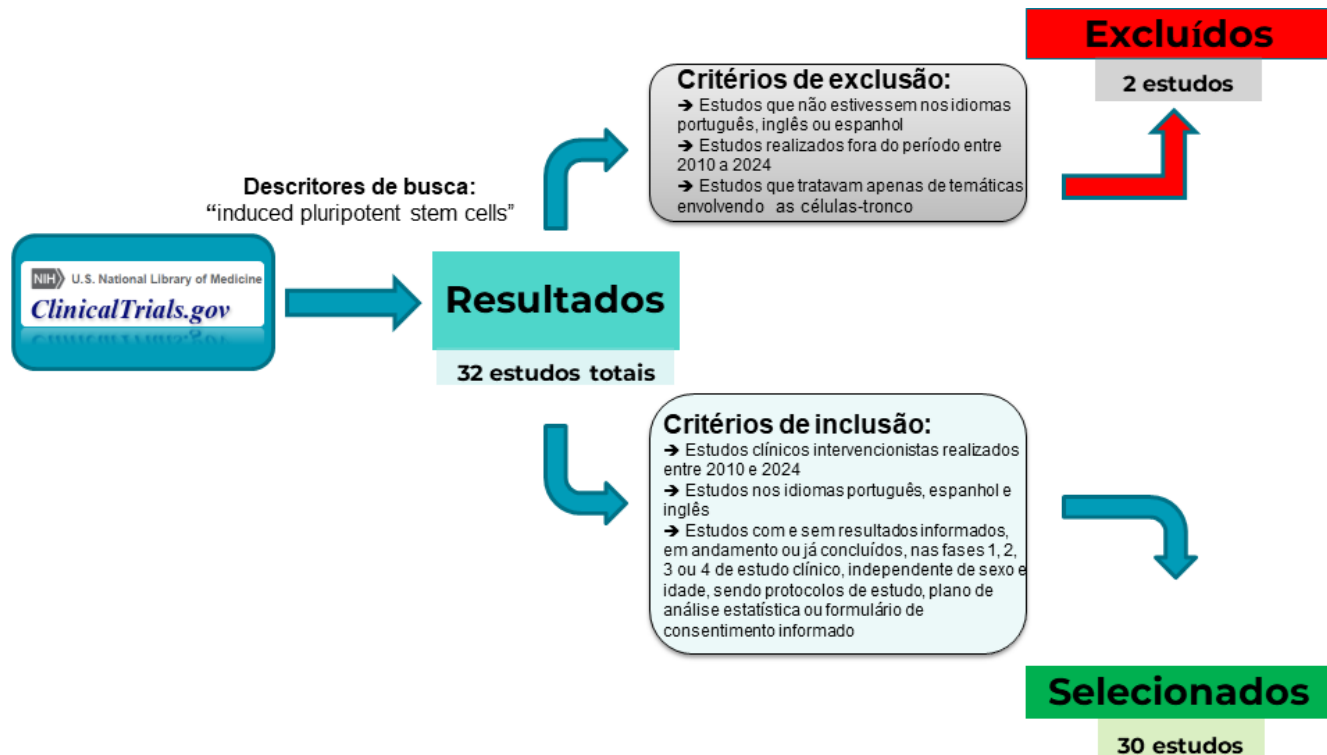
1. Evidenciar as aplicações das iPSC na clínica humana.
2. Caracterizar o perfil de doenças candidatas ao tratamento com iPSC.
3. Analisar as vantagens e desvantagens do uso das iPSC na clínica humana.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

O presente estudo trata-se de uma revisão narrativa de literatura e análise do uso das iPSC na medicina regenerativa utilizando a plataforma *Clinical Trials* do *National Institutes*

of Health (NIH - agência do Departamento de Saúde e Serviços Humanos dos EUA, sendo a principal agência de financiamento de pesquisa biomédica e de saúde do país). No estudo destacou-se as vantagens e desvantagens da proposta, bem como o cenário atual do uso das iPSC em estudos clínicos no mundo. Os critérios de inclusão correspondem a estudos clínicos intervencionistas realizados entre 2010 e 2024 nos idiomas português, espanhol e inglês, com e sem resultados informados, em andamento ou já concluídos, nas fases 1, 2, 3 ou 4 de estudo clínico, independente de sexo e idade, sendo protocolos de estudo, plano de análise estatística ou formulário de consentimento informado (Figura 2). Por sua vez, os critérios de exclusão foram estudos que não estivessem nos idiomas português, inglês ou espanhol, que foram realizados fora do período entre 2010 a 2024 e estudos que tratavam apenas de temáticas envolvendo as células-tronco, não abordando assim sua indução tornando-as pluripotentes. Foi utilizado como banco de dados o *Clinical Trials*. O descritor de busca utilizado foi "*Induced pluripotent stem cells*". Nesta plataforma é possível utilizar filtros de busca, sendo escolhidas as opções "all" no campo *sex*, "*interventional (Clinical Trial)*" no campo *study type* e "all" no campo *study results*, deixando as demais opções em aberto para que também fossem incluídas na triagem. Após as buscas, foi feita uma seleção inicial baseada nos critérios de inclusão e exclusão do estudo para assim selecionar aqueles que devidamente correspondiam. Foram encontrados 32 estudos intervencionistas ao se aplicar o filtro. Feita a análise dos dados conforme critérios de inclusão e exclusão estabelecidos, foram selecionados os estudos, tendo seu processo de triagem esquematizado na figura abaixo:

Figura 2 - Diagrama da seleção dos artigos para o presente estudo baseado nos critérios de inclusão e exclusão

