



Potencial terapêutico de células estaminais na doença de Parkinson

Nuno Manuel Barbosa dos Santos

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Medicina
(mestrado integrado)

Orientador: Prof. Doutor Francisco José Alvarez Pérez

abril de 2022

Dedicatória

Aos meus pais que sempre me incentivaram a ser a melhor pessoa possível, porque sem eles nunca chegaria aqui.

Agradecimentos

À Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade da Beira Interior, por estes 6 anos incríveis e por me darem todos os meios para ter os conhecimentos que tenho hoje.

Ao meu orientador, o Doutor Francisco Álvarez, por aceitar o meu pedido para orientação nesta dissertação, e por toda a disponibilidade e dedicação durante este processo.

À minha mãe, por todos os sacrifícios que fez por mim para que eu pudesse ter uma boa educação e me permitiu chegar tão longe.

Ao meu pai, que faz o possível e o impossível por mim, sempre acreditando em mim.

À minha irmã, que um dia também estará no meu lugar e vai chegar ainda mais longe.

À Sofia por ser o meu apoio, maior fonte de motivação e a melhor companhia que podia ter.

À minha avó Jerónima e avô Armindo, que são sempre uma voz amiga e estão sempre dispostos a apoiar.

À minha avó Elsa e avô Manuel, que sempre quiseram ver um neto na universidade.

Ao meu padrinho Luís, que deixou o mundo um lugar melhor do que o que estava.

É por estas pessoas que estou na posição em que estou hoje.

Espero deixar-vos orgulhosos.

Obrigado.

Prefácio

"If I have seen further,
it is by standing upon the shoulders of giants"

- Isaac Newton

Resumo

A doença de Parkinson é a segunda doença neurodegenerativa mais frequente, afetando 1% da população acima de 60 anos. Dado que o envelhecimento é o principal fator de risco desta patologia, a sua incidência tende a aumentar, em paralelo com o envelhecimento da população mundial. Como as deficiências motoras na doença de Parkinson resultam em grande parte da perda de neurónios dopaminérgicos na substância negra, esta é há muito tempo considerada uma das doenças mais promissoras para terapia baseada em células estaminais, visto abrir a possibilidade de inserir novos neurónios dopaminérgicos a partir de células estaminais embrionárias e de células estaminais pluripotentes induzidas no cérebro humano.

As células estaminais têm a capacidade de proliferar e de se diferenciar em várias linhagens celulares, oferecendo um vasto conjunto de recursos para aplicações terapêuticas. O uso de células estaminais para tratar doenças neurodegenerativas tornou-se assim uma área de grande interesse.

A perda neuronal de dopamina é responsável por muitas das características fisiopatológicas da doença, como rigidez e bradicinesia, que podem ser tratadas no início da doença com medicamentos dopaminérgicos. Contudo, esta é apenas uma terapêutica sintomática. Essa medicação não substitui a dopamina apenas no local de maior perda, mas sim de forma geral, nem imitam a libertação normal de dopamina nesses locais. Sendo assim, o seu uso resulta em efeitos colaterais, como discinesias e problemas comportamentais. Em contraste, as terapias de substituição de neurónios dopaminérgicos têm o potencial de resolver essas desvantagens da farmacêutica dopaminérgica, fornecendo uma terapêutica modificadora da doença.

Atualmente, vários especialistas reconhecem a possibilidade de células estaminais revolucionarem a forma como vemos e tratamos a doença de Parkinson, fornecendo assim uma nova esperança para os pacientes que vivem com esta doença.

Palavras-chave

Doença de Parkinson; Células estaminais; Células estaminais embrionárias; Células estaminais pluripotentes induzidas; Terapia celular

Abstract

Parkinson's disease is the second most common neurodegenerative disease, affecting 1% of the population over 60 years of age. Since aging is the main risk factor for this pathology, its incidence tends to increase, in parallel with the aging of the world population. As the motor impairments in Parkinson's disease largely result from the loss of dopaminergic neurons in the substantia nigra, this has long been considered one of the most promising diseases for stem cell-based therapy, as we will be able to insert new dopaminergic neurons from embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells into the human brain.

Stem cells have the ability to proliferate and differentiate into various cell lineages, offering a vast set of resources for therapeutic applications. The use of stem cells to treat neurodegenerative diseases has thus become an area of great interest.

Neuronal loss of dopamine is responsible for many of the pathophysiological features of the disease, such as rigidity and bradykinesia, which can be treated early in the disease with dopaminergic medications. However, this is only a sintomatic therapy. This medication does not replace dopamine only at the site of greatest loss, but in the whole body, not imitating the normal release of dopamine at those sites. Therefore, its use results in side effects, such as dyskinesias and behavioral problems. In contrast, dopaminergic neuron replacement therapies have the potential to address these drawbacks of the dopaminergic drugs, providing a disease-modifying therapy.

Currently, several experts recognize the possibility that stem cells could revolutionize the way we view and treat Parkinson's disease, thus providing some hope for patients living with this disease.

