

# Células Estaminais Pluripotentes Induzidas no Tratamento da Doença de Alzheimer

*Induced Pluripotent Stem Cells in the treatment of Alzheimer's Disease*

Marinheira J.<sup>1</sup>, Silva S.<sup>2,3</sup>, Cruz M.T.<sup>2,4</sup>

ARTIGO ORIGINAL | ORIGINAL ARTICLE

## RESUMO

Em 2006, dois investigadores demonstraram ser possível desdiferenciar células somáticas por um processo designado de reprogramação celular, levando-as a atingir de novo o estado pluripotente. O surgimento das células estaminais pluripotentes induzidas (iPSCs) causou um impacto extremamente relevante na comunidade científica devido ao facto de se superarem muitas das limitações que as células estaminais embrionárias e adultas apresentavam.

A Doença de Alzheimer (DA) é uma doença neurodegenerativa caracterizada pela perda de memória e de outras funções cognitivas. A ausência de terapêuticas eficazes para prevenir ou reverter a doença constitui um problema grave de saúde pública.

Esta revisão pretende abordar as principais limitações das iPSCs, com foco especial na DA, nomeadamente como estratégia modificadora da doença para retardar a sua progressão e melhorar a qualidade de vida dos doentes, no *screening* de novos fármacos e ainda como uma opção terapêutica individualizada.

**Palavras-chave:** Células estaminais, células estaminais pluripotentes induzidas, Doença de Alzheimer, reprogramação celular.

## ABSTRACT

In 2006, two researchers demonstrated that it is possible to de-differentiate somatic cells by a process called cellular reprogramming, causing them to reach the pluripotent state again. The emergence of induced pluripotent stem cells (iPSCs) has had an extremely relevant impact on the scientific community due to the fact that many of the limitations of embryonic and adult stem cells were overcome.

Alzheimer's Disease (AD) is a neurodegenerative disease characterized by loss of memory and other cognitive functions. The lack of effective therapies to prevent or reverse the disease is a serious public health problem.

This revision aims to address the main limitations of iPSCs, with special focus on AD, namely as a disease modifying strategy to slow its progression and improve patients' quality of life, *screening* new drugs and as an individualized therapeutic option.

**Keywords:** Stem cells, induced pluripotent stem cells, Alzheimer's Disease, cellular reprogramming.

<sup>1</sup> Mestre em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.

<sup>2</sup> Professora Auxiliar, Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.

<sup>3</sup> Investigadora no Instituto de Investigação Clínica e Biomédica de Coimbra (iCBR), Faculdade de Medicina de Coimbra.

<sup>4</sup> Investigadora no Centro de Neurociências e Biologia Celular da Universidade de Coimbra

**Autora para correspondência:** Maria Teresa Cruz; trosete@ff.uc.pt; +351 938 204 793. Faculdade de Farmácia – Universidade de Coimbra – Pólo das Ciências da Saúde – 3000-548 Coimbra.

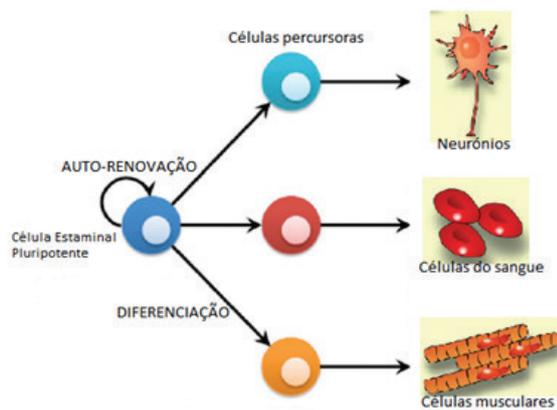
Submetido/Submitted: 03 setembro 2019 | Aceite/Accepted: 14 novembro 2019

## INTRODUÇÃO

### Células Estaminais

#### Definição

As células estaminais são células indiferenciadas que possuem duas características únicas: a capacidade de auto-renovação e a possibilidade de se diferenciarem num ou mais tipos de células (Figura 1)<sup>1</sup>. A sua divisão é assimétrica, isto é, as células filhas podem gerar um conjunto de células com capacidade proliferativa ou continuarem a sua diferenciação<sup>2</sup>.



**Figura 1.** Propriedades das células estaminais. (Adaptada de Stem Cell Facts1)<sup>1</sup>

#### Tipos de células estaminais

A fecundação do oócito pelo espermatozóide origina o zigoto que, após divisões mitóticas, gera células designadas de blastómeros que formam a mórula. Com as conseqüentes divisões celulares, os blastómeros separam-se em duas partes, o trofoblasto e o botão embrionário ou massa celular interna, formando-se assim o blastocisto. As células da massa interna do blastocisto, enquanto

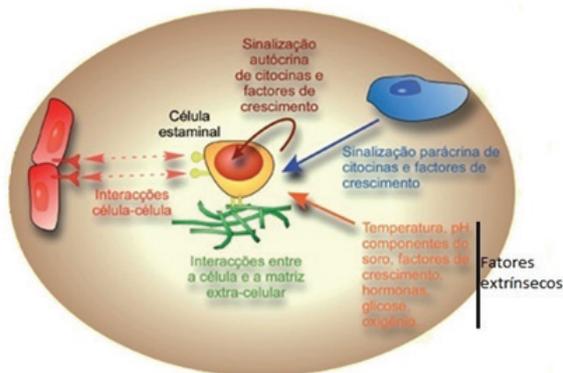
pré-implantado, podem ser isoladas e cultivadas *in vitro* e originar as células estaminais embrionárias (*embryonic stem cells*, ESCs), que são pluripotentes<sup>3</sup> e cuja designação teve a sua origem em 1998<sup>4</sup>.

Após implantação do blastocisto, o trofoblasto dá origem aos tecidos extra-embrionários, enquanto as células do botão embrionário originam as células estaminais do epiblasto (*epiblast-derived stem cells*, EpiSCs), capazes de originar *per se* as três camadas germinativas: endoderme, mesoderme e ectoderme, das quais derivam os tecidos e os órgãos<sup>5</sup>. Embora pluripotentes, estas células são diferentes das ESCs no que refere à capacidade de colonização de um blastocisto hospedeiro, capacidade de formar teratomas e na expressão de genes e vias de sinalização necessárias para as manter pluripotentes em cultura.

Após o nascimento, existem alguns tecidos e sistemas de órgãos que possuem células estaminais adultas (*adult stem cells*, ASCs), multipotentes, capazes de se auto-renovarem e com capacidade de se diferenciarem em linhagens de células específicas. Estas células estão localizadas em nichos, ou seja, estruturas que formam microambientes e fornecem fatores extrínsecos, tais como a temperatura, pH, fatores de crescimento, hormonas, glicose e oxigénio que, em combinação com fatores intrínsecos (interações célula-célula, interações célula-matriz extra-celular e sinalização autócrina de citocinas e fatores de crescimento) influenciam o seu comportamento (Figura 2)<sup>2,6</sup>.

As células estaminais dos tecidos fetais (neurónais, sangue do cordão umbilical ou líquido amniótico) têm propriedades

intermédias entre as ESCs e as ASCs em termos de potência.



**Figura 2.** Interações no nicho das células estaminais adultas. (Adaptada de BRANGANÇA *et al.*<sup>3</sup>)

### Aplicações

Atualmente os esforços da investigação estão focados em duas estratégias principais: no isolamento, expansão *ex vivo* e transplante das células estaminais ou células progenitoras de volta ao órgão nativo; ou aumento do seu potencial reparador endógeno *in vivo*<sup>1-3</sup>. De facto, as estratégias de medicina regenerativa recorrendo a células estaminais têm sido estudadas no sentido de substituir ou reparar as células danificadas, dado o seu potencial de auto-renovação e proliferação. Por outro lado, podem ser usadas na produção *ex vivo* de tecidos, que posteriormente são transplantados. Sendo a terapia génica um método de introdução de material genético em células de um determinado tecido onde a expressão de um gene pode originar uma patologia. As propriedades das células estaminais tornam-nas vetores muito apetecíveis para esta aplicação. Por fim, e não menos importante, estas células

podem servir para modular doenças e descobrir novos alvos terapêuticos.

### Limitações

Devido ao grande potencial das células estaminais, têm sido realizados esforços para melhorar os protocolos relativos à sua obtenção, de modo a inseri-las numa crescente corrente de aplicações clínicas. Ainda assim, existem desvantagens que necessitam de ser ultrapassadas.

Comparativamente às ESCs, as ASCs possuem uma menor plasticidade e capacidade de proliferação, o que limita a sua utilização na terapia celular. No entanto, também pode ser visto como uma vantagem ao diminuir a probabilidade de formação de teratomas, problema comum nas células estaminais embrionárias. Ainda assim, há dificuldade no isolamento das células estaminais adultas, devido ao facto de serem uma população pequena (representam menos de 0,01% do número total de células<sup>2</sup>) e à sua localização anatómica interna.

As ESCs são consideradas o *gold standard* em termos de pluripotência, mas o facto de serem isoladas a partir de um embrião humano gera problemas éticos e sociais, que acabam por dificultar o estudo das mesmas. Ainda assim, Klimanskaya *et al.*<sup>7</sup> conseguiram obter células pluripotentes a partir de uma biópsia, sem interferir com o desenvolvimento do embrião. Posteriormente, para que possam ser usadas clinicamente, é necessário o seu isolamento e a sua manutenção em condições de cultura adequadas (com os fatores de crescimento *transforming growth factor*  $\beta$  – TGF $\beta$  e *basic fibroblast growth factor* – bFGF), de modo a manterem o seu estado indiferenciado<sup>8</sup>. Dependendo da linhagem celu-

lar pretendida, é necessário induzir a sua diferenciação para que possam ser transplantadas no doente em causa. Durante esta expansão prolongada, as linhas ESCs podem adquirir cariótipos anormais ou ampliações genéticas<sup>9</sup> e levar ao desenvolvimento de determinadas patologias. A histocompatibilidade entre dador e recetor é outra limitação, com a possibilidade de ocorrer rejeição imunológica do transplante das células ou de órgãos originados a partir delas<sup>3</sup>. Além disso, após um transplante, a terapêutica imunossupressora acompanhará o doente para o resto da vida. Em contrapartida, a possibilidade de efetuar o transplante com células estaminais adultas isoladas a partir do próprio doente (células autólogas) reduz essa limitação. Devido aos diversos problemas apresentados, mas principalmente por razões éticas, em 2005, a Comissão de Ética dos Estados Unidos propôs a busca de fontes alternativas de células pluripotentes<sup>10</sup>. No ano seguinte, Takahashi e Yamanaka<sup>11</sup> surpreenderam o mundo ao reprogramarem células somáticas para a pluripotência, com um potencial de desenvolvimento semelhante ao das ESCs e sem a exigência de um embrião, criando uma nova tecnologia: células estaminais pluripotentes induzidas (*induced pluripotent stem cells*, iPSCs). Nesta revisão, pretende-se explorar as iPSCs, desde a sua obtenção, através da reprogramação celular, até à sua diferenciação nos diversos tipos celulares, bem como a sua aplicação na doença de Alzheimer, uma das doenças neurodegenerativas do século atual.