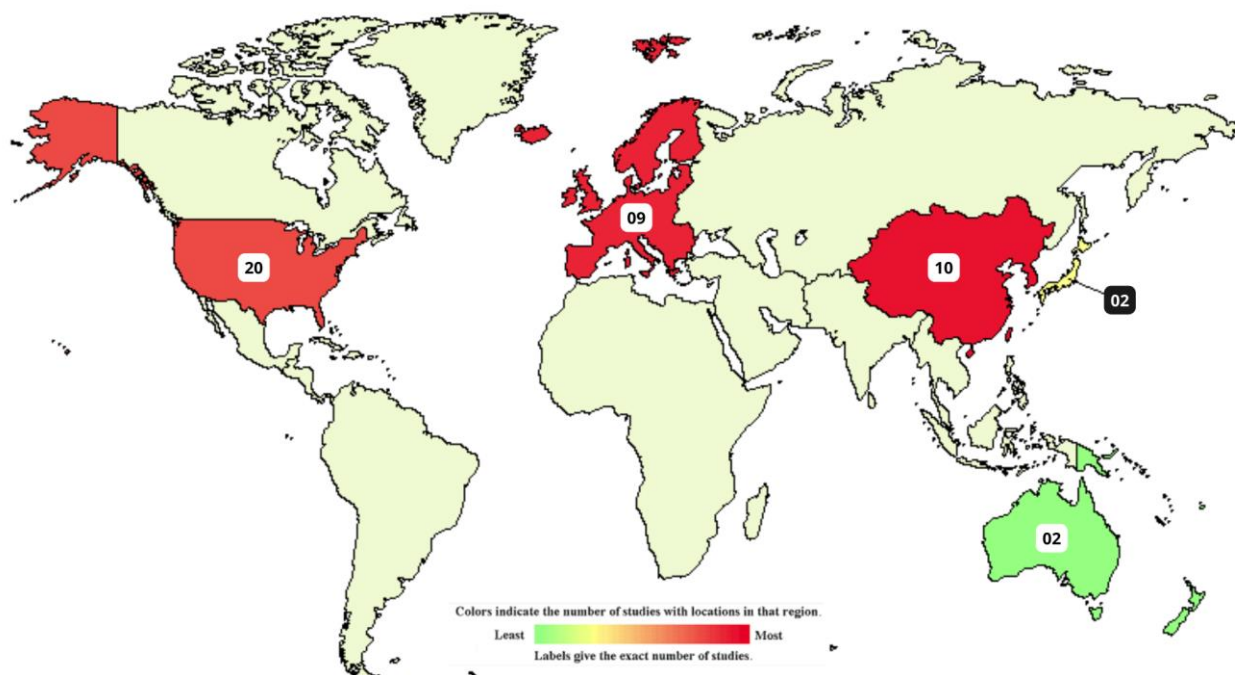


Fonte: Autoria própria

5 RESULTADOS

Em busca realizada no dia 19/03/2024, foram encontrados 43 ensaios clínicos intervencionistas com iPSC, distribuídos nos continentes Americano, Europeu, Asiático e Oceania (Figura 3).

Figura 3 - Mapa mundial de estudos clínicos com células-tronco de pluripotência induzida



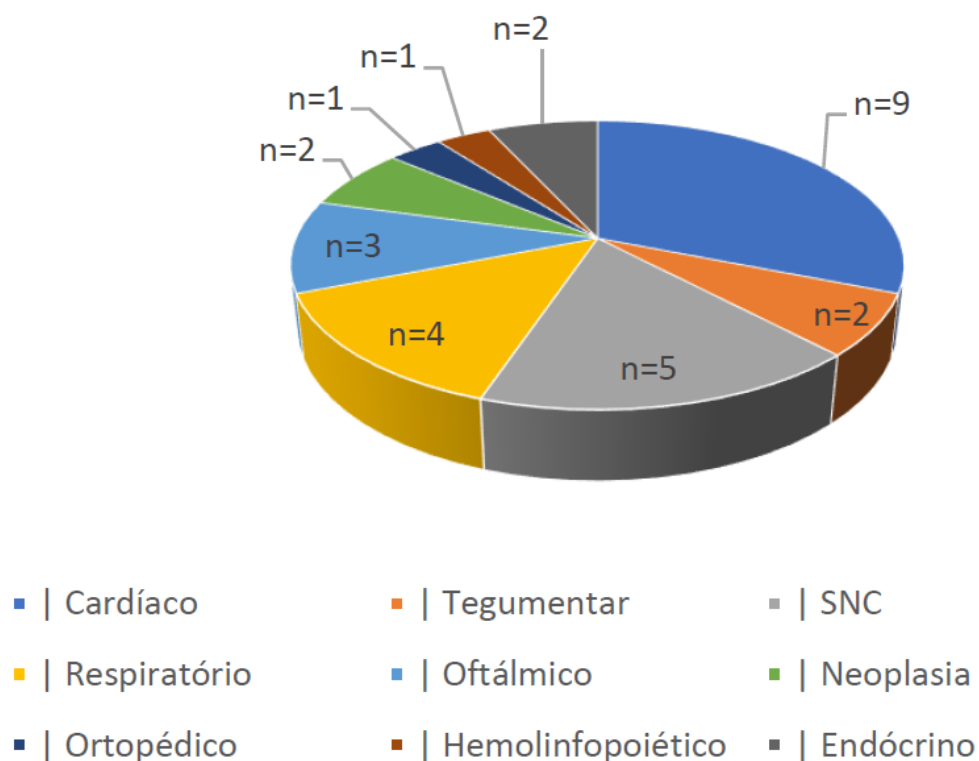
Fonte:

<https://classic.clinicaltrials.gov/ct2/results/map?type=Intr&cond=induced+pluripotent+stem+cells&map=1> (modificado pelo autor). Acesso em 19/03/2024

Apesar da Ásia e Europa apresentarem mais que o dobro de estudos (sendo 10 e 9 estudos respectivamente) comparados à Austrália e Japão, o continente Norte Americano foi o que demonstrou maiores índices absolutos assim como uma distribuição mais homogênea dentre do território dos Estados Unidos da América. Quantitativamente pode-se calcular a distribuição em 46,5% exclusivamente na América do Norte, seguido por 20,9% na Europa, Leste da Ásia com 23,2% e na Austrália e Japão sendo 4,65% para ambos.

Foi possível realizar a revisão particular de cada estudo disponibilizado pelo site, sendo assim separados mediante sistema orgânico abordado, encontrando-se as seguintes porcentagens:

Gráfico 1: Estudos encontrados no *Clinical Trials*, distribuídos por sistemas orgânicos.



Fonte - Autoria própria

Um estudo clínico feito pela *University Hospital, Montpellier* (França) iniciado em 25/09/2017 envolveu 24 participantes, sendo crianças de 0 a 17 anos de ambos os sexos. Foram separados dois grupos, sendo o primeiro composto por crianças com cardiomiopatia congênita, com critério de exclusão cardiomiopatia de origem não congênita. O segundo grupo com crianças saudáveis, sendo o critério de inclusão exame clínico, eletrocardiograma e ecocardiografia sem alterações e critérios de exclusão sendo quaisquer doenças no coração, muscular, sistema respiratório ou doenças crônicas. Em ambos os grupos de crianças as seguintes intervenções foram feitas: teste cardíaco (eletrocardiograma e ecocardiograma), exame físico realizado pelo investigador e exame de sangue no intuito de gerar cardiomiócitos a partir de iPSC. O objetivo do estudo foi estudar os mecanismos moleculares das cardiomiopatias de origem genética e seu status atual se encontra completo. Em relação aos resultados, foi feita a análise da Distrofia Muscular de Duchenne, uma cardiomiopatia

congênita ligada ao cromossomo X que leva à cardiomiopatia dilatada. A partir de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) foram geradas as iPSC para a diferenciação em cardiomiócitos. A pluripotência das iPSC foi constatada pelo fato dessas células conseguirem se diferenciar nas três camadas germinativas e pela formação de corpos embrionários.