Keywords

Parkinson's disease; Stem cells; Embryonic stem cells; Induced pluripotent stem cells; Cell therapy

Índice

Capítulo 1 - Introdução	1
Capítulo 2 - Metodologia	2
Capítulo 3 - Doença de Parkinson	3
3.1 Epidemiologia	3
3.2 Etiologia e patogénese	3
3.3 Patofisiologia	5
3.4 Manifestações Clínicas	6
3.5 Diagnóstico	7
3.6 Tratamento	7
Capítulo 4 - Células estaminais	11
4.1 O que são?	11
4.2 Evidências históricas da eficácia de CE no tratamento da DP	12
4.3 Tipos de células estaminais	13
4.3.1 Células estaminais neurais	13
4.3.2 Células estaminais mesenquimais	14
4.3.3 Células estaminais hematopoiéticas	15
4.3.4 Células estaminais embrionárias	16
4.3.5 Células estaminais pluripotentes induzidas	17
4.4 Utilidade na pesquisa farmacêutica	18
Capítulo 5 - Terapia de células estaminais na doença de Parkinson	21
5.1 Tipos de células estaminais a aplicar	22
5.2 Estudos com CE em animais	23
5.3 Ensaios clínicos com CE em humanos	28
Capítulo 6 - Conclusão	37
Referências Bibliográficas	39

Lista de Tabelas

Tabela 1: Ensaios clínicos a usar células estaminais como terapia na DP	36
---	----

Lista de acrônimos

DP	Doença de Parkinson
MPTP	1-metil-4-fenil-1,2,5,6-tetra-hidropiridina
LRRK2	Quinase de repetição rica em leucina
SNCA	Alfa sinucleína
GBA	Glucocerebrocidase
PINK1	Quinase 1 induzida por homólogo de fosfatase e tensina
SNc	Parte compacta da substância negra
GPI	Segmento interno do globo pálido
SNr	Parte reticulata da substância nigra
REM	Rápidos movimento dos olhos
PET	Tomografia por Emissão de Positrões
SPECT	Tomografia computadorizada por emissão de fóton único
LD	Levodopa
DA	Dopamina
SNC	Sistema nervoso central
BHE	Barreira hematoencefálica
COMT	Catecol-O-metil transferase
MAO	Monoamina oxidase
CE	Células estaminais
CEE	Células estaminais embrionárias
CEH	Células estaminais hematopoiéticas
CEM	Células estaminais mesenquimais
CEN	Células estaminais neurais
CEPI	Células estaminais pluripotentes induzidas

MVF	Mesencéfalo ventral fetal
ZSV	Zona subventricular
ZSG	zona subgranular
SMAD	Fusão dos genes <i>Caenorhabditis elegans</i> Sma e <i>Drosophila</i> Mad
BMP	Proteína morfogenética do osso
TGF β	Fator transformador de crescimento β
Wnt	Wingless-related integration site
SHH	Sonic hedgehog
GSK3	Quinase sintetase de glicogénio 3
6-OHDA	6-hidroxidopamina
FPF	Fibrilas pré-formadas de α -sinucleína
MPP +	1-metil-4-fenilpiridínio
TuJ1	Beta-tubulina classe III
TH	Tirosina hidroxilase
GDNF	Fator neurotrófico derivado da glia
BDNF	Fator neurotrófico derivado do cérebro
NGF	Fator de crescimento nervoso
IGF-1	Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
CEEP	Células estaminais embrionárias partenogénicas humanas
FDA	Food and Drug Administration
EUA	Estados Unidos da América
HLA	Antigénios leucocitários humanos
CiRA	Centro de pesquisa e aplicação de CEPI
UPDRS	Escala Unificada de Avaliação da Doença de Parkinson

Capítulo 1 - Introdução

A doença de Parkinson (DP) é a segunda doença neurodegenerativa mais comum depois da doença de Alzheimer e uma das doenças de movimento mais comuns. A doença, caracterizada por sintomas motores e não motores, afeta cerca de 1% da população com mais de 60 anos, expectando-se um aumento desse número com o envelhecimento da população nos países desenvolvidos(1). Uma das marcas da DP é a perda de neurónios dopaminérgicos do mesencéfalo, associada à disfunção motora característica, incluindo bradicinesia, rigidez e tremor de repouso, sendo o diagnóstico desta doença clínico suportado pela resposta favorável à terapêutica dopaminérgica, sobretudo a levodopa.

Atualmente, a terapia de reposição de dopamina com levodopa e/ou agonistas de DA, é o gold standard da terapêutica, em vez de prevenir dano dos neurónios dopaminérgicos. Embora os tratamentos farmacológicos possam melhorar significativamente a qualidade de vida de muitos pacientes com DP, a janela terapêutica para alcançar benefícios antiparkinsonianos sem induzir efeitos colaterais, como discinesia, diminui com o tempo na maioria dos pacientes.(2) . Portanto, o uso e o desenvolvimento de estratégias neuroprotetoras e modificadoras da doença é uma necessidade absoluta, que levará a ganhos promissores na pesquisa translacional da DP.