## Reprogramação celular

### *Perspetiva histórica*

O conceito de reprogramação celular foi identificado há mais de 50 anos nas experiências de Gurdon<sup>12</sup> e posteriormente de Wilton *et al.*<sup>13</sup>. Em ambas as experiências foram gerados clones, de rã e de ovelha (a famosa ovelha *Dolly*), respetivamente, onde se demonstrou que, introduzindo um núcleo de uma célula diferenciada num oócito anucleado, se gerava um organismo inteiro. Chegou-se à conclusão de que o citoplasma continha fatores específicos – fatores de reprogramação, que induziam nas células somáticas um estado embrionário indiferenciado. Posteriormente, Davis *et al.*<sup>10</sup> realizaram experiências com DNA complementar (cDNA) e descobriram que a expressão do gene de diferenciação miogénica 1 (*myogenic differentiation 1*, MyoD1) era suficiente *per se* para induzir a conversão de fibroblastos em mioblastos que expressam miosina. Estes foram os trabalhos pioneiros destacados, entre outros, que permitiram desvendar os mecanismos celulares e moleculares subjacentes à reprogramação celular e aprofundar este evento. Deste modo, a reprogramação celular pode definir-se como o conjunto de alterações celulares que permite que uma célula passe de um estado diferenciado para outro. Estas alterações celulares são mudanças nos padrões de expressão génica que incluem o silenciamento de genes que codificam fatores de transcrição (FT) importantes na manutenção da pluripotência, expressão de

genes que induzem a diferenciação e alterações epigenéticas<sup>14</sup>. O facto de poder gerar várias linhagens celulares a partir de uma, torna a reprogramação celular uma tecnologia bastante atrativa para a comunidade científica e para a indústria farmacêutica.

### Métodos de reprogramação celular

Atualmente são referidos 5 procedimentos tecnológicos capazes de gerar células pluripotentes<sup>14,15</sup>:

i) Transferência Nuclear das Células Somáticas: o núcleo de uma célula somática (diferenciada) é transferido para um oócito anucleado.

ii) Utilização de extratos de células pluripotentes: extratos citoplasmáticos e nucleares de células indiferenciadas podem induzir a reprogramação, através da estimulação de genes de pluripotência.

iii) Fusão celular: fusão de uma célula somática com uma célula estaminal embrionária, que possui fatores que auxiliam na desdiferenciação pela indução da expressão de genes de pluripotência.

iv) Moléculas pequenas: uso de moléculas com adição de FT que promovem a reprogramação. Um estudo demonstrou que com 7 moléculas pequenas era possível reprogramar eficientemente fibroblastos de ratos, em que o *octamer-binding transcription factor 4* (Oct4) foi dispensável<sup>16</sup>.

v) Transdiferenciação ou Reprogramação direta: usa a sobreexpressão transitória de FT e de sinais como fatores de crescimento e citocinas para reprogramar células somáticas em diversas linhas celulares ou em progenitores celulares sem passar pelo estágio de iPSC.

### Papel dos fatores de reprogramação

Através das interações que estabelecem entre si, os fatores de reprogramação são responsáveis por induzir a expressão de genes de pluripotência e inibir a expressão de genes que promovem a diferenciação. Os seguintes fatores foram os utilizados pela primeira vez para gerar iPSCs:

- Oct4: a deficiência deste fator nos embriões é prejudicial, pois embora haja formação do trofoblasto, a massa celular interna não se desenvolve;

- *Sex determining region Y-box2* (Sox2): não é expresso apenas em células pluripotentes, mas também em fases mitóticas posteriores;

- *Kruppel-like factor 4* (Klf4): a sua função está relacionada com a inibição do gene supressor tumoral p53 e com a neutralização da ação do c-Myc que induz a apoptose e a diferenciação;

- c-Myc: é um oncogene. Não é fundamental para a reprogramação celular, mas influencia fortemente a cinética e a eficiência desta, provavelmente pela indução de mudanças epigenéticas, quando adicionado aos outros 3 fatores<sup>17</sup>.

A adição de diferentes tipos de fatores de transcrição promove a aquisição de pluripotência pelas células e, concomitantemente, direciona-as para linhagens celulares específicas, diferentes da linhagem parental.

### Expressão sequencial dos marcadores de pluripotência

A dúvida científica associada à utilização dos fatores de reprogramação consiste

no saber se os genes marcadores de pluripotência (por exemplo, *alkaline phosphatase (AP)*; *stage-specific embryonic antigen-1 (SSEA1)*; *SOX2*; *OCT4* e *NANOG* para vetores virais) são ativados aleatória ou sequencialmente e se existe duração mínima de expressão do transgene de reprogramação.

Com o objetivo de esclarecer esta questão, Brambrink *et al.*<sup>18</sup> desenvolveram um sistema lentiviral para formar iPSCs, no qual os 4 FT são ativados a partir de um promotor induzido pela doxicilina. Os autores descobriram que o *AP* é o primeiro gene a ser expresso, seguindo-se do *SSEA1* que marca um estado intermédio, e que os *OCT4/NANOG* são apenas detetados nas células totalmente reprogramadas. Os resultados também sugeriram que a expressão do transgene é crítica na formação das iPSCs, ou seja, uma expressão mais prolongada (de 12-16 dias) aumenta o número de colónias iPSCs totalmente reprogramadas.

Este estudo foi de extrema relevância para demonstrar que existem etapas no aparecimento dos marcadores de pluripotência, as quais são essenciais para distinguir células parcial das totalmente reprogramadas. Por outro lado, existe uma duração mínima para a expressão do transgene, pois se a expressão for reduzida, as células retornam ao estado original, o que apoia o envolvimento da epigenética na reprogramação.

## Vetores

Para que os FT referentes à reprogramação sejam introduzidos nas células somáticas, é necessário o uso de vetores. Consoante a informação genética integra ou não o genoma da célula hospedeira, os vetores podem ser virais ou não virais e integrativos ou não integrativos. O vetor deve ser escolhido para cada tipo celular de modo a não afetar significativamente a estabilidade e a qualidade das células, assim como a eficiência da reprogramação<sup>14,15,19</sup>.

### 1) Vetores integrativos

**Tabela 1.** Vantagens e desvantagens dos vetores integrativos.

Vetor	Vantagens	Desvantagens
Retrovírus	Clonagem de um grande número de fragmentos Alta eficiência	Integração genómica Infetam células apenas em divisão
Lentivírus	Infetam células quiescentes e em divisão	Integração genómica Menos eficiente que o retrovírus
Transposições (ex: piggy-Bac)	Fácil remoção do transgene Expressão génica a longo prazo Eficiente	Etapa de excisão complicada

## 2) Vetores não integrativos

**Tabela 2.** Vantagens e desvantagens dos vetores não integrativos.

Vetor	Vantagens	Desvantagens
Adenovírus	Ausência de integração genômica	Expressão transitória Eficiência reduzida
Vírus Sendai	Ausência de integração genômica Alta eficiência	Difícil eliminar os transgenes
Plasmídeos	Ausência de integração genômica Reprodução fácil a nível laboratorial Baixo custo	Eficiência reduzida Expressão reduzida de fatores de transcrição
Proteínas mRNA, iRNA	Ausência de integração genômica Entrega facilitada →	Eficiência reduzida Necessárias múltiplas transfeções

A utilização de moléculas pequenas cresceu no sentido de aumentar a eficiência de reprogramação. O ácido valpróico, inibidor das desacetilases das histonas, tem demonstrado um potencial promissor na reprogramação de fibroblastos humanos usando apenas Oct4 e Sox2<sup>14</sup>.

### Epigenética

Para que uma célula seja reprogramada é então necessário escolher a célula parental, a técnica de reprogramação, incluindo o tipo de vetor e o cocktail específico dos fatores de reprogramação

(genes marcadores de pluripotência ou transgenes), e a linhagem celular pretendida.

A epigenética explica a interação do genoma com o meio ambiente, resultando em mudanças na regulação da expressão gênica<sup>16</sup>. A reprogramação celular afeta e pode ser afetada pela epigenética de diferentes formas: 1) modificação de histonas; 2) alteração da metilação do DNA; 3) regulação de genes marcadores de pluripotência e genes promotores da diferenciação específicos de cada linhagem; 4) e em modificações pós-tradução. Estudos recentes sugerem uma investigação mais aprofundada e focada na epigenética, sendo extremamente relevante a identificação de FT associados a determinadas linhagens celulares, o que permitirá esclarecer e definir protocolos de reprogramação altamente eficientes.

## CÉLULAS ESTAMINAIS PLURIPOTENTES INDUZIDAS

### Caracterização

Takahashi e Yamanaka<sup>11</sup> demonstraram que ao introduzir os 4 FT (Oct3/4, Sox2, c-Myc e Klf4,) em fibroblastos de murganhos, com um sistema retroviral e sob as condições de cultura de células estaminais embrionárias, induziram um estado de pluripotência. Observaram também que as células pluripotentes induzidas se assemelhavam às ESCs na morfologia, propriedades de crescimento, genes marcadores de pluripotência e na formação de teratomas (com tecidos das três camadas germinativas).

As iPSCs são então uma colônia de células pluripotentes com uma marca epigenética reestruturada que resultou de uma reprogramação celular. Asse-

melham-se às ESCs nas suas propriedades, nomeadamente na capacidade de auto-renovação e de diferenciação. No entanto, estas semelhanças não provam que são molecularmente e/ou funcionalmente equivalentes.

### **Avaliação da pluripotência**

Durante a reprogramação celular poderão aparecer colónias de células não pluripotentes que têm de ser identificadas como tal. A observação da morfologia deve ser um dos critérios, embora não seja suficiente. Num estudo recente, foi desenvolvido um método automatizado quantitativo e não invasivo que auxilia na previsão da janela de tempo de seleção de colónias e na sua deteção. Nos resultados, houve diferenças significativas em termos de características biológicas em relação aos métodos tradicionais<sup>20</sup>. Como já referido anteriormente, consoante o estado de reprogramação, as células vão expressando determinados conjuntos de genes de pluripotência: as células totalmente reprogramadas expressam *OCT4*, *SOX2* e *NANOG* e reativam a expressão do gene da telomerase, seguido do silenciamento do transgene usado para a reprogramação. Ao mesmo tempo, são expressos antígenos embrionários como *stage-specific embryonic antigen 3* (*SSEA3*), *tumor related-antigen-1-60* (*TRA-1-60*), *tumor related-antigen-1-81* (*TRA-1-81*), *DNA metiltransferase-3β* (*DNMT3β*), *reduced expression gene 1* (*Rex1*), entre outros. O grau de metilação dos genes promotores da manutenção da pluripotência e dos genes promotores da diferenciação é também um evento importante na avaliação da pluripotência. Outra marca de pluripotência é a reativação do cromosoma

X: a sua inativação é importante no desenvolvimento embrionário e fetal, enquanto a sua reativação influencia o estado pluripotente<sup>22</sup>. Existem dois tipos de ensaios funcionais que avaliam a pluripotência: formação de quimeras e formação de teratomas. O primeiro teste avalia se, após transplante das iPSCs num blastocisto (normalmente de rato), ocorre desenvolvimento normal de um organismo inteiro. O segundo ensaio é o único disponível para o estudo de células humanas e envolve a injeção de iPSCs via subcutânea ou intramuscular em ratos imunocomprometidos. Se as células forem pluripotentes formarão tumores que englobam células das três camadas germinativas<sup>9,22</sup>. Um marcador potencial poderá ser o locus *Dlk1-Dio3* que não é silenciado nas iPSCs (pois se for silenciado, a probabilidade de formar quimeras é significativamente reduzida)<sup>23</sup>.