O *Centre Hospitalier Universitaire de Grenoble*, na França, realizou um estudo clínico em setembro de 2015 com quatro participantes com o objetivo de avaliar as mutações gênicas responsáveis pelo retardo mental através das iPSC. O público-alvo foram crianças, adultos e idosos de todos os sexos, sendo os critérios de inclusão: deficiência intelectual e/ou sinais associados submetidos a análise cromossômica via CGH *array*, revelando mutações gênicas de caráter desconhecido responsáveis pelo quadro clínico. Seus critérios de exclusão foram pessoas que sofriam de infecções agudas para a realização de biópsia cutânea sob anestesia local, pessoas com um distúrbio de hemostasia adquirido ou induzido, pessoas em tratamento com agentes anticoagulantes e pessoas com uma mutação no gene *MYT1L*. O objetivo do estudo foi desenvolver uma nova ferramenta para analisar o impacto funcional das mutações gênicas nos respectivos níveis de retardo mental através da diferenciação neuronal com iPSC. Chambers, *et al*, 2009, realizou uma transdução lentiviral de fibroblastos pulmonares fetais humanos através de inibidores da sinalização celular de SMAD's utilizando os fatores *cMYC*, *KLF4*, *OCT4* e *SOX2*. Assim, foram produzidos clones de iPSC (iPSC14, iPSC27), ambos expressando marcadores de pluripotência capazes de se diferenciar nas três camadas germinativas. Após a manipulação de densidade e fatores de padrão, as células iPSC obtidas foram induzidas a gerar progenitores de crista neural (HNK1+) e subtipos de neurônios (somáticos e dopaminérgicos).

Não menos importante, o Hospital Universitário de *Montpellier* em colaboração com o Instituto Nacional de Saúde e Pesquisa Médica da França em 03/11/2014 envolveu 150 participantes em um estudo clínico visando gerar modelos moleculares humanos de retinas saudáveis e doentes para avaliar a abordagem da terapêutica genética a essas doenças (quadro 1). Incluíram-se nos critérios pessoas com coroideremia, outras distrofias retiniais hereditárias e retinopatia óptica hereditária, todas entre 5 e 70 anos de idade de ambos os sexos. A única intervenção clínica realizada foi a extração de biópsia de pele sob anestesia, onde posteriormente, seriam isolados os fibroblastos e reprogramados a estágio de pluripotência. Até o momento não foram reportados resultados. Anos depois, em 29/11/2022 este mesmo hospital universitário deu início ao processo de obtenção de epitélio brônquico funcional a partir de iPSC, tendo sua origem do epitélio nasal (quadro 1). Foi realizado o estudo clínico com quatro participantes, sendo os critérios de inclusão adultos de 18 a 85 anos de idade com

asma severa diagnosticada, aspergilose broncopulmonar alérgica (ABPA) e ao menos 2 dos seguintes critérios acessórios: Contagem de eosinófilos no sangue > 500 células/ μ l, presença de anticorpos precipitantes ou IgG sérica para *Aspergillus fumigatus* e anormalidades radiológicas documentadas consistentes com ABPA. O objetivo do estudo foi validar o desenvolvimento de um modelo de epitélio brônquico gerado a partir de pacientes com doença pulmonar crônica *in vitro*, sendo a intervenção uma amostra de sangue extraída dos quatro participantes. Até o dado momento não foram reportados resultados.

O Centro Internacional de Pesquisa em Transplantes de Sangue e Medula Óssea realizou um estudo chefiado pelo Dr. Dennis Confer em 13/01/2017 onde participaram 19 pessoas de 18 a 61 anos de idade de ambos os sexos, sendo o critério de inclusão biológico possuir um haplótipo HLA de interesse para o estudo e os critérios de exclusão sendo gravidez e ter um histórico anterior de transplante de medula óssea ou câncer de qualquer tipo. O objetivo do estudo foi coletar haplótipos HLA homozigotos para criação de banco de iPSC imune. Até o dado momento não foram postados resultados.

Em outubro de 2010 o Hospital Universitário, *Grenoble Alpes* realizou um estudo multicêntrico descritivo piloto não randomizado envolvendo três participantes com o objetivo principal de estudar o impacto dos déficits proteicos Nox2 e p22phox, na fisiopatologia dos neurônios de células pluripotentes induzíveis da medula óssea ao longo de 1 ano. No estudo foi realizada a coleta de biópsia de cabelo e pele como método intervencionista em pacientes com doença granulomatosa crônica ligada ao cromossomo X ou devido às formas autossômica recessiva (AR) AR220, AR470 e AR670. Seus critérios de inclusão foram pessoas com doença granulomatosa crônica (DGC) diagnosticada com origem genética indeterminada; já seus critérios de exclusão foram pessoas com infecção ativa do sítio de biópsia que impediria a extração e comprometimento da hemostasia inata ou medicamentosa. Até o momento, resultados não foram reportados.

Quadro 1 - Perfil dos estudos clínicos intervencionistas utilizando iPSC completos e em andamento

	Estudo			
	<i>“Modeling Bronchial Epithelium in Severe Asthma With Human Induced Pluripotent Stem Cells”</i>	<i>“Autologous Induced Pluripotent Stem Cells of Cardiac Lineage for Congenital Heart Disease”</i>	<i>“iPS Cells of Patients for Models of Retinal Dystrophies”</i>	<i>“Generation of an Induced Pluripotent Stem (iPS) Cell Bank Immune Matched to a Majority of the US Population”</i>
Condição/ Doença	Aspergilose Broncopulmonar Alérgica (ABPA)	Coração univentricular	Distrofia retiniana	Múltiplas doenças
Número de Participantes	4	24	150	19
Tipo de célula reprogramada	Epitélio nasal	PBMC (3mL)	Biópsia de pele	PBMC (250mL)
Resultado Esperado	Obtenção de epitélio brônquico funcional de iPSC	Gerar, através de iPSC cardiomiócitos "específicos do paciente" para estudar os mecanismos moleculares das cardiomiopatias de origem genética	Gerar modelos celulares humanos de retinas saudáveis e doentes e realizar estudos para avaliar a eficiência de abordagens de terapia genética para diferentes doenças	Coletar haplótipos HLA homozigotos para criação de banco de iPSC imune
Status do estudo	Completo	Recrutamento	Recrutamento	Terminado
Fase clínica	Não aplicável	Fase 1	Não aplicável	Não aplicável
Local	<i>University Hospital, Montpellier, France</i>	<i>Mayo Clinic, Rochester, Minnesota, United States</i>	<i>University Hospital, Montpellier, France</i>	<i>Center for International Blood and Marrow Transplant Research, Milwaukee, Wisconsin United States</i>

Fonte: Autoria própria. Dados Disponíveis em:

https://classic.clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=ipsc&age_v=&gndr=&type=Intr&rslt=&Search=Apply

6 DISCUSSÃO

Ao analisar a distribuição geográfica dos estudos clínicos intervencionistas via mapeamento realizado pelo *Clinical Trials* é visível sua disposição heterogênea no mapa, tendo maior concentra no continente norte americano em relação aos demais países, sugerindo um investimento maior de pesquisas com iPSC e/ou na área científica como um todo nos EUA.