Atualmente, decorrem investigações em células estaminais como substitutos de neurónios incapacitados ou tecidos degenerados. Efetivamente, acredita-se que o transplante de células dopaminérgicas seja a terapia de substituição de células mais promissora. O transplante de neurónios dopaminérgicos do mesencéfalo em estriado que seja deficiente nestes, pode restaurar a neurotransmissão de DA substituindo neurónios perdidos em pacientes com DP.(3)

O objetivo principal desta dissertação é compreender o potencial que as células estaminais possuem na terapêutica da doença de Parkinson, analisando a informação publicada na literatura científica neste âmbito. De modo a atingir este objetivo será feita uma revisão dos vários tipos de células estaminais e como se enquadram no potencial terapêutico desta doença.

Para um melhor enquadramento do tema, esta dissertação está organizada em 3 secções: na primeira é descrita a doença de Parkinson; na segunda parte é abordado conceitos sobre células estaminais; na terceira parte é analisado o impacto da terapia de células estaminais na doença de Parkinson.

Capítulo 2 - Metodologia

A realização desta monografia foi baseada em artigos, em inglês e português, usando como base de dados as plataformas online PubMed, Google Scholar e o clinicaltrials.gov. Não foi efetuada restrição da data de publicação dos artigos, mas estes foram selecionados pelo fator de impacto e número de citações.

Sendo, de momento, a terapêutica à base de células estaminais um alvo de grande interesse pela comunidade científica, e de forma a garantir que o conteúdo apresentado fosse o mais atualizado e completo, houve tendencialmente um maior foco de interesse pelos artigos mais recentes, mas a data de publicação não foi um critério de exclusão. De todos os artigos apresentados em cada uma das bases de dados, foram eliminados aqueles que pelo seu *abstract* se desviam do objetivo de análise desta monografia. Além disso, foi realizada uma análise das referências dos artigos utilizados, de forma a garantir que outros estudos relevantes fossem incluídos nesta dissertação.

As palavras usadas na pesquisa foram *Parkinson's disease; stem cells; embryonic stem cells; induced pluripotent stem cells; cell therapy*. Esta pesquisa foi realizada desde dezembro de 2020 até dezembro de 2021.

Capítulo 3 - Doença de Parkinson

3.1 Epidemiologia

A doença de Parkinson (DP) é o distúrbio de movimento mais comum e a segunda doença neurodegenerativa mais comum, superada apenas pela doença de Alzheimer.(4) A incidência mundial da DP é estimada em 5 a 35 novos casos por 100.000 indivíduos por ano.(5) A prevalência da DP em países industrializados é geralmente estimado em 0,3% de toda a população e cerca de 1% em pessoas com mais de 60 anos de idade.(1) A DP surge geralmente entre os 50 e os 80 anos de idade, com um pico na sétima década de vida, sendo mais prevalente nos homens (3:2)(6), porém as mulheres têm uma taxa de mortalidade mais alta e uma progressão mais rápida da doença(7), embora outros estudos não tenham encontrado diferenças significativas na prevalência de DP entre homens e mulheres.(1) O início da DP raramente ocorre antes dos 50 anos, ocorrendo um aumento acentuado da incidência após os 60 anos.(1)

A mortalidade não aumenta na primeira década após o início da doença, mas aumenta posteriormente, eventualmente duplicando em comparação com a população em geral.(1) A melhoria nos cuidados de saúde levará a um aumento da prevalência da doença de Parkinson ao longo do tempo, prevendo-se que o número de casos de doença de Parkinson duplique entre 2005 e 2030.(1)

3.2 Etiologia e patogênese

A maioria dos casos de DP ocorrem esporadicamente (85-90%) e são de causa desconhecida.(8) A doença de Parkinson é uma doença multifatorial, influenciada por fatores genéticos e ambientais. A idade é o maior fator de risco para DP com uma média de idade de início de 60 anos. A droga intravenosa MPTP (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine) foi revelada como uma causa de parkinsonismo quando usada como droga recreativa. Estudos epidemiológicos revelaram um aumento de risco no desenvolvimento de DP na exposição a pesticidas, vida rural e ingestão de água de poço.(8)

Ao longo dos últimos anos foram identificados fatores de risco genéticos. Membros da família de primeiro grau de pacientes afetados têm 2 a 3 vezes maior risco de desenvolver a doença em comparação com sujeitos na população em geral.(4) Foram identificadas causas monogênicas de DP, que foram consideradas muito raras até à identificação de

mutações da quinase de repetição rica em leucina (LRRK2) que, em populações selecionadas, causam até 40% dos casos, sendo a causa mais comum de doença familiar.(4)

Até à data, a investigação tem sido focada nas vias provocadas por mutações em SNCA, GBA, LRRK2 e PINK1/Parkin. A mutação no gene SNCA foi das primeiras a ser associado à doença de Parkinson hereditária tendo uma idade de início mais precoce, uma resposta moderada à levodopa com progressão mais rápida, sinais piramidais e manifestações não motoras.(4)