### **Deteção de colónias iPSCs**

A abordagem tradicional por imunofluorescência para detetar marcadores de pluripotência juntamente com a microscopia de fluorescência só pode ser aplicada em fases tardias de reprogramação, tornando-se necessário a identificação de outros métodos eficazes para acompanhar a qualidade das iPSCs. Num estudo recente, foi desenvolvido um método quantitativo não invasivo que auxilia na deteção de colónias iPSCs e na previsão do tempo ideal.

### **Danos no DNA e mecanismos de reparação durante a reprogramação**

Durante o processo de reprogramação, o aumento da taxa de proliferação celular requer mais energia que é fornecida

através do metabolismo da glicose. Os elétrons libertados em excesso pelas moléculas que provêm do ciclo de Krebs (NADH e FADH<sub>2</sub>) podem ser acumulados na cadeia transportadora e, posteriormente, no citoplasma sob a forma de espécies reativas de oxigênio (*reactive oxygen species*, ROS), responsáveis pelo stress oxidativo e danos no DNA. Defeitos em componentes envolvidos na reparação do DNA, como por exemplo, DNA ligase 4 (LIG4), *breast cancer gene 1* (BRCA1) ou *breast cancer gene 2* (BRCA2), impedem a formação de iPSCs<sup>24</sup>. Ao contrário do que se pensava, a reprogramação ativa mecanismos de reparação nas iPSCs, que possibilitam a reparação de danos no DNA e o sucesso da reprogramação.

### Integridade do genoma

As variações genéticas das hiPSCs (*human iPSCs*) incluem instabilidade cromossômica, variações no número de cópias (*copy number variants*, CNVs) e variações de um único nucleótido (*single nucleotide variants*, SNVs). Estas variações já são preexistentes, ou são induzidas pela reprogramação ou posteriormente, pela diferenciação das iPSCs. Em geral, as hiPSCs e as hESCs partilham de uma instabilidade cromossômica semelhante, em que a trissomia 12 é a aberração predominante em ambas. As CNVs são normalmente adquiridas durante a cultura devido à pressão seletiva exercida pela adaptação às condições do meio, e, são observadas mais recorrentemente em hiPSCs do que em hESCs, embora muitas delas sejam comuns a ambas (como a amplificação de 20q11.21). Existem também CNVs apenas detetadas em iPSCs que poderão ter origem

somática, sendo vantajosas para a proliferação, semelhante ao que acontece nos tumores. A partir de vários estudos publicados, chegou-se à conclusão que as SNVs tanto podem derivar das células somáticas como acontecer inesperadamente durante ou após a reprogramação, sugerindo que existem fontes celulares que poderão ser mais propícias a este evento. No geral, as hiPSCs e as hESCs não são muito diferentes no que diz respeito à carga mutacional.

De uma forma resumida, pode-se afirmar que a cultura *in vitro* propicia a instabilidade genômica e diminui a capacidade de reparação. No entanto, as hiPSCs de baixa passagem são sujeitas a mais variações que as hiPSCs de alta passagem<sup>24</sup>. É necessário que o número de passagens seja bem controlado, uma vez que, passagens extensas geram maior estabilidade às iPSCs, aumentando a eficiência da diferenciação<sup>25</sup>. Deboever *et al.*<sup>26</sup> observaram que, muitas CNVs comuns estão em regiões inter-génicas reguladoras e CNVs raras têm grande efeito sobre a expressão génica que, dependendo da localização em relação ao gene, pode ser positiva ou negativa. Mais estudos serão necessários para identificar variações que poderão ter consequências ao nível do fenótipo, nomeadamente para utilização na clínica.

### Genética e epigenética: ESCs vs iPSCs

A sequenciação do DNA revelou diferenças entre as hiPSCs e hESCs<sup>27</sup>. Vários estudos indicam que as diferenças podem ser atribuídas ao histórico genético (e célula de origem), à expressão latente dos FT e às condições do meio cultura que variam entre laboratórios<sup>27</sup>. Marei *et al.*<sup>28</sup> analisaram o perfil de ex-

pressão génica e o potencial de diferenciação neuronal dos dois tipos celulares para identificar semelhanças, usando uma técnica não integrativa e partindo do mesmo tipo de células. Os resultados sugeriram que as hiPSCs e hESCs são muito semelhantes e que as diferenças na expressão génica se devem a outros fatores que não o *background* genético. O potencial de diferenciação neuronal foi também idêntico, assim como o perfil de expressão génica durante a diferenciação, revelando equivalência entre os dois tipos.

Um estudo recente<sup>29</sup> destaca a importância de manter a identidade genética das iPSCs através de um processo barato e fiável: *short tandem repeats* (STRs). STRs são repetições de 2-4 nucleótidos localizadas em regiões de sequência única, e apresentam uma variabilidade interindividual elevada, sendo a impressão digital de cada indivíduo. Para além da genética e epigenética, a genotipagem STR deve fazer parte das análises, aumentando a robustez dos resultados relativos à identidade das iPSCs.

As principais características epigenéticas das hESCs são também reproduzidas nas hiPSCs, mas há diferenças relacionadas com a memória epigenética, ou seja, com um padrão de metilação do DNA residual e expressão génica resultante da célula de origem. No entanto, existem regiões diferencialmente metiladas (*differentially methylated regions*, DMR) e marcas na cromatina que são adquiridas na geração de iPSCs, não dependendo da origem. Durante a reprogramação existe uma metilação ineficiente em locais CpG, sendo esta aberração transmitida com frequência e observada em altas passagens. Estes

factos sugerem que as passagens posteriores e a adição de DNA-metiltransferases poderão não ser suficientes para eliminar as aberrações adquiridas, como se pensava inicialmente. A memória epigenética torna-se numa vantagem apenas na diferenciação para o mesmo tipo de célula de origem<sup>23</sup>.

### Sistemas de edição de genes

As ferramentas de edição de genes consistem em técnicas de correção do genoma, substituindo, inativando ou eliminando genes que sofreram algum tipo de mutação. Funcionam com proteínas guias de modo a dirigirem-se ao local alvo. Existem três tipos de sistemas de edição de genes, que dependem do tipo de reparação e da nuclease envolvida: *zinc-finger nucleases* (ZFNs), *transcription activator-like effector nucleases* (TALENs) e, o mais recente, repetições palindrómicas curtas agrupadas e regularmente espaçadas (*clustered regularly interspaced short palindromic repeats/caspase9* (CRISPR/Cas9)). O CRISPR/Cas9 tipo II, o mais estudado, é constituído por dois componentes: a endonuclease Cas9, que possui dois domínios independentes responsáveis pela clivagem das cadeias complementar e não complementar do DNA, e um RNA guia (sgRNA) que liga por complementaridade ao DNA alvo e à Cas9<sup>30</sup>.

Esta ferramenta pode ser usada para corrigir genes associados a doenças, tanto em zigotos como em linhas celulares humanas. É também útil na criação de modelos para investigação de processos celulares e produção de novos fármacos, utilizando diferentes tipos de células somáticas associadas, ou não, a alguma patologia. Dadas as variações genéticas

que vão ocorrendo na reprogramação de hiPSCs, esta ferramenta poderá corrigir as anomalias e/ou fornecer consequências fenotípicas. De reforçar que, a edição *ex vivo* de células somáticas recolhidas de um doente com uma determinada patologia, a sua reprogramação, diferenciação e posterior transplante poderá ser um marco histórico na medicina<sup>31</sup>.

### Aplicações

Para além de muito semelhantes genética e funcionalmente, as iPSCs apresentam vantagens significativas relativamente ao *gold standard*, permitindo diversas aplicações clínicas.

### Criação de modelos de doenças

A criação de modelos de doença permite uma maior compreensão dos fatores que influenciam a doença humana em termos de suscetibilidade e prognóstico. Os modelos atualmente disponíveis podem ser *in vitro*, com tecidos vivos obtidos por colheitas invasivas ou *post-mortem*, ou *in vivo* com animais transgênicos ou modelos quiméricos. Estes possuem limitações relativamente à transposição de resultados para o organismo humano. A criação recente de modelos 3D do cérebro humano permite uma maior proximidade à realidade, levando a uma maior compreensão dos mecanismos subjacentes às patologias, principalmente neurodegenerativas, cuja prevalência tem aumentado<sup>32</sup>.

Graças à sua capacidade de auto-renovação e plasticidade, as iPSCs permitem estudar três tipos de doenças: genéticas, epigenéticas e ambientais. A recolha de células específicas do doente com uma determinada patologia permite criar um “modelo individual” e provi-

dençar uma terapêutica direcionada. Em muitos casos, as iPSCs colhidas de um doente exibem um comportamento diferente de iPSCs colhidas de um indivíduo saudável, fornecendo pistas acerca da patologia<sup>15</sup>.

Acredita-se que a maioria das doenças monogénicas, ou seja, com uma mutação isolada num gene, resultem de alterações genéticas, epigenéticas ou até mesmo de fatores extrínsecos. Nas doenças epigenéticas, as iPSCs ganham marcas epigenéticas que podem ser transitórias ou permanentes, podendo manifestar o fenótipo da doença. Assim, o acompanhamento dos fenótipos é importante no estudo da doença e no *screening* de fármacos. As doenças ambientais, como por exemplo, o melanoma, manifestam-se por alterações na sequência do DNA ou na produção de proteínas<sup>16</sup>.

### Screening de fármacos

O desenvolvimento de um novo fármaco é um processo caro e moroso: de muitas moléculas-teste, são poucas as que chegam à fase final. Através da criação de modelos utilizando as iPSCs específicas de cada indivíduo, a melhor compreensão da fisiopatologia, ajudará na formulação de moléculas mais eficientes e seguras para o tratamento das diversas patologias. Para tal, ainda são necessários ajustes nos protocolos de reprogramação e diferenciação das iPSCs para que estas mantenham a sua qualidade e integridade genética<sup>15,16</sup>.

### Tratamento de doenças

Uma das maiores vantagens das iPSCs, é poder utilizá-las em transplante autólogo, ou seja, colher as células de um in-

divíduo, reprogramá-las e diferenciá-las numa certa linhagem e transplantá-las de novo no mesmo indivíduo. Este processo elimina problemas de histocompatibilidade e de rejeição. Alternativamente, também é possível efetuar transplantes alogénicos, isto é, a colheita das células de um indivíduo, que após procedimentos similares aos anteriormente referidos, são introduzidas noutra indivíduo. A rejeição imunológica torna-se novamente um problema, no entanto este processo é mais barato e menos demorado em relação ao transplante autólogo. Se necessário, as células em cultura poderão ser corrigidas geneticamente. As iPSCs também podem ser geradas *in vivo*, através da administração local dos fatores de reprogramação. Posteriormente são colhidas, diferenciadas *in vitro* na linhagem celular pretendida e reintroduzidas no indivíduo, no local afetado.