Um estudo realizado por Miranda, Zapién e Monroy (2013) evidenciou desde 1994 do uso de células-tronco adultas na engenharia de tecidos, utilizando fatores de crescimento para induzir a diferenciação celular em condrócitos, gerando por fim cartilagem *in situ*. O mesmo autor também certifica que o uso de células-tronco derivadas de medula óssea em corações lesionados de ratos gerou reparação do miocárdio pela diferenciação das mesmas em cardiomiócitos, assim como sua fusão com as células cardíacas ali presentes (quadro 2). Dessa forma, em consonância com o estudo clínico feito pela *University Hospital, Montpellier* (França) a mesma técnica pode ser aplicada clinicamente, em hipótese, a pacientes com malformações cardíacas congênitas como coração univentricular ou a própria Distrofia Muscular de Duchenne.

Pacientes com transtorno do espectro autista (TEA) tem mutações do gene *SHANK3* gerando danos aos canais catiônicos presentes no processo de hiperpolarização neuronal, evidenciando que pacientes com TEA apresentam *déficits* na transmissão sináptica, redução do tamanho dos corpos celulares dos neurônios, redução da densidade dos dendritos e axônios assim como redução das correntes de Na^+ (Fontes e Souza, 2021). Não menos importante, Alves, *et al* (2019) afirma que o uso terapêutico de iPSC pode ser viável no tratamento de quadros de ataxia cerebelar em um futuro próximo. Porém, devido à complexidade do cultivo *in vitro* de células de Purkinje o uso de iPSC torna-se viável, embora o cenário atual seja especulativo e voltado para análise do comportamento da doença no encéfalo. Nesse sentido, seria viável a utilização de iPSC a fim de se esclarecer os princípios das mutações gênicas, assim como possíveis terapêuticas moleculares para indivíduos com TEA, retardo mental e/ou ataxia cerebelar, através da diferenciação em novos neurônios ou estudo dos mesmos.

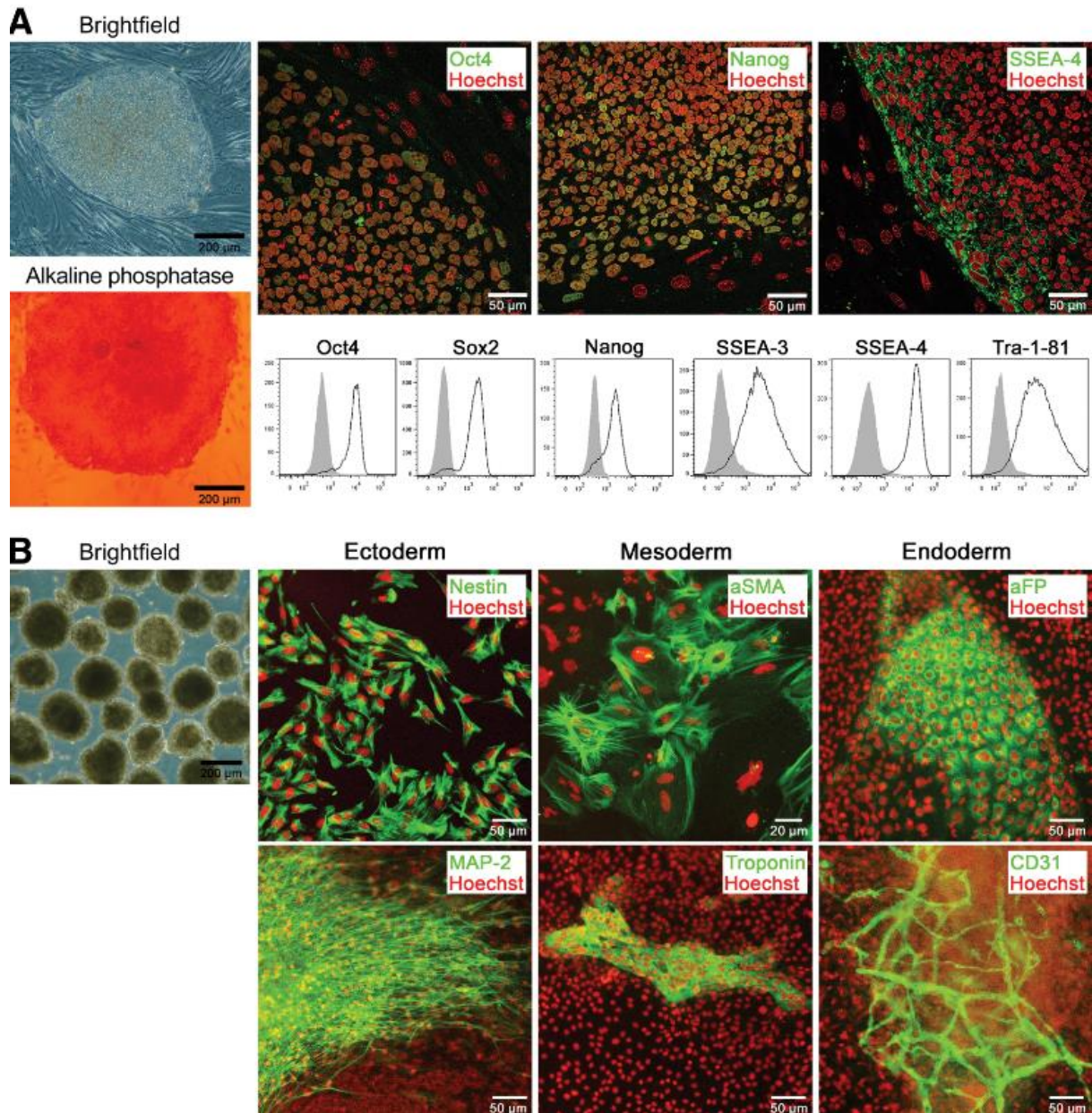
As fontes celulares para a geração de iPSC são diversificadas. Constata-se que PBMC (célula mononuclear do sangue periférico) retiradas de pacientes com anemia falciforme puderam ser convertidas em iPSC através de meio de cultura específico. No caso, foi acrescentado ao meio cerca de 0,05% de álcool polivinílico (PVA) e 0,5% de albumina humana, o que gerou um aumento do crescimento celular, tendo a finalidade de induzir a formação de células de linhagem mesodérmica. Assim, foram identificadas quantidades