As mutações no gene GBA representam o fator de risco genético mais importante para o desenvolvimento da doença. Este gene codifica a glucocerebrosidase, uma enzima lisossomal que está em déficit na doença de Gaucher. As alterações na função lisossomal podem prejudicar o processamento e eliminação da alfa sinucleína, levando a uma acumulação desta, explicando a associação desta mutação com a DP.(8)

Mutações de Parkin e PINK1 foram também identificadas como causas de DP, sendo que as de Parkin são a causa mais comum de DP de início precoce, associada a transmissão autossômica recessiva.(8)

Tanto os fatores ambientais como genéticos podem afetar processos celulares fundamentais. Diversos fatores foram implicados na patogênese da morte celular na DP, incluindo stress oxidativo, inflamação, disfunção mitocondrial e stress proteolítico. (8)

Um dos desafios na pesquisa de novas terapias para a DP é adquirir as condições de modelos da doença necessárias para ensaios clínicos. Em muitos estudos com animais, a DP pode ser parcialmente imitada em animais experimentalmente, expondo-os a produtos químicos usados como pesticidas, inseticidas e herbicidas. A administração dessas neurotoxinas podem induzir um dano específico nos neurónios dopaminérgicos para estudar a fisiopatologia, características clínicas e patogênese da DP.(9) Acredita-se que tais produtos químicos sejam uma causa direta do parkinsonismo em humanos. Modelos animais comuns induzidos por toxinas incluem injeções estereotáxicas de 6-hidroxi-dopamina (6-OHDA), MPTP e fibrilas pré-formadas de α -sinucleína (FPF).(3)

6-OHDA é um composto neurotóxico sintético usado por investigadores para destruir seletivamente DA e neurónios noradrenérgicos no cérebro. O metabolismo da 6-OHDA gera radicais livres que causam stress oxidativo e disfunção mitocondrial, levando à morte celular neuronal, neuroinflamação e neurodegeneração. Uma vez que 6-OHDA não consegue cruzar a barreira hematoencefálica, este deve ser injetado na substância negra ou no estriado diretamente.(3)

MPTP já foi um produto químico industrial e o seu uso indevido em humanos resulta na severa disfunção motora que se assemelha a uma fase avançada de DP. Quando injetado em animais, o MPTP é absorvido pelos astrócitos e metabolizado em 1-metil-4-fenilpiridínio (MPP⁺), uma neurotoxina que prejudica o transporte de elétrons na mitocôndria, resultando no acúmulo de radicais livres ionizantes. Estes modelos podem fornecer os meios para imitar a perda de neurónios dopaminérgicos na substância negra e dano na expressão de DA. No entanto, eles foram criticados porque a taxa de neurodegeneração é muito maior do que em pacientes com DP. Além disso, nem o 6-OHDA nem MPTP produzem inclusões de corpos de Lewy na via negroestriatal.(3)

Em modelos de FPF, a introdução de inclusões de α -sinucleína no estriado causou disfunção neuronal, dano mitocondrial e, eventualmente, degeneração retrógrada de neurónios dopaminérgicos negroestriatais. O uso mais apropriado de modelos animais na pesquisa pré-clínica é avaliar se uma terapia reduz ou elimina as inclusões α -sinucleína nos neurónios.(3)

3.3 Patofisiologia

Do ponto de vista patológico, a DP caracteriza-se pela perda de neurónios dopaminérgicos na parte compacta da substância negra (SNc). (2,6)

As características da DP incluem perda neuronal em áreas específicas da substância negra e acúmulo generalizado de proteína intracelular (α -sinucleína). Embora nem a perda de neurónios dopaminérgicos na substância negra, nem a deposição de α -sinucleína em neurónios sejam específicos para a DP, essas duas neuropatologias principais são específicas para um diagnóstico definitivo de DP idiopática quando aplicadas em conjunto. (5)

Na doença em fase inicial, a perda de neurónios dopaminérgicos é restrita à substância negra ventrolateral, com preservação relativa de outros neurónios dopaminérgicos do mesencéfalo, acabando por se difundir numa fase mais terminal da doença. A perda desses neurónios dopaminérgicos, mesmo no início da doença, sugere que a degeneração nesta região começa antes do início de sintomas motores. (5)

Uma série de circuitos neuronais ligam os núcleos da base com as regiões motoras corticais correspondentes. O estriado é a principal região aferente dos núcleos da base, enquanto o segmento interno do globo pálido (GPi) e a parte reticulata da substância negra (SNr) constituem as principais regiões eferentes. A eferência dos núcleos da base fornece o tónus inibitório aos neurónios do tálamo e do tronco encefálico, que por sua vez, se

conectam com sistemas motores no córtex cerebral e na medula espinhal para regular a função motora.(8)

Efetivamente, na DP a neurodegeneração dopaminérgica na SNc reduz os níveis de dopamina no estriado, condicionando uma hiperatividade neuronal da região eferente dos núcleos de base (GPi/SNr) associando-se a diminuição dos movimentos, ou parkinsonismo. Contudo, a hipoatividade resultará na facilitação e involuntariedade dos movimentos.(8)