A engenharia de tecidos é outra aplicação potencial das iPSCs. A partir das iPSCs específicas de cada indivíduo, é possível gerar tecidos ou órgãos *in vitro*, sujeitos ou não a uma edição de genes, através de *scaffolds* (matrizes tridimensionais porosas) ou do *bioprinting* (construção de tecidos vivos em 2D ou 3D), que, posteriormente são transplantados para restabelecer uma função no organismo.

Existem técnicas que não envolvem a produção propriamente dita de iPSCs, mas necessitam de métodos de reprogramação/diferenciação eficazes e controlados. O rejuvenescimento celular é uma técnica que pode ser realizada *in vitro* ou *in vivo*, e consiste em converter células em senescência em células jovens através de fármacos epigenéticos,

sem afetar a especialização das mesmas. Embora ainda não esteja bem estabelecida, a transdiferenciação *in vivo* é uma técnica em que as células somáticas de uma linhagem são transformadas noutra linhagem diferente através de fatores de reprogramação, fatores de crescimento, entre outros. Permite que as células afetadas sejam transformadas em células saudáveis e administradas na pessoa em causa<sup>22</sup>.

Basicamente, estas técnicas são auxiliares preciosos na medicina regenerativa, seja na substituição, alteração, ou reparação de células ou tecidos danificados ou com perda de função, apresentando um potencial de intervenção terapêutica infinita. A edição de genes torna-se essencial na reparação dos defeitos, acoplada às várias técnicas descritas. Ainda assim, não está claro se as iPSCs resultantes dos vários processos escapam na totalidade a uma resposta imunológica, dada a sua manipulação. A escolha de um alvo apropriado numa doença e a identificação de fenótipos relevantes continua a ser um obstáculo a ultrapassar. Desta forma, torna-se extremamente importante otimizar os protocolos que envolvam a clínica das iPSCs, de modo a que estas sejam geradas com qualidade, em quantidade apropriada, de forma segura, para uma doença e, especificamente para um indivíduo.

## DOENÇA DE ALZHEIMER

### Caracterização e estado em Portugal

A Doença de Alzheimer (DA) é um distúrbio neurodegenerativo progressivo do sistema nervoso central (SNC) caracterizado pela perda de capacidades cognitivas, envolvendo a perda de

memória a longo prazo, alterações no processamento de informações visuais e espaciais, dificuldade de raciocínio, distúrbios comportamentais e alterações na rotina do indivíduo afetado. Em termos fisiológicos, há perda de densidade neuronal acompanhada de alterações na rede neuronal e nas sinapses, levando a uma atrofia cerebral e alteração nos ventrículos. Os principais marcadores neuropatológicos são: as placas amilóides (acumulação de formas insolúveis de peptídeo amilóide- $\beta$  ou A $\beta$  no espaço extracelular, as tranças neurofibrilares (agregados de proteína tau hiperfosforilada) intracelulares, perda neuronal e gliose<sup>33</sup>. A doença exibe três fases ao longo do tempo: 1) pré-clínica (fase silenciosa com início das alterações neuropatológicas); 2) déficit cognitivo ligeiro que envolve problemas de memória, linguagem e capacidade de decisão, mas não interfere com as atividades do quotidiano; e 3) demência<sup>34</sup>.

Existem dois tipos de Alzheimer: a Doença de Alzheimer esporádica (*sporadic Alzheimer's Disease*, SAD) e a Doença de Alzheimer hereditária autossômica dominante (*dominantly inherited Alzheimer's Disease*, DIAD). A SAD é o tipo mais comum, de início tardio, resultante de vários fatores, em parte do perfil genético, e da sua interação com o meio ambiente, estando envolvida principalmente a apolipoproteína E (apoE). A DIAD afeta menos de 5% da população, possui início precoce e as principais causas são mutações que ocorrem nos genes da proteína precursora amilóide (APP), presenilina 1 (PSEN1) e presenilina 2 (PSEN2). Existem fatores de risco modificáveis e não modificáveis associados à patologia. Entre os fatores modificáveis

incluem-se a doença vascular, diabetes, obesidade, tabagismo, consumo de álcool enquanto que os não modificáveis incluem idade, historial familiar, Síndrome de Down (*Down's syndrome*, DS), alelo  $\epsilon 4$  da apolipoproteína E (apoE4). No geral, os dois tipos são comparáveis na progressão e nos biomarcadores<sup>34</sup>.

Com o envelhecimento registado, quer a nível nacional, quer à escala global, o número de casos de demência tem aumentado significativamente. A DA representa 50-70% dos casos de demência e tem tido um crescimento praticamente exponencial com o aumento da idade. Estima-se que em 2050 existirão em todo o mundo cerca de 115,4 milhões de pessoas com DA, um número cerca de três vezes maior ao estimado em 2010<sup>35</sup>. O relatório *Health at a Glance* de 2017 coloca Portugal como o quarto país com mais casos por cada mil habitantes (19,9/1000)<sup>36</sup>. Tendo em conta este panorama, a classe mais idosa terá menor qualidade de vida e os encargos com as despesas de saúde serão cada vez maiores, pelo que surge a necessidade extrema de combater a doença, através do estudo detalhado da sua fisiopatologia e da investigação de novos fármacos.

### Fisiopatologia

Os principais constituintes das placas amilóides gerados por neurónios e outras células ao longo da vida, são peptídeos resultantes da clivagem proteolítica da APP por secretases. A  $\alpha$  e a  $\beta$  (BACE1) secretases clivam a APP em sequências diferentes, resultando  $\alpha$ -APPs+C83 e  $\beta$ -APPs+C99. Da clivagem do C83 e C99 pela  $\gamma$ -secretase, são originados respetivamente peptídeos p3 (não tóxicos) e peptídeos A $\beta$ 40 e A $\beta$ 42 (formas

insolúveis e tóxicas)<sup>37</sup>.

Na SAD, para que A $\beta$  se torne patológica é necessário que a sua produção esteja aumentada, ou, por outro lado, que haja um aumento do *misfolding* que favorece a agregação, e/ou que a sua eliminação esteja diminuída, estando também alterado o seu transporte através da BHE. A eliminação de peptídeo A $\beta$  do parênquima cerebral é essencial para evitar a sua acumulação e a formação de agregados. Para tal, quando formado, o peptídeo A $\beta$  pode ser ou imediatamente degradado pela neprilina (NEP) ou pela enzima responsável pela degradação da insulina (IDE); ou formar oligómeros que podem ser degradados pelas células da glia; e ainda atravessar a barreira hemato-encefálica (BHE) através da sua ligação às proteínas LRP1 e LRP2. A LRP1 medeia o transporte de A $\beta$  livre ou conjugado com outras proteínas e é inibido pelo alelo  $\epsilon 4$  da apoE4; a LRP2 transporta o peptídeo A $\beta$  ligado à clusterina (CLU). No sangue, é importante que sofra *clearance* por parte do fígado e dos rins. O transporte reverso para o cérebro também é possível se o peptídeo A $\beta$  se ligar aos recetores RAGE (*advanced glycation end product receptors*) da BHE. Dados recentes sugerem que os doentes com SAD têm uma *clearance* diminuída de peptídeo A $\beta$ , o que poderá envolver a apoE4 e a falha de células da glia e macrófagos<sup>38</sup>. Na DIAD, mutações na APP implicam alterações no seu processamento, levando ao aumento de peptídeo A $\beta$ , principalmente da isoforma A $\beta 42$  que é mais propícia à agregação, alterando também o *ratio* A $\beta 42$ /A $\beta 40$ . Devido à alteração da clivagem da  $\gamma$ -secretase, as mutações na PSEN1 e PSEN2 aumentam a produção de peptídeos A $\beta$  mais longos, au-

mentando o *ratio* anteriormente referido. De acordo com um estudo, o tipo de mutação e a relação A $\beta 42$ /A $\beta 40$  no plasma predizem a idade média de início da demência. Isto significa que existe uma via patológica comum apesar das diferentes mutações. Uma vez que o gene da APP se localiza no cromossoma 21, as pessoas com Síndrome de Down produzem mais A $\beta$  que o normal e desenvolvem precocemente quadros semelhantes à DA34. Uma mutação *missense* na APP resulta numa diminuição da clivagem pela  $\beta$ -secretase e, posteriormente, numa menor produção de A $\beta$ , tendo os portadores menor risco de DA e de declínio cognitivo<sup>39</sup>.

A deposição de peptídeo A $\beta$  sob a forma de placas altera as sinapses e ativa uma resposta inflamatória por parte da glia, gerando danos oxidativos e um desequilíbrio na homeostasia neuronal que alteram a atividade das cinases/fosfatases. Estes eventos propiciam a perda neuronal seletiva e depressão sináptica que leva à demência. O comprometimento de interneurónios inibitórios gabaérgicos e a estimulação exacerbada de recetores de glutamato pode resultar em excitotoxicidade, desencadeando um aumento na produção de peptídeo A $\beta$ , através de um ciclo vicioso, destabilizando ainda mais a rede<sup>40</sup>. Estudos recentes identificaram outros produtos resultantes da clivagem de APP que aumentam os seus níveis aquando do tratamento por inibidores da  $\beta$ -secretase, sugerindo que surgem a partir de protease(s) alternativa(s) que cliva(m) a APP<sup>39</sup>.

A apoE é uma proteína que possui três isoformas e é responsável pelo transporte dos lípidos, auxílio da remie-

linização dos axónios e pela modulação de recetores de glutamato e plasticidade sináptica. Os astrócitos são a fonte primária desta proteína, aumentando a sua expressão durante o envelhecimento e em resposta ao estrogénio, por exemplo. Os neurónios expressam apoE em situações de stresse ou lesões tecidulares. Uma observação relevante é que a fonte celular, a isoforma e a quantidade de apoE no SNC influenciam a deposição de peptídeo A $\beta$  e a degeneração neuronal<sup>33</sup>. Curiosamente, a presença do alelo  $\epsilon$ 2 na apoE na população idosa está relacionada com uma redução do risco de demência, mas com um aumento da carga amilóide em relação ao alelo  $\epsilon$ 3. Por outro lado, estima-se que o alelo  $\epsilon$ 4 da apoE seja responsável por 50% dos casos de SAD. Castellano et al.<sup>41</sup>, demonstraram que a apoE4 diminui acentuadamente a *clearance* de peptídeo A $\beta$ , prejudica a sinaptogénese e diminui a densidade da espinha dendrítica. Os níveis elevados de apoE4 em doentes com AD levou a um estudo onde se concluiu que, em resposta a danos cerebrais, a apoE é induzida para fins de remodelação, mas, concomitantemente, é clivada em fragmentos que levam à disfunção neuronal e mitocondrial. Por outro lado, nestes doentes, foi observado um decréscimo de gaba e somatostatina no cérebro e no líquido cefalorraquidiano (LCR), maior do que a diminuição decorrente da idade, contribuindo para o défice de memória e aprendizagem. A apoE4 está também relacionada com uma disfunção no metabolismo da glicose, contribuindo para a atrofia das mitocôndrias (em indivíduos saudáveis e doentes). Embora ainda não esclarecido, a apoE4 incompleta no

terminal-C aumenta a fosforilação da tau, contribuindo para a formação de espécies neurotóxicas<sup>33</sup>. Assim, a apoE4 causa comprometimento dependente da idade, dos interneurónios gabaérgicos e da tau.