consideráveis de células CD34⁺/ CD45⁺ mesodérmicas do dia 8º ao 14º de diferenciação na cultura (Paes, *et al*, 2020) (quadro 3). Em outro estudo realizado por Kim, *et al*, (2023) foi observado o desenvolvimento de células hepáticas a partir de iPSC humanas, gerando células de morfologia semelhantes às células estreladas (ou células de Ito). No caso, as células de Ito são basicamente espécies de pericitos especializados residentes no fígado e, no experimento em questão, foram produzidas em cultura utilizando como fonte pericitos na presença de PDGFBB (fator de crescimento derivado de plaquetas) e β -FGF (fator de crescimento fibroelástico básico que induz síntese de colágeno e elastina). Foi constatado ao final de 12 dias de cultura a expressão de múltiplas células estreladas hepáticas (quadro 3). Associando ao estudo realizado pelo Centro Internacional de Pesquisa em Transplantes de Sangue e Medula Óssea (EUA) que utilizou haplótipos específicos a partir de amostra de sangue periférico no intuito de produzir um banco de células imune, seria possível aplicação clínica hipotética da diferenciação de iPSC em novas células de Ito. Isto permitiria uma melhor análise terapêutica molecular em doenças hepáticas como hepatite crônica, esteatose hepática não alcoólica (NAFLD), hepatite autoimune, doença de Wilson, dentre outras (Kim, *et al*, 2023).

Embora o ensaio clínico de 2010 do Hospital Universitário, Grenoble Alpes (que estudou o impacto dos déficits proteicos Nox2 e p22phox, na fisiopatologia dos neurônios provenientes de iPSC da medula óssea) não tenha demonstrado resultados, um estudo relacionado foi publicado por Brault e colaboradores (2014), onde realizaram a gênese de neutrófilos e macrófagos funcionais a partir de células retiradas de pacientes com doença granulomatosa crônica (DGC) ligada ao cromossomo X e à forma autossômica recessiva (AR) AR220 e AR470. Como resultado, foram gerados 2 a 3 clones de cada linhagem de células a partir das iPSC reprogramadas de fibroblastos de doadores portadores da DGC, expressando alta atividade da enzima fosfatase alcalina e marcadores de pluripotência como *Oct4*, *Sox2*, *Nanog*, *SSEA-3*, *SSEA-4* e *Tra-1-81*, após cultivo em cultura *in vitro* (figura 4-A). Posteriormente, identificaram células originárias dos três folhetos germinativos (ectoderma, mesoderma e endoderma) ao se aplicar marcadores específicos de linhagem à microscopia (figura 4-B). Neste estudo, células foram classificadas como progenitoras CD34⁺ a partir de iPSC utilizando marcação com microesferas magnéticas CD34, dando origem assim a unidades formadoras de colônia. Sua diferenciação hematopoiética pôde ser induzida com co-cultura com células estromais de medula óssea de camundongo, sendo evidenciada pela redução de marcadores de pluripotência e pelo aparecimento do marcador hematopoiético CD34, por meio da citometria de fluxo, no dia 7, 10 ou 13 da co-cultura com células

medulares de camundongo. Assim, seu sucesso foi alcançado pela diferenciação final em neutrófilos e macrófagos *in vitro*.

Figura 4: Caracterização fenotípica e funcional de células de pluripotência induzida. Painel A, atividade da fosfatase alcalina e marcadores de pluripotência *Oct4*, *Sox2*, *Nanog*, *SSEA-3*, *SSEA-4* e *Tra-1-81*, evidenciados por microscopia de fluorescência. Painel B, células originárias do ectoderma, mesoderma e endoderma, evidenciados por marcadores específicos em microscopia de fluorescência.



Fonte: BRAULT, *et al* (2014). Acesso em 30/03/2024

Quadro 2 – Principais experimentos realizados e suas respectivas aplicações clínicas, segundo autores.

	Experimento	Aplicação clínica
Miranda, Zapién e Monroy (2013)	Uso de iPSC derivadas de medula óssea em corações lesionados de ratos geraram reparação do miocárdio pela diferenciação das mesmas em cardiomiócitos.	Uso em pacientes com malformações cardíacas ou incidentes cardíacos
Alves, et al (2019)	Indução de células epiteliais e sanguíneas em progenitores dopaminérgicos para transplante em macacos com mal de Parkinson, evidenciando uma melhora dos movimentos voluntários nos mesmos	Possíveis terapêuticas moleculares para indivíduos com mal de Parkinson (evidencia de melhora dos movimentos voluntários em macacos)
Kim, et al, (2023)	Desenvolvimento de células hepáticas a partir de iPSC humanas obtidas de pericitos na presença de PDGFBB, gerando células de morfologia semelhante a células de Ito	Melhora na análise terapêutica molecular de hepatopatias como hepatite crônica, esteatose hepática não alcoólica (NAFLD), hepatite autoimune, doença de Wilson, dentre outras
Paes, et al (2020)	iPSC gerada a partir de PBMC de paciente com anemia falciforme, originando células CD34+/ CD45+ mesodérmicas	Gênese de células progenitoras hematopoiéticas, originando colônias celulares viáveis de células CD36+, CD71+ e CD235a+
Takahashi e Yamanaka (2006)	Reprogramação de células maduras, como fibroblastos da pele, para estado pluripotente, através da introdução de quatro fatores de transcrição específicos (<i>Oct 3/4</i> , <i>Sox2</i> , <i>c-Myc</i> e <i>Klf4</i>)	Controle da pluripotência, permitindo eventualmente gerar iPSC a partir de células somáticas do paciente
Zhang, Yamaguchi e Kawabata, (2023)	Maturação de iPSC a partir de células endoteliais da veia umbilical humana usando os fatores de transcrição SOX 18, Zic3A e Zic3B	Fenótipos de barreira hematoencefálica
Lim, et al (2015)	Obtenção de células somáticas a partir de PBMC e posterior incorporação genômica via vetores retrovirais, lentivirais e vetores virais não integradores como vírus Sendai ou Adenovírus	Modelagem morfofisiológica neuronal de pacientes com TEA para detecção de anormalidades funcionais

Fonte: Autoria própria

É importante citar a reprogramação celular na ausência de fatores de indução, tendo as nuances ambientais do meio como determinantes no processo de diferenciação em iPSC, como constatado por, Roy, *et al* (2017) que demonstraram o processo de reprogramação nuclear de células somáticas em iPSC *in vitro*. Ao fazer a análise *in vivo* foi observado que as células transdiferenciam em diferentes linhagens na ausência de fatores exógenos, concluindo que os fatores mecano-químicos locais tiveram influência no processo de diferenciação de linhagens celulares.