3.4 Manifestações Clínicas

A DP apresenta um curso progressivo e manifesta-se através de vários sintomas motores e não motores.(6,8)

Dentro dos sintomas motores, apresenta bradicinesia, definida como diminuição progressiva da velocidade e amplitude dos movimentos; rigidez, determinada por um aumento do tônus muscular com resistência na movimentação; tremor de repouso caracterizado por movimento involuntário, rítmico e oscilatório; comprometimento da marcha e da estabilidade postural, sendo que na DP a marcha é lenta, de base estreita, com passos curtos e baixos, com assimetria do normal balanceio dos membros superiores durante a marcha, pelo que as voltas podem ser decompostas com múltiplos pequenos passos, podendo haver bloqueios da marcha (freezing of gait). (6)

A DP é hoje reconhecida como uma doença multissistémica. Além dos sintomas motores cardinais, sabemos que a DP se caracteriza por uma panóplia de sintomas não motores, tais como as manifestações neuropsiquiátricas da doença como deterioração cognitiva, depressão, ansiedade, psicose, apatia e fadiga, sendo notável que a demência estava presente em 83% dos doentes a longo prazo(5); queixas gastrointestinais como disfagia, enfartamento e obstipação; autonómicas como retenção ou urgência urinárias, disfunção sexual, sialorreia, hipersudorese, hipotensão ortostática; manifestações sensitivas como hiposmia e dor; manifestações visuais como alterações da perceção do contraste, ilusões e alucinações visuais; distúrbios do sono com sonhos vívidos e atividade hipermotora noturna na perturbação do comportamento do sono REM, hipersonolência diurna e síndrome das pernas inquietas, entre outros (6), todos eles conhecidos como manifestações não dopaminérgicas, visto não responderem totalmente à terapia dopaminérgica.(8)

Os sintomas não motores são frequentemente o primeiro sintoma que motiva a procura pelos serviços médicos, pelo impacto que condicionam na qualidade de vida dos

doentes(6), visto que estes sintomas não dopaminérgicos precedem o início dos sintomas motores clássicos por vários anos ou até mesmo décadas. (8)

3.5 Diagnóstico

Atualmente não existe um biomarcador ou teste que nos permita afirmar categoricamente o diagnóstico da doença(6). O diagnóstico baseia-se, fundamentalmente nos sintomas clínicos e inicia-se com a confirmação da existência de parkinsonismo, caracterizado por bradicinesia, em combinação com qualquer tremor de repouso, rigidez, ou ambos (10). O diagnóstico requer, ainda, a exclusão de causas de parkinsonismo secundário e de outras lesões do sistema nervoso central.(8)

O diagnóstico clínico é suportado pela resposta favorável à terapêutica dopaminérgica, sobretudo a levodopa.(6)

O exame de imagem do sistema dopaminérgico do cérebro na DP com PET ou com SPECT revela uma redução da captação de marcadores dopaminérgicos no estriado, particularmente na parte posterior do putâmen (8). Porém, o exame de imagem é raramente necessário na prática clínica, visto que o diagnóstico pode ser habitualmente estabelecido pelos critérios clínicos.(8)

Os testes genéticos podem ser úteis para a deteção das mutações associadas à doença, mas à semelhança dos exames imagiológicos não são usados por rotina, porque as formas monogénicas são raras contando para apenas 5% dos casos.(8)

3.6 Tratamento

Não existem atualmente terapêuticas capazes de diminuir ou travar o processo neurodegenerativo nem de substituir os neurónios perdidos.(6)

As intervenções terapêuticas atualmente disponíveis apenas têm a capacidade de melhorar os sintomas da doença, com eficácia notoriamente mais elevada nos sintomas motores.(6) Perda de neurónios dopaminérgicos na parte compacta da substância negra, levando à depleção de dopamina estriatal, é o mecanismo central subjacente aos sintomas motores cardinais da doença de Parkinson.(5)

A levodopa (LD) foi o primeiro fármaco usado eficazmente no tratamento da DP, permanecendo o mais eficaz no tratamento dos sintomas motores. No entanto este é apenas um tratamento sintomático.(6) A LD mantém-se o *gold standard* no tratamento da DP e

parkinsonismo, e com o tempo, praticamente todos os pacientes com DP necessitarão de tratamento com este agente.(5) No entanto, o seu uso é complicado porque o tratamento prolongado com LD está associado a complicações motoras, nomeadamente flutuações na resposta motora e discinesias.(8) As flutuações na resposta motora correspondem à alternância entre períodos “on”, durante os quais o fármaco surte o seu efeito, e períodos “off”, durante os quais estão presentes características parkinsonianas.(8) As discinesias são movimentos involuntários, geralmente de natureza coreiforme.(8)

LD é o precursor direto de dopamina (DA) e é um pró-fármaco adequado, pois facilita a penetração do SNC e entrega de DA, visto que esta não atravessa a barreira hematoencefálica (BHE).(8) Nas fases iniciais da DP, a LD é um método muito eficaz de tratamento, e é administrada em combinação com inibidores da dopa descarboxilase, como a carbidopa ou a benserazida. Estes inibidores não conseguem atravessar a BHE e bloqueiam a conversão periférica da LD em dopamina, evitando assim, grande parte dos efeitos adversos do fármaco.(11) Outros efeitos secundários podem ocorrer sistemicamente, incluindo arritmias cardíacas, hipotensão ortostática, náuseas e vômitos como um resultado do metabolismo periférico de LD.(11)