O transportador lipídico ABCA7, regulador do colesterol e da homeostasia de fosfolípidos, e expresso em neurónios, microglia e macrófagos, está também envolvido na doença: o silenciamento do seu gene diminui o estado de lipidação da apoE e duplica os níveis das formas de peptídeo A $\beta$  e de placas amilóides, sendo importante na *clearance* deste peptídeo<sup>40</sup>.

A proteína tau, conhecida pela estabilização dos microtúbulos, pode aumentar a neurotransmissão excitatória, no entanto, ao ser modificada (hiperfosforilada), prejudica o processo<sup>33</sup>. A hiperfosforilação ocorre diretamente devido à falta de regulação das cinases/fosfatases ou indiretamente devido à toxicidade mediada pelo peptídeo A $\beta$ , stresse oxidativo e inflamação. A perda de função da tau desencadeia instabilidade dos microtúbulos e compromete o transporte axonal<sup>42</sup>. As tauopatias resultam da agregação intracelular de proteína tau e estão associadas a muitas desordens neurodegenerativas. Estudos científicos demonstraram que o peptídeo A $\beta$  induz a hiperfosforilação e a acumulação pós-sináptica de tau. Desta forma, as mutações na APP e presenilinas, que alteram a produção de peptídeo A $\beta$ , para além de gerarem placas amilóides, geram também as tranças neurofibrilares, enquanto alterações na tau geram apenas as últimas, mas tornam os neurónios vulneráveis ao peptídeo A $\beta$ <sup>39</sup>. A  $\alpha$ -sinucleína é uma proteína envolvida

na Doença de Parkinson que também forma agregados (*Lewy bodies*) interferindo com organelos intracelulares. Tanto a tau como a  $\alpha$ -sinucleína podem ser libertadas para o espaço extracelular e interagir com células<sup>33</sup>.

Mecanismos epigenéticos, alterações vasculares, o sistema imunitário e a reciclagem de vesículas endocíticas podem desempenhar um papel importante na patologia, necessitando de investigação adicional<sup>33,39</sup>.

### iPSCs na Doença de Alzheimer

Tal como referido anteriormente, os nichos neurogénicos compensam a neurodegenerescência envolvida na patologia. Uma estratégia endógena possível é a estimulação da neurogénese através da adição de fatores de crescimento, como o fator neurotrófico derivado do cérebro (*brain-derived neurothrophic factor*, BDNF), fator de crescimento nervoso (*nerve growth factor*, NGF), fator de crescimento de insulina I (*insuline growth factor*, IGF-I). No entanto, esta abordagem enfrenta alguns desafios, uma vez que a neurogénese e a massa neuronal diminuem ao longo da idade, e o efeito da patologia neste processo não é claro. Estratégias exógenas passam pela utilização de células estaminais para compensar o ambiente e a degeneração neuronal, melhorando a função cognitiva. As diferentes classes de células estão associadas a diferentes mecanismos, envolvendo a modulação da inflamação, a resposta da microglia, proteção contra a toxicidade induzida pelo peptídeo A $\beta$ , suporte à neurogénese e às sinapses. A tecnologia das iPSCs permite gerar neurónios funcionalmente maduros e diferenciá-los em subtipos neuronais,

relevantes no estudo da patologia *in vitro*<sup>43</sup>.

### Estudo dos mecanismos celulares e moleculares da patologia e *screening* de fármacos

Em 2011, Yagi *et al.*<sup>44</sup> geraram iPSCs de fibroblastos de um animal transgénico com DIAD e com mutação da PSEN1 (A246E) e PSEN2 (N121I), e diferenciaram-nos em neurónios. Como a diferenciação neuronal das iPSCs derivadas de fibroblastos com mutação teve o mesmo sucesso que a das iPSCs controlo, pode-se concluir que mutações nas PSEN não afetam a diferenciação neuronal. Tal como esperado, a produção de peptídeo A $\beta$  foi significativamente maior nas iPSCs com mutação, e estas também respondem melhor aos inibidores da  $\gamma$ -secretase, sendo estes neurónios úteis para o desenvolvimento de fármacos. A presença de tauopatias é difícil de observar em períodos de cultura reduzidos, sugerindo que acontece numa fase mais avançada.

Em 2012, Israel *et al.*<sup>45</sup> geraram iPSCs para estudar os fenótipos de SAD e DIAD. Em ambas as linhas foi observado o aumento da produção de peptídeo A $\beta$  e da fosforilação da tau (com ativação de uma cinase da tau, a GSK3 $\beta$ ). A adição de inibidores de  $\beta$  e  $\gamma$ -secretase reduziu os níveis de peptídeo A $\beta$ , mas apenas o primeiro reduziu a quantidade de GSK3 $\beta$  ativa e de tau fosforilada. A mesma equipa também observou um número superior de endossomas em neurónios resultantes de culturas de iPSCs de SAD e DIAD.

Em 2013, Kondo *et al.*<sup>46</sup> geraram iPSCs a partir de doentes com DA, com mutações na APP-E693 $\Delta$  e APP-V717L.

Hipotetizaram que a primeira mutação levava à DA de início precoce, mas sem deposição amilóide, enquanto que a segunda aumentaria o peptídeo A $\beta$  extracelular e o *ratio* A $\beta$ 42/A $\beta$ 40. As culturas foram enriquecidas com astrócitos e demonstraram que as da primeira mutação continham peptídeo A $\beta$  intracelular, devido ao stresse oxidativo. A adição de ácido docosa-hexaenóico (DHA) diminuiu o stresse oxidativo e a produção de ROS, sem alterar os níveis de peptídeo A $\beta$ . O estudo sugere que o tratamento com DHA poderá ser eficaz num subgrupo de doentes de DA.

Xu *et al.*<sup>47</sup>, a partir de neurónios diferenciados de iPSCs, demonstraram ser possível prevenir a toxicidade mediada pelo peptídeo A $\beta$  através da inibição de cinases dependentes de ciclinas (*cyclin-dependent kinase*, Cdk). As Cdk, em conjunto com suas subunidades reguladoras, as ciclinas, regulam o ciclo celular. Os autores utilizaram A $\beta$ 1-42 para induzir apoptose neuronal e posteriormente, com inibidores das Cdk contra Cdk2 e Cdk4, demonstraram que estes bloqueavam, parcialmente, os efeitos tóxicos mediados pelos peptídeos, diminuindo a morte neuronal.

Fong *et al.*<sup>48</sup> geraram iPSCs com uma mutação na tau-A152T. Através da utilização de ZFNs, criaram linhas isogénicas com a mutação e posterior correção. A mutação referida aumentou o número de fragmentos da tau pela caspase e a sua fosforilação, levando à degeneração axonal. A correção genética da mutação eliminou a proteólise da tau; aumentou 4 a 8 vezes o número de neurónios dopaminérgicos, o que sugere que este tipo de neurónios é extremamente vulnerável à toxicidade provocada pela tau;

e modificou a morfologia anormal dos outros tipos de neurónios.

Em 2015, Young *et al.*<sup>49</sup> utilizaram iPSCs derivadas de indivíduos com SAD para elucidar fenótipos associados à variação genética (alelos de risco ou proteção) no gene *sortilin related receptor 1* (SORL1), que codifica um fator de tráfego vesicular cujos níveis modulam o processamento de APP. A perda de expressão de SORL1 está associada a casos de SAD<sup>50</sup>. Os autores descobriram que os neurónios humanos portadores de variantes *SORL1*, ao serem tratados com BDNF ou cAMP, aumentaram a expressão de SORL1 e diminuíram o processamento de APP. Para determinar se esta diminuição requer a expressão de SORL1, foi feito um *knockdown* do gene e um tratamento posterior com BDNF e cAMP. Observou-se que a diminuição de peptídeo A $\beta$  foi basicamente anulada em neurónios com haplótipos P (alelos protetores), quando tratados com BDNF; os neurónios tratados com cAMP exibiram redução de peptídeo A $\beta$ . Este estudo sugere que o aumento da expressão de SORL1 por BDNF pode reduzir o risco de SAD em indivíduos portadores do haplótipo P.

Shi *et al.*<sup>51</sup> dedicaram-se ao estudo de doentes com DS e, como tal, geraram iPSCs a partir destes indivíduos e iPSCs a partir de controlos. Observaram que a linha DS produziu mais A $\beta$ <sup>40</sup> e A $\beta$ <sup>42</sup> que a linha controlo e que ao fim de algum tempo de cultura foram detetados agregados de peptídeos, assim como tau fosforilada ao nível intracelular e extracelular. Em 2015, Murray *et al.*<sup>52</sup> criaram um modelo não integrativo e isogénico de envelhecimento acelerado para neurónios derivados de iPSCs de indivíduos

com DS. Os autores observaram que tanto as linhas trissômicas como as de controlo geraram neurónios eletrofisiologicamente ativos, mas só nas primeiras houve um aumento da produção de peptídeo A $\beta$  e do número de agregados. Também detetaram aumento no número e no tamanho das mitocôndrias nos neurónios trissómicos, assim como um potencial de membrana mitocondrial diminuído e um aumento de ROS, o que é consistente com estudos anteriores que demonstraram perturbações neste organelo. No mesmo ano, Chang *et al.*<sup>53</sup> demonstraram o efeito de um composto da *Angelica sinensis* (ginseng), N-Butylidenephthalide (Bdph), na redução de A $\beta$ <sup>40</sup>, nos níveis de tau e na sua fosforilação nos neurónios, sugerindo a sua utilização benéfica no tratamento da DA e DS.