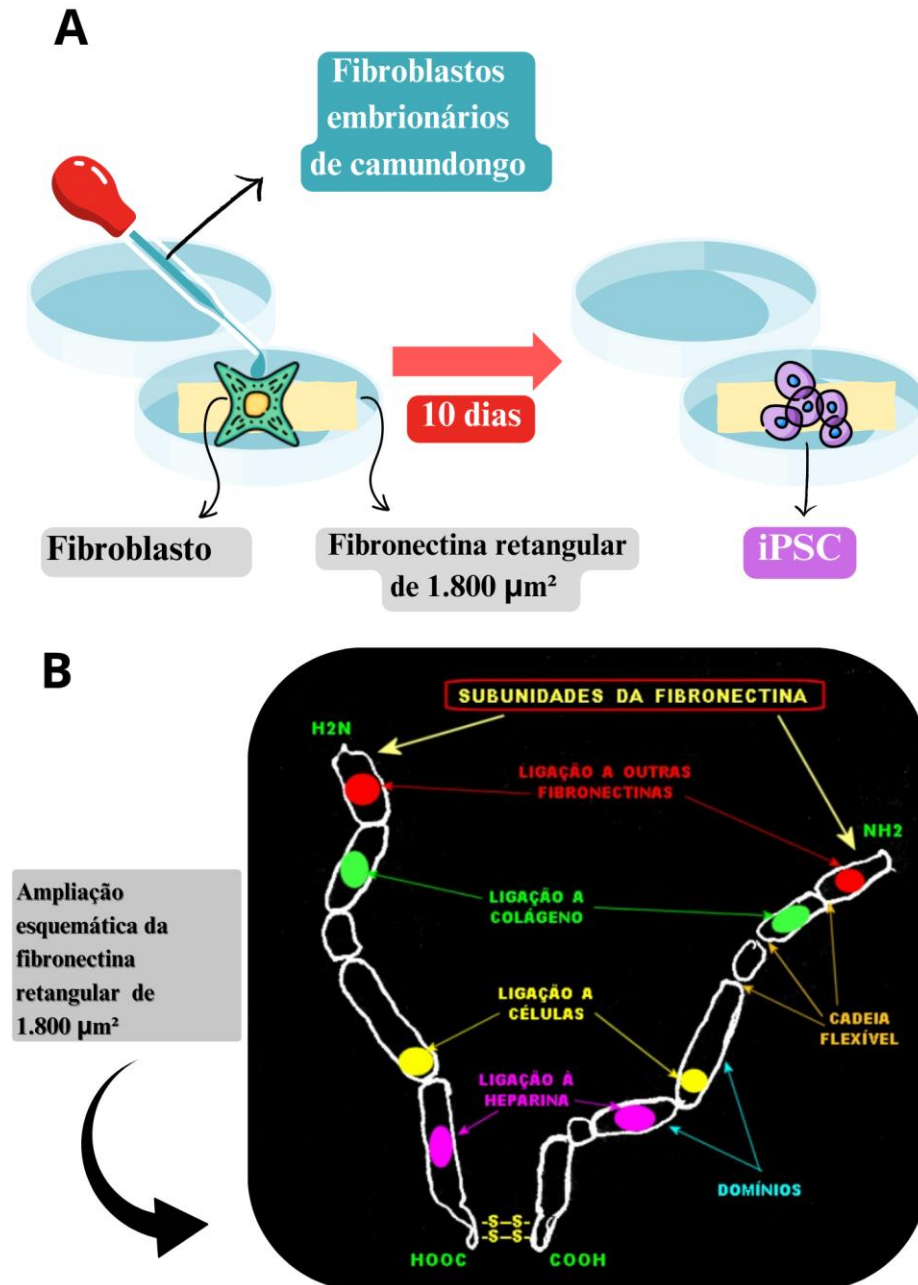
A rigidez da matriz, a forma da célula e a topografia da superfície têm sido demonstradas como direcionadores da diferenciação de células-tronco *in vitro* (ROY *et al*, 2017).

Nesse estudo, foram utilizados fibroblastos embrionários de camundongo cultivados em micro padrões revestidos com fibronectina (matriz extracelular) com o intuito de comprovar a possível reprogramação nuclear na ausência de fatores de reprogramação exógenos, como os fatores OSKM. Na procura pela geometria molecular ideal para a diferenciação dessas células em cultivo dentro da placa de *Petri* foi encontrado um retângulo de 1.800 μm^2 com uma proporção de aspecto de 1:5, sendo este composto por matriz extracelular onde os fibroblastos embrionários seriam cultivados. Foi evidenciada a proliferação celular pela marcação de níveis crescentes de antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) assim como a mudança na topografia celular.

Essa técnica tem sido amplamente utilizada para demonstrar que a área de expansão celular pode direcionar a apoptose e a proliferação celular. Experimentos recentes mostraram que a geometria celular pode modular a organização do citoesqueleto, a morfometria nuclear, a organização cromossômica tridimensional, perfis epigenéticos e, o que é mais importante, o perfil de transcrição das células. (ROY *et al*, 2017)

As células ficaram em cultura por 10 dias, onde aos poucos foi observado uma progressão do transcriptoma mesenquimal para o de células-tronco (figura 5). Também foi observado outras propriedades semelhantes às células-tronco como a expressão de marcadores de pluripotência. Assim, foi demonstrado que a reprogramação mecânica de células somáticas foi possível, podendo ser mantidas como células-tronco e diferenciadas em múltiplas linhagens com alta eficiência.

Figura 5 - Progressão do transcriptoma mesenquimal para o de células-tronco. Painei A, ampliação estrutural da fibronectina. Painei B, ampliação por microscopia eletrônica dos micropadrões revestidos com fibronectina (matriz extracelular).



Fonte: Painei A, autoria própria. Painei B, <https://anatpat.unicamp.br/nptfibrocondromixo1e.html>. Acesso em 18/01/2024

Existe um grande dilema ético presente na tecnologia da iPSC, como afirmado por Silva, *et al* (2022) que traz o âmbito legal como um impasse e que deve receber a devida atenção. O autor refere-se aos casos de menores de idade, estabelecido em 18 anos pelo código civil brasileiro de 2002:

O processo decisório em Pediatria é complexo perante o Código Civil brasileiro de 2002, que considera os menores de 16 anos incapazes de exercerem pessoalmente os atos da vida civil. Já os adolescentes entre 16 e 18 anos são incapazes relativamente a certos atos, ou à maneira de exercê-lo. Assim, as crianças e os adolescentes não podem decidir sobre as questões referentes à sua saúde, cabendo aos pais, no exercício do poder familiar e usando critérios de melhor interesse, decidirem pelos filhos. (SILVA, *et al*, 2022)

Uma grande vantagem do uso das iPSC sobre as ESC seria nas menores implicações éticas. Barbosa e Nunes (2023) trazem à tona a Lei da Biossegurança n.º 11.105, de 24 de março de 2005 que controla o uso das ESC e estabelece suas limitações, onde se determina o uso de embriões inviáveis para reprodução, ou seja, aqueles que após submetidos a métodos diagnósticos foi comprovada alterações genéticas que interrompem o processo de clivagem. Logo, só são utilizadas ESC com 4 a 5 dias de gestação, pois ainda não foram desenvolvidas estruturas complexas como coração. Dessa forma, o embate se estabelece a partir do momento que se impõe a exatidão dos dias em que se inicia a vida, questionando-se se aquele embrião já constitui uma entidade portadora de direitos. Com o uso das iPSC esses dilemas inexistem, abrindo maior margem para pesquisa e aplicação.