Estratégias para superar esses problemas foram estabelecidas, de forma a garantir a presença de níveis constantes de DA no cérebro de um paciente com DP.(11) Em condições normais, os níveis estriatais de dopamina mantêm-se relativamente constantes. Na DP, uma vez que os neurónios dopaminérgicos degeneram, a dopamina estriatal passa a depender da disponibilidade periférica de LD. (8) Uma estratégia seria inibir a degradação de LD nos tecidos periféricos, de forma a evitar os efeitos adversos. Preparações de libertação imediata de LD têm uma curta semi-vida de 1-3 horas, que pode ser prolongada por um inibidor de catecol-O-metil transferase (COMT), através de entacapona, tolcapona e opicapona, ou por um inibidor da MAO-B, como selegilina, rasagilina ou safinamida. Como resultado, os níveis de LD atingindo a BHE serão aumentados, intensificando a sua entrada e mantendo níveis próximos do normal de DA no cérebro.(11)

Os inibidores da MAO-B, bloqueiam o metabolismo central da dopamina e aumentam as concentrações sinápticas deste neurotransmissor.(5) Estes fármacos também podem ser utilizados em monoterapia, no início da doença, ou como adjuvantes da terapêutica com LD, contribuindo para a redução dos períodos “off” e aumento dos períodos “on”.(8) Os seus efeitos colaterais mais comuns são as náuseas, tonturas, boca seca e obstipação. Além disso, quando em associação com a LD, estes fármacos podem aumentar as discinesias, mas normalmente este problema é ultrapassado com a redução da dose de LD.(8)

A enzima COMT é responsável pela metabolização de LD.(8) Assim, a inibição desta enzima na periferia aumentará a biodisponibilidade e a semi-vida de LD, beneficiando particularmente os pacientes que desenvolveram flutuações motoras do tipo *wearing off*(5), em que a duração do benefício de uma dose individual vai diminuindo.(8) Os seus principais efeitos adversos são os sintomas dopaminérgicos, que podem ser controlados com a redução da dose de LD. Além disso, podem originar diarreia intensa e alterações da coloração da urina. A tolcapona pode provocar hepatotoxicidade, sendo necessária monitorização regular da função hepática.(8)

Acredita-se que os agonistas da dopamina induzem menor estimulação pulsátil estriatal do receptor de dopamina do que LD, sendo considerado uma explicação para o risco significativamente reduzido de induzir complicações motoras quando os agonistas da dopamina são usados como monoterapia inicial na doença de Parkinson.(5) Uma vantagem dos agonistas da dopamina é a sua semi-vida mais longa que a LD, o que os torna promissores como terapias adjuvantes em pacientes com flutuações motoras.(5) À semelhança da LD, a administração destes fármacos pode originar sintomas dopaminérgicos agudos e transtornos de controlo de impulsos. Além disso, o seu uso crónico está associado a alucinações e défice cognitivo.(8)

Nos doentes com DP, boa resposta à LD, mas com complicações motoras após otimização da terapêutica por neurologista, ou com efeitos adversos intoleráveis da medicação, a estimulação cerebral profunda do núcleo subtalâmico ou globo pálido interno é uma opção terapêutica eficaz e segura para pacientes cuidadosamente selecionados, sem contra-indicações para esta cirurgia.(6) A intervenção consiste na implementação de um eléctrodo na zona alvo, que é conectado a um estimulador inserido no tecido subcutâneo da parede torácica.(8) Esta opção terapêutica pode apresentar efeitos colaterais relacionados com o procedimento cirúrgico (hemorragia, enfarte e infeção), com o sistema de estimulação (infeção, rutura do fio e ulceração da pele) ou com a própria estimulação (anormalidades oculares, da fala, musculares e depressão).(8)

Nunca é demais enfatizar o papel positivo do reforço da capacidade física dos doentes, através de treino de marcha, equilíbrio e reforço muscular.(6) Exercício físico tem demonstrado manutenção e até melhoria da função motora para pacientes com DP, sendo que exercícios ativos e passivos com amplitude total de movimento reduzem o risco de artrite e congelamento de articulações.(8)

Efetivamente, LD permanece o melhor tratamento sintomático para DP e o *gold standard* contra o qual as novas terapêuticas experimentais são comparadas. Atualmente nenhum tratamento médico ou cirúrgico oferece benefícios anti parkinsonianos como os

que são conseguidos com LD. Quase todos os pacientes apresentam melhorias, e na falha de resposta, o diagnóstico deverá ser questionado.(8)

Apesar de todas estas estratégias, os bloqueios (freezing) da marcha e a instabilidade postural são sintomas muitas vezes refratários às terapêuticas atualmente disponíveis.(6)