Gjoneska *et al.*<sup>54</sup> demonstraram que os genes da resposta imune são sobre-regulados, em oposição aos genes envolvidos na plasticidade sináptica, aprendizagem e memória que são regulados negativamente na DA, em ratos e humanos. As iPSCs têm sido diferenciadas não só em neurónios, mas também nas várias células da glia de modo a estudar a sua influência na patologia de Alzheimer. Oksanen *et al.*<sup>55</sup> geraram astrócitos a partir de iPSCs isogénicas de indivíduos com DA com mutação na PSEN1- $\Delta$ E9. Os autores observaram nos astrócitos alguns *hallmarks* da patologia, como o aumento da produção de peptídeo A $\beta$ , libertação alterada de citocinas, desregulação da homeostasia do cálcio, produção de ROS e disfunção mitocondrial. Desta forma, pode-se concluir que os astrócitos contribuem para a produção de peptídeo A $\beta$  e também diminuem a sua elimi-

nação. Por outro lado, a estimulação inflamatória levou ao aumento da libertação de citocinas pelos astrócitos, que foi atenuada pela adição de inibidores da Y-secretase, sugerindo que a resposta inflamatória está relacionada com a amiloidogénese. A mutação referida fez com que os astrócitos aumentassem a sua função respiratória (aumento de ROS), e diminuíssem a atividade glicolítica, reduzindo a produção de lactato, essencial para a memória e energia dos neurónios. Edsel *et al.*<sup>56</sup> geraram células da microglia derivadas a partir de iPSCs (*induced microglia-like cells*, iMGLs) com o objetivo de estudar de que forma estímulos externos envolvidos na DA influenciam a fisiologia destas células. As iMGLs libertam uma variedade de citocinas em resposta a estímulos inflamatórios, influenciando ainda mais o ambiente pró-inflamatório do SNC. As próprias placas de peptídeo A $\beta$  aumentaram a expressão de genes *ApoE*, *Trem2*, *Cd33* e *ApoJ*, implicados na modulação da fagocitose e na *clearance* de peptídeo A $\beta$ . O estudo também demonstrou que as iMGLs fagocitam os peptídeos A $\beta$ , os oligómeros de tau e terminais sinápticos, sugerindo que as microglias alteradas se tornam ineficazes. Estudos de associação genómica identificaram genes expressos pela microglia que estão associados ao risco de desenvolver DIAD, como o *Trem2* e o *Cd33*. São necessários estudos que gerem oligodendrócitos a partir de iPSCs de indivíduos com DA, dado que a disfunção deste tipo celular devido ao ambiente inflamatório e toxicidade mediada pelos peptídeos A $\beta$  e pelas tranças neurofibrilares poderá relacionar-se com a perda de mielina, necessária à condução nervosa<sup>57,58</sup>.

Em 2016, Balez *et al.*<sup>59</sup> geraram iPSC de indivíduos com SAD e DIAD para avaliar a potencial atividade da apigenina, uma flavona abundante na natureza. Após a adição de apigenina, esta demonstrou atividade neuroprotetora devido à redução significativa de apoptose mediada por caspases e ainda à sua atividade anti-inflamatória, diminuindo a libertação de citocinas e óxido nítrico em células inflamatórias. Este composto apresenta um potencial promissor na terapêutica da DA.

Birnbaum *et al.*<sup>60</sup> demonstraram, a partir de células neuronais derivadas de iPSCs de indivíduos com SAD, que a produção de ROS não estava relacionada com os níveis de peptídeo A $\beta$  e tau. Isto significa que a função mitocondrial poderá já estar alterada no início da doença, devido a uma sobre-regulação dos complexos da cadeia respiratória, que foi observada nestes doentes.

Brownjohn *et al.*<sup>61</sup>, através do *screening* fenotípico de iPSCs, identificaram compostos anti-helmínticos, as avermectinas, que reproduzem os efeitos dos moduladores da  $\gamma$ -secretase (*Y-secretase modulators*, GSMs) sem agir diretamente na enzima. Isto resulta na produção de mais fragmentos curtos de A $\beta$ , reduzindo assim o número de formas tóxicas. Os anti-inflamatórios não esteróides (AINEs) foram os primeiros a ser usados como GSMs.

Em 2014, Zhang *et al.*<sup>62</sup> foi um dos grupos pioneiros a demonstrar a utilidade de modelos 3D na mimetização das respostas em DA que não eram abordadas em modelos 2D. Através de neurónios diferenciados de iPSCs, os autores elucidaram o envolvimento das cinases P21 (PAKs), associadas a vias de trans-

dução que se refletem na dinâmica do citoesqueleto, na regulação de proteínas da família da actina, como a debrina e a cofilina. Neste modelo, a debrina, importante na morfogénese das espinhas, mostrou-se diminuída, as PAKs demonstraram estar sobre-estimuladas e a produção de peptídeo A $\beta$  induziu a sua redistribuição (e da debrina), eventos que não seriam detetados nos modelos convencionais. Em 2015, Kim *et al.*<sup>63</sup> geraram células progenitoras neuronais humanas (hNPCs) num sistema de cultura 3D (matrigel), a partir de uma linhagem de DIAD. Este modelo foi capaz de demonstrar os mecanismos moleculares subjacentes à produção, acumulação e deposição de agregados extracelulares de peptídeo A $\beta$ , bem como a hiperfosforilação da tau e sua agregação. Por outro lado, este modelo não fornece informação sobre a microglia, inflamação e danos sinápticos e neuronais. Também não foi “desenhado” para regiões específicas do cérebro mais afetadas na DA como o hipocampo. Ainda assim, o modelo criado conseguiu identificar os estádios iniciais e mais tardios da doença, o que per si já constitui um progresso relevante. Será de extrema importância que os sistemas 3D incluam elementos como a BHE, vascularização e resposta imune, os quais influenciam a doença e, conseqüentemente, a terapêutica.

Recentemente, Espuny-Camacho *et al.*<sup>64</sup> criaram um modelo quimérico através do transplante de precursores neuronais derivados de hiPSCs num rato com DIAD, com mutações na APP e PSEN1. Os autores observaram uma perda neuronal de 50%, provocada pelas neurites e sinapses aberrantes que rodeiam as placas amilóides. Esta degeneração neu-

ronal ocorreu na ausência de tranças da tau, que só se formaram posteriormente. Também notaram regulação positiva de genes relacionados com a mielinização e regulação negativa de genes associados à memória, cognição, transmissão sináptica e projeção axonal. Esta abordagem *in vivo* demonstra a importância dos mecanismos fisiopatológicos associados à patologia, constituindo mais um progresso científico.

### Tratamento da patologia

Atualmente existem dois grupos de fármacos disponíveis e aprovados pela *Food and Drug Administration* (FDA) para o tratamento da DA: os inibidores da acetilcolinesterase (donepezilo, rivastigmina e galantamina) e os antagonistas dos recetores N-metil-D-aspartato do glutamato (NMDA) (memantina). Os primeiros aumentam os níveis de acetilcolina nas fendas sinápticas, estimulando a comunicação entre os neurónios, o que melhora os sintomas de demência; os segundos evitam que o glutamato se ligue aos respetivos recetores, impedindo a entrada excessiva que cálcio nas células que provoca toxicidade. Fármacos como os antipsicóticos, antidepressivos e ansiolíticos são associados à terapêutica para melhorar outros sintomas<sup>34</sup>. Surge uma necessidade extrema de terapias eficazes para retardar a doença. Existem vários alvos passíveis de manipulação: os peptídeos A $\beta$ , diminuindo a sua produção (inibidores das secretases) ou aumentando a sua *clearance*; a apoE, diminuindo a sua expressão e bloqueando a sua clivagem e interação com A $\beta$ ; a tau, inibindo a sua fosforilação, acetilação (diminui o tempo de

vida) e agregação; a neuroinflamação; a cascata mitocondrial; e o stresse oxidativo. A utilização clínica das iPSCs na DA permite gerar novas células que tenham sido eliminadas ou adquirido uma função anormal durante a progressão da doença, ou ainda servir de vetor para a administração de fármacos, ultrapassando a barreira principal, a BHE.

Foi demonstrado em ratos com oligómeros A $\beta$  mutantes, mas sem placas, que a estimulação da neurogênese no hipocampo com antagonistas dos recetores de glutamato metabotrópicos tipo 2/3 evitava défices de comportamento, sendo uma opção terapêutica válida para determinados grupos de doentes<sup>65</sup>.

As hNPCs podem ser diferenciadas em neurónios, astrócitos, microglia e oligodendrócitos maduros e funcionais. Os novos neurónios integram-se na rede neuronal, resgatando as funções cognitivas e melhorando a sinaptogénese. Além disso, a edição de iPSCs permite que possa ser reduzida a expressão de secretases, diminuindo a produção de peptídeo A $\beta$  e posteriormente a hiperfosforilação da tau, controlando assim a neuroinflamação. No entanto, este transplante deverá ser efetuado em fases precoces, pois estudos referem que uma neurodegenerescência significativa poderá dificultar a sua sobrevivência<sup>66</sup>. Estudos realizados em ratos sugeriram que o transplante das NPCs melhorou as suas capacidades cognitivas no teste do labirinto aquático de Morris. O mesmo acontece com as células da glia; estudos com iPSCs sugerem que são os astrócitos mais antigos a produzir citocinas neurotóxicas que agravam a inflamação e induzem a apoptose. A diferenciação em células da glia diminuirá a inflamação na

patologia<sup>67</sup>. Outras células importantes envolvidas na inflamação são os macrófagos. Se estes forem derivados a partir das iPSCs, podem expressar também enzimas que degradam o peptídeo A $\beta$  e controlam o ambiente pró-inflamatório. As células da eminência ganglionar medial representam uma estrutura onde se localizam e desenvolvem os interneurônios, que apresentam disfunção em muitos modelos de DA. O seu transplante demonstrou melhorias na aprendizagem e memória em ratos sem expressão de apoE4, representando uma possível terapêutica para alguns indivíduos<sup>40</sup>.

As células estaminais neuronais induzidas (iNSCs) podem ser derivadas de tecidos primários, adultos, ou de ESCs e iPSCs. Estudos demonstraram a sua diferenciação e sobrevivência superior a seis meses após transplante. Dada a falta de informação relativa a mudanças no comportamento, são necessários mais estudos com este tipo de terapia celular. As iNSCs podem servir de vetores para fornecer agentes terapêuticos, como por exemplo a neprilisina, enzima que degrada o peptídeo A $\beta$ , entre outros; ou estimular a libertação de fatores neurotróficos, ajudando a retardar a progressão da doença<sup>40</sup>.

Uma das grandes vantagens das iPSCs consiste na possibilidade de se poder realizar uma terapêutica individualizada e mais dirigida. A intervenção deverá ser diferente consoante a fase clínica da patologia e deverá ter em conta o genótipo de apoE, idade, género, estilo de vida, história clínica e ainda dados resultantes de estudos genómicos, biomarcadores e *brain imaging*. Por exemplo, fármacos em que o alvo é a apoE, podem agir de maneira diferente em indivíduos com o

alelo 4. Desta forma, a partir dos modelos individuais criados com iPSCs específicas, a terapêutica e as atividades não farmacológicas serão ajustadas<sup>68</sup>.

### **Ensaio clínico na Doença de Alzheimer**

Os ensaios clínicos realizados em doentes com DA têm sido efetuados com vários tipos de células estaminais numa abordagem alogénica. O desafio futuro consistirá em realizar abordagens autólogas, através do transplante de iPSCs ou de células derivadas a partir destas.

Atualmente decorrem 21 ensaios clínicos que envolvem células estaminais na DA. Apenas 1, na fase de recrutamento, pretende gerar iPSCs a partir de indivíduos com transtornos neurológicos para o estudo dessas doenças e para o desenvolvimento de novas terapias<sup>69</sup>. Destes ensaios, apenas um apresenta resultados sobre a administração do fator gerador de colónias de granulócitos, em que há diminuição da carga amiloide e é revertido o comprometimento cognitivo de indivíduos com a doença.

O número crescente de ensaios clínicos com células diferenciadas ou progenitoras deverá ser acompanhado com o desenvolvimento de métodos não invasivos para rastrear as células transplantadas e técnicas de imagem precisas que garantam a visualização da sua entrega e o seu acompanhamento ao longo do tempo. A técnica de imagem ideal deverá ser sensível o suficiente para rastrear até uma célula e capaz de quantificar as células em regiões específicas do cérebro, com segurança para os doentes<sup>65</sup>.