Uma desvantagem que se deve ressaltar foi citada por Torres e Pessoa (2018) referindo-se ao alto custo de fabricação e reprogramação das iPSC por ser um método de pesquisa científica relativamente novo. Outro fator seria o longo tempo de espera entre coleta e transplante, sendo a taxa mínima de 3 meses para aplicação prática. Além disto, o autor também traz como ponto negativo o surgimento de células cancerígenas, caso se utilize de vetores retrovirais para implementação ao genoma. Gomes, *et al* (2017) também discute a geração de células cancerígenas a partir de mutações mediante a manipulação incompleta ou inadequada, assim como o desenvolvimento de tumores pela manipulação dos fatores de Yamanaka. O autor cita como as principais consequências a geração de câncer cervical pela manipulação do *Oct4*, regressão de melanomas caso haja deleção do gene *Sox2* e potencial carcinogênico com a manipulação indevida do *Klf4* e *c-Myc* (desvantagens mostradas no quadro 3).

Quadro 3 - principais vantagens e desvantagens do uso de iPSCs e seus respectivos autores

VANTAGENS	
Hockemeyer, et al (2011)	▪ A capacidade de diferenciação tecidual torna-as promissoras para terapias regenerativas, para substituir tecidos danificados ou disfuncionais ▪ Relata o uso de nucleases <i>TALE</i> para editar o genoma de iPSCs permitindo a edição precisa do DNA, oferecendo potencial para corrigir mutações genéticas associadas a doenças hereditárias
Finotti, et al (2015)	▪ Menores embates éticos envolvidos no uso das ESC ▪ Menores riscos de rejeição imunológica
Lim, et al (2015)	▪ Uso de fatores de transcrição por integração genômica através de RNAm sintético leva a menor ativação de sistemas de defesa anti-virais ▪ O uso de iPSCs permite a geração de um grande número de neurônios em um ambiente controlado, o que facilita a replicação de resultados e a realização de experimentos padronizados
Miranda, Zapién e Monroy (2013)	▪ Benefício aos estudos farmacológicos visto que iPSCs podem gerar tecidos específicos para avaliação da toxicidade e efeitos colaterais de medicamentos ▪ As iPSCs podem ser obtidas diretamente de pacientes, permitindo a geração de células-tronco personalizadas que não serão rejeitadas pelo sistema imunológico quando reintroduzidas no mesmo paciente
Park, et al (2008)	▪ Facilita a pesquisa para esclarecimento de mecanismos patológicos ▪ Fornece uma base para terapias celulares autólogas que evitaria a rejeição imunológica e corrigiria defeitos genéticos
DESVANTAGENS	
Torres e Pessoa (2018)	▪ Alto custo de fabricação e reprogramação das iPSC por ser um método de pesquisa científica relativamente novo ▪ Longo tempo de espera entre coleta e transplante, sendo a taxa mínima de 3 meses para aplicação prática
Gomes, et al (2017)	▪ Gênese de células cancerígenas a partir de mutações mediante a manipulação incompleta ou inadequada ▪ Câncer cervical pela manipulação do <i>Oct3/4</i> e oncogênese no geral pela manipulação indevida de <i>Klf4</i> e <i>c-Myc</i>
Barbosa e Nunes (2023)	▪ Lei da Biossegurança n.º 11.105, de 24 de março de 2005 ▪ Embate ético: Células tronco embrionárias utilizadas apenas com 4 a 5 dias de gestação, pois ainda não foram desenvolvidas estruturas complexas como coração
Silva, et al (2022)	▪ Adolescentes entre 16 e 18 anos são incapazes relativamente a certos atos, ou à maneira de exercê-lo ▪ Código Civil brasileiro de 2002

Fonte: Autoria própria

7 CONCLUSÃO

O presente estudo acerca das iPSCs na medicina regenerativa demonstrou avanços significativos no uso dessas células na clínica humana, como evidenciado pelos sucessos alcançados por diversas pesquisas. Isto revela potencial tanto relativo aos estudos para melhor esclarecimento do mecanismo fisiopatológico de doenças genéticas quanto para a aplicação clínica como forma de terapia em cenários como degeneração macular, infarto agudo do miocárdio, Alzheimer, dentre outros. Sobre suas vantagens destacam-se a alta disponibilidade de células somáticas para reprogramação associado a menores riscos de rejeição tecidual, possibilidade de estudos *in vitro* acerca de mecanismos fisiopatológicos e farmacológicos para posterior aplicação *in vivo* das descobertas e menores embates éticos em relação ao uso de células-tronco, visto que não se utiliza embriões. Suas desvantagens permeiam as esferas do custo, necessidade de investimentos tecnológicos, potencial oncogênico e limitações para o uso em terapêuticas *in vivo*. Dessa forma, maiores esforços se fazem necessários para o entendimento do comportamento funcional das iPSCs no sistema *in vivo* para a aplicação desta tecnologia na saúde, visando uma melhora da qualidade de vida de inúmeras pessoas afetadas por doenças graves e/ou crônicas em todo o mundo.

8 REFERÊNCIAS

- ALVES, Suelen *et al.* O uso terapêutico de células tronco. **Revista saúde em foco**—edição, 2019. Centro Universitário Amparense - Ano 2019. Disponível em: <<https://portal.unisepe.com.br/unifia/saude-em-foco/ano-2019/>>.
- BARBOSA, E. M. DE M.; NUNES, M. M. U. C. A ÉTICA E BIOÉTICA NO USO DE CÉLULAS TRONCO EMBRIONÁRIAS (CTES). **Revista Científica Unilago**, v. 1, n. 1, 15 dez. 2023.
- BRAULT, J. *et al.* Optimized Generation of Functional Neutrophils and Macrophages from Patient-Specific Induced Pluripotent Stem Cells: Ex Vivo Models of X0-Linked, AR220- and AR470- Chronic Granulomatous Diseases. **BioResearch Open Access**, v. 3, n. 6, p. 311–326, dez. 2014.
- CHAMBERS, S. M. *et al.* Highly efficient neural conversion of human ES and iPS cells by dual inhibition of SMAD signaling. **Nature Biotechnology**, v. 27, n. 3, p. 275–280, mar. 2009.
- CORBINEAU, S. *et al.* Spermatogonial stem cells and progenitors are refractory to reprogramming to pluripotency by the transcription factors Oct3/4, c-Myc, Sox2 and Klf4. **Oncotarget**, v. 8, n. 6, p. 10050–10063, 28 dez. 2016.