De facto, temos assistido a uma expansão das opções terapêuticas, nomeadamente dirigidas às complicações motoras da doença. No entanto, as intervenções terapêuticas atualmente disponíveis para a DP estão longe de satisfazer as necessidades clínicas, pelo que se aguardam com expectativa os resultados das múltiplas linhas de investigação em curso.(6)

Capítulo 4 - Células estaminais

4.1 O que são?

O termo “Stammzelle” (“célula estaminal”) foi originalmente usado em 1868 por um médico e químico alemão, Ernst Haeckel, para descrever o “organismo ancestral unicelular do qual evoluem todos os organismos multicelulares”.(2)

Atualmente sabemos que as células estaminais (CE) fornecem os blocos de construção para todos os órgãos do corpo. Elas têm a capacidade única de se dividir assimetricamente e se diferenciar nos vários tipos de células do corpo, ao mesmo tempo que se replicam para manter uma linhagem de CE. Elas estão presentes em quase todos os tecidos humanos, sendo que em embriões, elas se diferenciam em todos os tecidos e órgãos do corpo, e no ser humano adulto, elas fornecem uma capacidade de renovação na maioria dos órgãos. (12)

Existem diferentes formas de CE, cada uma com uma "potência" variável. Potência refere-se à capacidade de uma CE se replicar e se diferenciar em diferentes tipos de células. As CE totipotentes e pluripotentes têm a maior potência e são obtidas nas fases de desenvolvimento pré-embriônico. Os blastômeros que surgem de um óvulo fertilizado (zigoto) são CE totipotentes e têm o potencial de se diferenciar em todos os órgãos do corpo, incluindo a placenta. Um agrupamento de blastômeros passa a formar um blastocisto, que tem uma cavidade oca e uma massa celular interna de células estaminais embrionárias (CEE). Estas CE são de natureza pluripotente e, em relação às CE totipotentes, elas perderam a capacidade de se diferenciar em placenta, mantendo a sua capacidade de formar todos os órgãos e tecidos do corpo.(12)

As CE pluripotentes diferenciam-se em CE multipotentes, que incluem células estaminais hematopoiéticas (CEH), células estaminais mesenquimais (CEM) e células estaminais neurais (CEN). Estas células têm como objetivo diferenciar-se ainda mais em células de um determinado órgão ou sistema, isto é, CEH diferenciam-se em células do sangue e sistemas imunológicos e CEN em células do cérebro e do sistema nervoso. CE multipotentes diferenciam-se em células progenitoras que são oligo e unipotentes, estando ainda mais comprometidas com um número limitado de tipos de células que podem originar. (12)

Até recentemente, a diferenciação de células estaminais era considerada unidirecional; no entanto, ao introduzir um número definido de fatores em células

totalmente diferenciadas (por exemplo, pele ou células sanguíneas) num ambiente de laboratório, é possível originar um tipo de célula que, mais uma vez, tem capacidade pluripotente. Estas são referidas como células estaminais pluripotentes induzidas (CEPI). (13)

O comportamento e o destino das CE são fortemente influenciados pelas suas localizações anatómicas específicas e tipos de células circundantes, chamados de "nicho de células estaminais". O nicho fornece suporte físico para hospedar ou ancorar CE e fornece fatores para mantê-las e regulá-las. As CE também são reguladas por cascatas de sinalização intrínsecas e mecanismos de transcrição, alguns dos quais são comuns a todas as CE e outros que são exclusivos de tipos específicos.(14)

4.2 Evidências históricas da eficácia de CE no tratamento da DP

O transplante de diferentes tecidos para o cérebro começou como uma abordagem experimental para a compreensão de aspetos fundamentais do desenvolvimento e função do sistema nervoso central. O primeiro transplante em modelo animal da DP foi realizado em 1979 com o objetivo de determinar se as células produtoras de dopamina enxertadas eram capazes de reduzir as alterações motoras no modelo animal.(15) Estes e outros relatórios iniciais sobre a sobrevivência do tecido do enxerto no cérebro e os seus efeitos benéficos num modelo animal com DP contribuíram para o início da era do transplante de células estaminais na DP. Quarenta anos após os primeiros estudos neste campo, existe um interesse contínuo no desenvolvimento de terapias de substituição de células para o tratamento da DP, com foco particular na pesquisa para fontes de células ideais para o enxerto.(16)

No final dos anos 1970 e 1980, vários estudos de referência mostraram que enxertos de tecidos poderiam sobreviver no cérebro de roedores adultos a longo prazo e diferenciar-se em neurónios dopaminérgicos, com crescimento de fibras no estriado do hospedeiro(17), formar e receber sinapses do cérebro hospedeiro(18), libertar dopamina de maneira adequadamente regulada(19) e restaurar a função em modelos animais de DP que imita a via nigroestriatal perdida.