O avanço dos ensaios clínicos depende fortemente de uma contínua investi-

gação focada nos mecanismos celulares e moleculares ainda por esclarecer na DA, assim como sobre a terapia celular com iPSCs e sua aplicação. Questões como a idade, fase da doença e o tipo celular mais adequado a transplantar em cada caso permanecem por elucidar, embora a genotipagem individual já seja um grande auxílio nesta temática.

### LIMITAÇÕES, PERSPETIVAS FUTURAS E CONCLUSÃO

Os problemas éticos e técnicos associados às células estaminais limitam a investigação e o desenvolvimento de métodos para a sua aplicação clínica. As ASCs são acompanhadas de algumas desvantagens, dadas as suas capacidades inferiores de proliferação e diferenciação, bem como a dificuldade no seu isolamento. Ainda assim, as células estaminais do sangue do cordão umbilical têm sido uma opção crescente em doentes sem dadores de medula óssea, pela sua plasticidade e baixa imunogenicidade, pelo que, estão a ser armazenadas em bancos de criopreservação<sup>3</sup>.

A possibilidade de reprogramar células somáticas em iPSCs, bem como programar a sua diferenciação numa outra linhagem celular supera as desvantagens já referidas das ESCs, facultando os tratamentos autólogos. As iPSCs apresentam, sem dúvida, um futuro promissor na compreensão e tratamento de doenças, bem como um auxílio insubstituível no *screening* de fármacos. No entanto, existem ainda uma série de obstáculos que urgem ser explorados e ultrapassados para que as iPSCs se assumam como uma opção terapêutica. Em primeiro lugar, será muito importante desenvolver protocolos laborato-

riais universais de obtenção de iPSCs, isto é, a partir da linhagem celular que melhor produz estas células (as células da pele têm demonstrado taxas de reprogramação mais eficientes), escolher o método de reprogramação adequado, incluindo um tempo de cultura reduzido e os fatores de transcrição necessários, e isolar as células totalmente reprogramadas, através da morfologia e marcadores de pluripotência. Como tal, devem ser desenvolvidas técnicas avançadas de deteção e estudados marcadores de pluripotência para que a deteção seja sensível e rápida. Em segundo, a escolha do vetor influencia a eficiência de reprogramação; os vetores integrativos devem ser substituídos por vetores não integrativos, com ou sem o uso de moléculas pequenas, que devem ser explorados de modo a aumentar a eficiência. Em terceiro lugar, as iPSCs devem ser bem caracterizadas (epi)genética e funcionalmente. É necessária uma maior compreensão dos fatores que induzem um aumento da instabilidade genética durante a reprogramação e a cultura das células, bem como a identificação de mutações prejudiciais ao seu desempenho. Abordagens “ômicas” permitem delinear a epigenética, fornecendo pistas para melhorar a conversão celular. O desenvolvimento de técnicas que gerem iPSCs sem mutações que causem perturbações genéticas, assim como a correção de linhagens celulares de iPSCs através das técnicas de edição de genes, fazem parte do futuro destas células. Em quarto lugar, é importante descodificar se as iPSCs modificadas podem sofrer alguma transformação maligna não visível antes ou depois da diferenciação. Em último lugar, para que as iPSCs sejam transplan-

tadas, é necessário escolher um vetor e uma via/local de administração, consoante o destino terapêutico. É essencial que os investigadores apostem nestas células para que se estabeleçam protocolos seguros, eficazes e com qualidade, desde a escolha do tipo celular para a sua geração até à célula diferenciada pretendida, incluindo a sua administração e manutenção no indivíduo alvo.

Relativamente à DA, é fundamental que se cumpram alguns requisitos para que as iPSCs possam avançar para os ensaios clínicos e, posteriormente, sejam aprovadas como uma opção terapêutica. A criação de modelos com iPSCs continua a ser uma ferramenta útil na DA para o estudo da doença e desenvolvimento de fármacos, dado que ainda se desconhecem vários mecanismos fisiopatológicos e os fármacos disponíveis são muito pouco eficazes. Os modelos deverão ser uma ilustração o mais próxima possível da realidade, através de técnicas tridimensionais, e devem ser completos, de modo a ter em conta o ambiente envolvente, as células que possam interferir na patologia e todos os processos fisiológico envolvidos. Para o tratamento da doença, a criação de *haplobanks* de iPSCs seria uma boa iniciativa, isto é, um banco de linhas celulares especificamente escolhidas, idealmente tipadas por antígenos leucocitários humanos (HLA) que correspondam ao máximo possível de destinatários, o que diminuiria a possibilidade de rejeição nos transplantes. A principal vantagem deste banco é a uniformização dos protocolos de obtenção de iPSCs, uma vez que existem diferenças devido aos diversos métodos utilizados nos vários laboratórios<sup>70</sup>. O desenvolvimento de coleções de células

de indivíduos afetados com os dois tipos de DA e com as várias predisposições genéticas também auxiliarão na pesquisa de biomarcadores específicos para cada caso, possibilitando a categorização de respondedores e não respondedores, otimizando a terapêutica. A partir da genotipagem individual, é necessário escolher o tipo celular em que as iPSCs devem ser diferenciadas: células progenitoras neuronais, neurónios ou células da glia, estabelecendo protocolos únicos de cultura, técnicas de administração e de rastreamento das células por imagem. Desafios como o armazenamento, distribuição e disponibilização do tratamento, deverão ser considerados. Para que o conhecimento científico gerado até ao momento seja transposto para a realidade clínica, para além de todo o esforço no estabelecimento dos vários processos, é necessária uma produção à escala industrial, o que envolveria recursos financeiros e humanos por parte das indústrias farmacêuticas<sup>65</sup>.

A descoberta científica das iPSCs abriu novas oportunidades para os investigadores e a sua transposição para a clínica das várias doenças poderá constituir um marco na história da humanidade, por possibilitar tratamentos até hoje nunca imaginados. A Doença de Alzheimer necessita urgentemente de novas opções terapêuticas capazes de diminuir o número de novos casos e de travar a progressão da doença, pelo que as iPSCs se apresentam como uma estratégia muito promissora.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Stem Cell Facts. International Society for Stem Cell Research. [consultado 2018 Abril 2]. Disponível em: <http://>

- [www.closerlookatstemcells.org/docs/default-source/patient-resources/stem-cell-facts.pdf?sfvrsn=4](http://www.closerlookatstemcells.org/docs/default-source/patient-resources/stem-cell-facts.pdf?sfvrsn=4).
- Gepstein, L., Skorechi, K. Regenerative Medicine, Cell, and Gene Therapies. In: GOLDMAN, L., SCHAFER, A., Goldman-Cecil Medicine. New York: Elsevier, Inc.; 2016.
  - Bragança, J., Tavares, A., Belo, J. Células estaminais e medicina regenerativa, um admirável mundo novo. *Revista da Sociedade Portuguesa de Bioquímica, Canal BQ*, 7. 2010.
  - Hu, M., Tevlin, R., Wan, D., Lorenz, H., Gurtner, G., Longaker, M. Stem cells and regenerative medicine. In: GURTNER, G., NELIGAN, P., Plastic Surgery. United States of America: Elsevier, Inc.; 2017.
  - Tesar, P.; Chenoweth, J.; Brook, F.; Davies, T.; Evans, E.; Mack, D.; Gardner, R.; McKay, R. New cell lines from mouse epiblast share defining features with human embryonic stem cells. *Nature*. 2007;448;196-199.
  - Liu, S., Li, C., Xing, Y., Tao, F. Effect of transplantation of human embryonic stem cell-derived neural progenitor cells on adult neurogenesis in aged hippocampus. *Am J Stem Cells*. 2014;3:21-26.
  - Klimanskaya, I., Chung, Y., Becher, S., Lu, S.J., Lanza, R. Human embryonic stem cell lines derived from single blastomeres. *Nature*. 2006;444;481-485.
  - Yu, J., Thomson, J. Pluripotent stem cell lines. *Genes Dev*. 2008;22;1987-1997.
  - Puri, M., Nagy, A. Concise Review: Embryonic Stem Cells Versus Induced Pluripotent Stem Cells: The Game Is On. *Stem Cells*. 2012;30;10-14.
  - Davis, R.L., Weintraub, H., Lassar, A.B. Expressions of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts. *Cell*. 1987;24;987-1000.
  - Takahashi, K., Yamanaka, S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 2006;126;663-676.
  - Gurdon, J.B. The cloning of a frog. *Development*. 2013;140;2446-2448.
  - Wilmut, I., Schnieke, A.E., McWhir, J., Kind, A.J., Campbell, K.H. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*. 1997;385;810-813.
  - Chaparro, O., Beltrán, O. Reprogramación Nuclear y Células Pluripotentes Inducidas. *Revista Med*. 2009;17;252-263.
  - Andargie, A., Tadesse, F., Shibbiru, T., Ababa, A. Review on Cell Reprogramming: Methods and Applications. *Journal of Medicine, Physiology and Biophysics*. 2016;1-10.
  - Kanherkar, R., Bhatia-Dey, N., Makarev, E., Csoka, A. Cellular reprogramming for understanding and treating human disease. *Front Cell Dev Biol*. 2014;67;1-21.
  - Werning, M., Meissner, A., Cassady, J.P., Jaenisch, R. c-Myc is dispensable for direct reprogramming of mouse fibroblasts. *Cell Stem Cell*. 2008;2;10-12.
  - Brambrink, T., Foreman, R., Welstead, G., Lengner, C., Wernig, M., Suh, H. et al. Sequential expression of pluripotency markers during direct reprogramming of mouse somatic cells. *Cell Stem Cell*. 2008;2;151-159.
  - Hu, K. All Roads Lead to Induced Pluripotent Stem Cells: The Technologies of iPSC Generation. *Stem Cells Dev*. 2014;23;1285-1300.
  - Nakanishi, M., Otsu, M. Development of Sendai Virus Vectors and their

Potential Applications in Gene Therapy and Regenerative Medicine. *Curr Gene Ther.* 2012;410-416.

21. Fan, K., Zhang, S., Zhang, Y., Lu, J., Holcombe, M., Zhang, X. A Machine Learning Assisted, Label-free, Non-invasive Approach for Somatic Reprogramming in iPSC Colony Formation Detection and Prediction. *Scientific Reports.* 2017;7;1-9.

22. Robinton, D., Daley, G. The promise of induced pluripotent stem cells in research and therapy. *Nature.* 2013;481;295-305.

23. Bilic, J., Belmonte, J. Concise Review: Induced Pluripotent Stem Cells Versus Embryonic Stem Cells: Close Enough or Yet Too Far Apart? *Stem Cells.* 2012;30;33-41.

24. Turinetto, V., Orlando, L., Giachino, C. Induced Pluripotent Stem Cells: Advances in the Quest for Genetic Stability during Reprogramming Process. *Int. J. Mol. Sci.* 2017;18;1-18.

25. Koehler, K., Tropel, P., Theile, J., Kondo, T., Cummins, T., Viville, S. et al. Extended passaging increases the efficiency of neural differentiation from iPSC. *BMC Neuroscience.* 2011;12;1-14.