DA CRUZ FONTES, B. M.; BARBIERI DE SOUZA, C. Células-Tronco Pluripotentes Induzidas (iPSC) na Modelagem do Transtorno do Espectro Autista (TEA). **Ensaio e Ciência C Biológicas Agrárias e da Saúde**, v. 25, n. 5-esp., p. 619–627, 14 mar. 2022.

DINIZ, D.; AVELINO, D. Cenário internacional da pesquisa em células-tronco embrionárias. **Revista de Saúde Pública**, v. 43, p. 541–547, 1 jun. 2009.

DUELEN, R.; SAMPAOLESI, M. Stem Cell Technology in Cardiac Regeneration: A Pluripotent Stem Cell Promise. **EBioMedicine**, v. 16, p. 30–40, fev. 2017.

GAMBARI, R. *et al.* Recent trends in the gene therapy of β -thalassemia. **Journal of Blood Medicine**, p. 69, fev. 2015.

GOMES, K. M. S. *et al.* Induced pluripotent stem cells reprogramming: Epigenetics and applications in the regenerative medicine. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 63, n. 2, p. 180–189, fev. 2017.

HYO JIN KIM *et al.* Generation of multilineage liver organoids with luminal vasculature and bile ducts from human pluripotent stem cells via modulation of Notch signaling. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 14, n. 1, 3 fev. 2023.

HOCKEMEYER, D. *et al.* Genetic engineering of human pluripotent cells using TALE nucleases. **Nature Biotechnology**, v. 29, n. 8, p. 731–734, 7 jul. 2011.

LEYVA, Q. *et al.* Ética en el ámbito de la investigación en medicina regenerativa. **Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia**, v. 37, n. 4, p. -, 2021.

LI, Y. *et al.* Abnormal Neural Progenitor Cells Differentiated from Induced Pluripotent Stem Cells Partially Mimicked Development of TSC2 Neurological Abnormalities. **Stem Cell Reports**, v. 8, n. 4, p. 883–893, abr. 2017.

LIM, C.-S. *et al.* Understanding the molecular basis of autism in a dish using hiPSCs-derived neurons from ASD patients. **Molecular Brain**, v. 8, n. 1, 30 set. 2015.

MARINHEIRA, J. F. R. **Células Estaminais Pluripotentes Induzidas no Tratamento da Doença de Alzheimer**. Disponível em: <<https://estudogeral.uc.pt/handle/10316/84623>>. Acesso em: 3 maio. 2024.

PAES, B. C. M. F. *et al.* Generation of hematopoietic stem/progenitor cells with sickle cell mutation from induced pluripotent stem cell in serum-free system. **Hematology, Transfusion and Cell Therapy**, v. 43, p. 156–164, 7 jul. 2021.

PARK, I.-H. *et al.* Disease-Specific Induced Pluripotent Stem Cells. **Cell**, v. 134, n. 5, p. 877–886, set. 2008.

RODOLFO, Lilian Merino *et al.* Substitutos ósseos alógenos e xenógenos comparados ao enxerto autógeno: reações biológicas. **Revista Brasileira Multidisciplinar**, v. 20, n. 1, p. 94–105, 2017.

ROY, B. *et al.* Laterally confined growth of cells induces nuclear reprogramming in the absence of exogenous biochemical factors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 115, n. 21, p. E4741–E4750, 22 maio 2018.

SCHMITZ, N.; LENZ, G.; STELLJES, M. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for T-cell lymphomas. **Blood**, v. 132, n. 3, p. 245–253, 19 jul. 2018.

SHAMBLOTT, M. J. *et al.* Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, n. 23, p. 13726–13731, 10 nov. 1998.

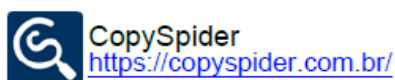
SILVA, A. F. DA *et al.* Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in children and adolescents: ethical problems faced by the multidisciplinary team. **Revista Gaúcha de Enfermagem**, v. 43, p. e20210315, 4 nov. 2022.

TORRES, C. B. B.; PESSOA, W. S. Células-tronco pluripotentes induzidas e edição de genes: avanços tecnológicos da pesquisa em medicina regenerativa e terapia gênica. **Jornal Interdisciplinar de Biociências**, v. 3, n. 1, p. 56, 8 jun. 2018.

VALADEZ-BARBA, V. *et al.* Enfermedad de Parkinson: actualización de estudios preclínicos con el uso de células troncales pluripotentes inducidas. **Neurología**, 11 mar. 2021.

ZENG, C. *et al.* Autograft versus allograft in anterior cruciate ligament reconstruction: A meta-analysis of randomized controlled trials and systematic review of overlapping systematic reviews. **Arthroscopy: the journal of arthroscopic & related surgery: official publication of the Arthroscopy Association of North America and the International Arthroscopy Association**, v. 32, n. 1, p. 153- 163.e18, 2016.

ANEXO 1 – ANÁLISE DE PLÁGIO (COPYSPIDER)



Página 2 de 170

Versão do CopySpider: 2.3.0

Relatório gerado por: aikeberbert@hotmail.com

Modo: web / normal

Arquivos	Termos comuns	Similaridade
TCC Aike Berbert.doc X https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9887183	80	0,45
TCC Aike Berbert.doc X https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6299199	70	0,42
TCC Aike Berbert.doc X https://www.nature.com/articles/s41392-024-01809-0	99	0,36
TCC Aike Berbert.doc X https://classic.clinicaltrials.gov	3	0,03
TCC Aike Berbert.doc X https://en.wikipedia.org/wiki/University_Hospital_of_Montpellier	2	0,02
TCC Aike Berbert.doc X https://www.chu-montpellier.fr/en/about-the-hospital	0	0,00
TCC Aike Berbert.doc X http://www.google.com.br/url?esrc=s	0	0,00
Arquivos com problema de download		
https://www.nature.com/articles/nrd.2016.245	Não foi possível baixar o arquivo. É recomendável baixar o arquivo manualmente e realizar a análise em conluio (Um contra todos). HTTP response code: 303 - Index 30 out of bounds for length 30	
https://journals.physiology.org/doi/10.1152/physrev.00039.2017	Não foi possível baixar o arquivo. É recomendável baixar o arquivo manualmente e realizar a análise em conluio (Um contra todos). - Erro: Parece haver uma restrição de acesso para esse arquivo. HTTP response code: 302403 - Server returned HTTP response code: 403 for URL: https://journals.physiology.org/doi/full/10.1152/physrev.00039.2017	
https://liverfoundation.org/pt/doen%C3%A7as-do-f%C3%ADgado/doen%C3%A7a-hep%C3%A1tica-gordurosa/nash-esteato-hepatite-n%C3%A3o-alco%C3%B3lica	Não foi possível baixar o arquivo. É recomendável baixar o arquivo manualmente e realizar a análise em conluio (Um contra todos). - Received fatal alert: protocol_version	