26. Deboever, C., Li, H., Benaglio, P., Reyna, J., Olson, K.M., Huang, H. et al. Large-Scale Profiling Reveals the Influence of Genetic Variation on Gene Expression in Human Induced Pluripotent Stem Cells. *Cell Stem Cell.* 2017;20;533-546.

27. Puri, M., Nagy, A. Concise Review: Embryonic Stem Cells Versus Induced Pluripotent Stem Cells: The Game Is On. *Stem Cells.* 2012;30;10-14.

28. Marei, H., Althani, A., Lashen, A., Cenciarelli, C., Hasan, A. Genetically unmatched human iPSC and ESC exhi-

bit equivalent gene expression and neuronal differentiation potential. *Scientific Reports.* 2017;7;1-13.

29. Sarafian, R., Morato-Marques, M., Borsoi, J., Pereira, L. Monitoring cell line identity in collections of hiPSCs. *Stem Cell Research.* 2018;28;66-70.

30. Wu, M., Liu, S., Gao, Y., Bai, H., Machairaki, V., Li, G. et al. Conditional gene knockout and reconstitution in human iPSCs with an inducible Cas9 system. *Stem Cell Research.* 2018;29;6-14.

31. Hockemeyer, D., Jaenisch, R. Induced pluripotent stem cells meet genome editing. *Cell Stem Cell.* 2016;18;573-586.

32. Gitler, A., Dhillon, P., Shorter, J. Neurodegenerative disease: models, mechanisms, and a new hope. *Dis Model Mech.* 2017;10;499-502.

33. Huang, Y., Mucke, L. Alzheimer Mechanisms and Therapeutic Strategies. *Cell.* 2012;148;1204-1222.

34. Masters, C., Bateman, R., Blennow, K., Sperling, RA., Cummings, J. Alzheimer's disease. *Nat Rev Dis Primers.* 2015;15056;1-18.

35. Santana, I., Farinha, F., Freitas, S., Rodrigues, V., Carvalho, A. Epidemiologia da Demência e da Doença de Alzheimer em Portugal: Estimativas da Prevalência e dos Encargos Financeiros com a Medicação. *Acta Med Port.* 2015;28;182-188.

36. Health at a Glance 2017: OECD Indicators. Paris, 2017. [consultado 2018 Agosto 1]. Disponível em: [https://read.oecd-ilibrary.org/social-issues-migration-health/health-at-a-glance-2017\\_health\\_glance-2017-en#page21](https://read.oecd-ilibrary.org/social-issues-migration-health/health-at-a-glance-2017_health_glance-2017-en#page21).

37. Laferla, F., Green, K., Oddo, S. Intracellular amyloid-beta in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci.* 2007;8;499-509.

38. Zlokovic, BV. Neurovascular path-

- ways to neurodegeneration in Alzheimer's disease and other disorders. *Nat Rev Neurosci.* 2011;12;723-738.
39. Selkoe, DJ., Hardy, J. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. *EMBO Mol Med.* 2016;8;595-608.
40. Tong, LM., Fong, H., Huang, Y. Stem Cell therapy for Alzheimer's Disease and related disorders: current status and future perspectives. *Exp Mol Med.* 2015;47;1-8.
41. Castellano, J.M., Klim, J., Stewart, F.R., Jiang, H., Demattos, R.B., Patterson, B.W. et al. Human apoE isoforms differentially regulate brain amyloid- $\beta$  peptide clearance. *Sci Transl Med.* 2011;3;1-21.
42. Ballatore, C., Lee, V.M., Trojanowski, J.Q. Tau-mediated neurodegeneration in Alzheimer's disease and related disorders. *Nat Rev. Neurosci.* 2007;8;663-672.
43. Duncan, T., Valenzuela, M. Alzheimer's disease, dementia, and stem cell therapy. *Stem Cell Res Ther.* 2017;8:111;1-9.
44. Yagi, T., Ito, D., Okada, Y., Akamatsu, W., Nihei, Y., Yoshizaki, T. et al. Modeling Alzheimer's disease with induced pluripotent stem cells. *Human Molecular Genetics.* 2011;23;4530-4539.
45. Israel, M., Yuan, S., Bardym C., Reyna, S., Mu, Y., Herrera, C. et al. Probing sporadic and familiar Alzheimer's disease using induced pluripotent stem cells. *Nature.* 2012;482;216-220.
46. Kondo, T., Asai, M., Tsukita, K., Ohsawa, Y., Imamura, K., Egawa, N. et al. Modeling Alzheimer's disease with iPSCs reveals stress phenotypes associated with intracellular A $\beta$  and differential drug responsiveness. *Cell Stem Cell.* 2013;12;487-496.
47. Xu, X., Lei, Y., Luo, J., Wang, J., Zhang, S., Yang, X.J. et al. Preventions of  $\beta$ -amyloid induced toxicity in human iPSC cell-derived neurons by inhibition of Cyclin-dependent kinases and associated cell cycle events. *Stem Cell Res.* 2013;10;213-227.
48. Fong, H., Wang, C., Knoferle, J., Walker, D., Balestra, M., Tong, L. et al. Genetic Correction of Tauopathy Phenotypes in Neurons Derived from Human Induced Pluripotent Stem Cells. *Stem Cell Reports.* 2013;1;226-234.
49. Young, J.E., Boulanger-Weill, J., Williams D.A., Woodruff, G., Buen, F., Revilla, A.C. et al. Elucidating molecular phenotypes caused by the SORL1 Alzheimer's disease genetic risk factor using human induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell.* 2015;16;373-385.
50. Soldner, F., Jaenisch, R. Dissecting Risk Haplotypes in Sporadic Alzheimer's Disease. *Cell Death Dis.* 2015;6;1-13.
51. Shi, Y., Kirwan, P., Smith, J., Maclean, G., Orkin, S.H., Livesey, F.J. A human stem cell model of early Alzheimer's disease pathology in Down syndrome. *Sci Transl Med.* 2012;4:124;1-23.
52. Murray, A., Letourneau, A., Canzonetta, C., Stathaki, E., Gimelli, S., Sloan-Bena, F. et al. Brief report: isogenic induced pluripotent stem cell lines from an adult with mosaic down syndrome model accelerated neuronal ageing and neurodegeneration. *Stem Cells.* 2015;33;2077-2084.
53. Chang, C.Y., Chen, S.M., Lu, H.E., Lai, S.M., Lai, P.S., Shen, P.W. et al. N-butylidenephthalide Attenuates Alzheimer's Disease-Like Cytopathy in Down Syndrome Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Neurons. *Scientific Reports.* 2015;8755;1-7.

54. GJoneska, E., Pfenning, A.R., Mathys, H., Quon, G., Kundaje, A., Tsai, L.H. et al. Conserved epigenomic signals in mice and humans reveal immune basis of Alzheimer's disease. *Nature*. 2015;518;365-369.
55. Oksanen, M., Petersen, A.J., Naumenko, N., Puttonen, K., Lehtonen, S., Gubert, M. et al. PSEN1 Mutant iPSC-Derived Model Reveals Severe Astrocyte Pathology in Alzheimer's Disease. *Stem Cell Reports*. 2017;9;1885-1897.
56. Abud, E., Ramirez, R., Martinez, E., Healy, L., Nguyen, C., Newman, S. et al. iPSC-derived human microglia-like cells to study neurological diseases. *Neuron*. 2017;94;278-293.
57. Cai, Z., Xiao, M. Oligodendrocytes and Alzheimer's disease. *Int J Neurosci*. 2016;126;97-104.
58. Ehrlich, M., Mozafari, S., Glatza, M., Starost, L., Velychko, S., Hallmann, A.L. et al. Rapid and efficient generation of oligodendrocytes from human induced pluripotent stem cells using transcription factors. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2017;114;E2243-E2252.
59. Balez, R., Steiner, N., Engel, M., Muñoz, S., Lum, J., Wu, Y. et al. Neuroprotective effects of apigenin against inflammation, neuronal excitability and apoptosis in an induced pluripotent stem cell model of Alzheimer's disease. *Scientific Reports*. 2016;31450;1-16.
60. Birnbaum, J.H., Wanner, D., Gietl, A.F., Saake, A., Kundig, T.M., Hock, C. et al. Oxidative stress and altered mitochondrial protein expression in the absence of amyloid- $\beta$  and tau pathology in iPSC-derived neurons from sporadic Alzheimer's disease patients. *Stem Cell Res*. 2018;27;121-130.
61. Brownjohn, P., Smith, J., Portelius, E., Serneels, L., Kvartsberg, H., De Strooper, B. et al. Phenotypic Screening Identifies Modulators of Amyloid Precursor Protein Processing in Human Stem Cell Models of Alzheimer's Disease. *Stem Cell Reports*. 2017;4;870-882.
62. Zhang, D., Pekkanen-Mattila, M., Shahsavani, M., Falk, A., Teixeira, A., Herland, A. A 3D Alzheimer's disease culture model and the induction of P21-activated kinase mediated sensing in iPSC derived neurons. *Biomaterials*. 2014;35;1420-1328.
63. Kim, Y.H., Choi, S.H., D'Avanzo, C., Hebisch, M., Sliwinski, C., Bylykbashi, E. et al. A 3D human neural cell culture system for modeling Alzheimer's disease. *Nat Protoc*. 2015;10;985-1006.
64. Espuny-Camacho, I., Arranz, A.M., Fiers, M., Snellinx, A., Ando, K., Munck, S. et al. Hallmarks of Alzheimer's Disease in Stem-Cell-Derived Human Neurons Transplanted into Mouse Brain. *Neuron*. 2017;93;1066-1081.
65. Hunsberger, J.G., Rao, M., Kurtzberg, J., Bulte, J.W.M., Atala, A., Laferla, F.M. et al. Accelerating stem cells trials for Alzheimer's disease. *Lancet Neurol*. 2016;15;219-230.
66. Yang, J., Li, S., He, X.B., Cheng, C., Le, W. Induced pluripotent stem cells in Alzheimer's disease: applications for disease modeling and cell-replacement therapy. *Molecular Neurodegeneration*. 2016;11;39;1-11.
67. Devineni, A., Tohme, S., Kody, M., Cowley, R.A., Harris, B. Stepping back to move forward: a current review of iPSCs in the fight against Alzheimer's disease. *Am J Stem Cells*. 2016;5;99-106.
68. Peng, X., Xing, P., Li, X., Qian, Y., Song, F., Bai, Z. et al. Towards Personalized Intervention for Alzheimer's

Di-sease. Genomics, Proteomics & Bioinformatics. 2016;5;289-297.

69. ClinicalTrials.gov. U.S. National Library of Medicine. [consultado 2019 Julho 22]. Disponível em: <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=Alzheimer&ter->

[m=stem+cell&cntry=&state=&city=&dist=&Search=Search](https://clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=Alzheimer&term=stem+cell&cntry=&state=&city=&dist=&Search=Search).

70. Barry, J., Hyllner, J., Stacey, G., Taylor, C., Turner, M. Setting Up a Haplobank: Issues and Solutions. *Curr Stem Cell Rep.* 2015;1;110-117.