Estes trabalhos pré-clínicos forneceram um grande impulso para a transição para ensaios clínicos em pacientes com DP que foram enxertados com tecido do mesencéfalo ventral fetal (MVF) no estriado. O primeiro estudo duplo-cego comparando transplantes de tecidos do MVF contra um grupo de controlo de cirurgia simulada foi realizado em 2001,

onde os pacientes que receberam injeções bilaterais de células fetais no putâmen demonstraram uma recuperação modesta em comparação com o grupo controlo.(20) Não houve melhorias significativas em pacientes com mais de 60 anos e alguns pacientes que receberam enxertos fetais desenvolveram discinesias e distonia.(20) Esses efeitos colaterais indesejados dos enxertos fetais, juntamente com a introdução da estimulação cerebral profunda em 1997 para tratar tremores na DP, levou a que os transplantes de células para DP fossem temporariamente suspensos até recentemente, quando o consórcio TRANSEURO, uma iniciativa em andamento com financiamento europeu com o objetivo de fornecer protocolos padronizados para transplante de MVF, revisitou os enxertos de mesencéfalo ventral fetal para o tratamento de DP num ensaio multicêntrico.(21)

Outros estudos retrospectivos examinaram cérebros post-mortem de pacientes com DP que sobreviveram mais de 10 anos após receberem transplantes de mesencéfalo fetal no início da década de 1990.(22,23) Eles concluíram que os neurónios dopaminérgicos enxertados permanecem saudáveis e funcionais, resultando num alívio sintomático de longo prazo em alguns dos pacientes no estudo. Apesar de uma pequena percentagem de neurónios enxertados desenvolverem corpos de Lewy que podem sugerir a propagação da doença de hospedeiro para o enxerto, a maioria dos neurónios era saudável e funcional por mais de uma década nesses pacientes.

Em suma, o transplante de tecido mesencéfalo ventral fetal para o corpo estriado de pacientes com DP forneceu uma prova de que as terapias celulares podem fornecer benefícios clínicos a longo prazo.(24)

4.3 Tipos de células estaminais

4.3.1 Células estaminais neurais

CEN humanas foram isoladas de cérebros fetais e adultos e mostraram dar origem a neurónios e glia *in vitro*, e diferenciar-se em neurónios no cérebro de ratos.(25) Essas descobertas apoiam a teoria de que as CEN são boas candidatas à terapia de transplante de células para doenças neurológicas.

CEN são progenitores multipotentes que têm a capacidade de produzir fatores neurotróficos e diferenciar-se em linhagens celulares do sistema nervoso central e periférico, incluindo neurónios e células gliais de suporte (como astrócitos e oligodendrócitos). No cérebro adulto, as CEN são limitadas ao hipocampo e desempenham um papel importante no apoio à plasticidade. Aquelas encontradas na zona subventricular (ZSV) do hipocampo estão em contacto com o líquido cefalorraquidiano, movendo-se

radialmente e diferenciando-se em neuroblastos jovens. CEN na zona subgranular (ZSG) também se movem radialmente e diferenciam-se em neuroblastos, mas são referidos como CEN tipo glia radial.(12,14) Neuroblastos continuam a amadurecer e diferenciam-se em neurónios. CEN são abundantes nos cérebros fetais, principalmente nas fases iniciais de desenvolvimento. Uma vez colhidas do cérebro fetal, elas podem ser dissociadas e cultivadas em laboratório como uma monocamada de células ou como "esferóides" flutuantes que produzem fatores neurotróficos que podem ser diferenciados em mais linhagens neuronais definidas.(12)

CEN podem ser isoladas do mesencéfalo ventral fetal ou ser geradas *in vitro* a partir de CEE ou CEPI humanas.(12) Para gerar CEN, a primeira etapa é a indução neural. Através de uma série de ativadores e inibidores das vias de sinalização celular, este processo produz CEN semelhantes a células epiteliais neurais e de seguida, progenitores neurais intermediários, assemelhando-se ao desenvolvimento embrionário.(14)

Estudos demonstraram que a pequena molécula bioativa guggulsterona pode ser usada para aumentar dramaticamente a diferenciação neuronal para neurónios dopaminérgicos.(26) Este método permite o estabelecimento de um protocolo para produzir populações puras de células neuronais de grau clínico a partir de CE pluripotentes humanas e é um avanço importante para o desenvolvimento de um tratamento eficaz para a doença de Parkinson.

4.3.2 Células estaminais mesenquimais

CEM foram provadas ser benéficas para o tratamento de muitas doenças, incluindo DP. Como as CEM apresentam baixa imunogenicidade, sem risco de teratoma, pouco debate e preocupação ética e uma baixa probabilidade de ser tumorogénica após transplante no corpo humano, ensaios clínicos usando CEM como um agente terapêutico estão em andamento.(3)

As CEM podem ser isoladas de várias fontes, incluindo aspirado de medula óssea, músculo, pele, polpa dentária, sangue periférico e geleia de Wharton de cordões umbilicais neonatais. Estas CEM demonstraram ter diferenciação multipotente nas linhagens mesodérmicas, endotelial e de células ectodérmicas, incluindo células neuronais.(27) CEM de cada uma dessas fontes são, no entanto, mais propensas a diferenciar-se nas células da sua origem e, portanto, são mais comprometidas com essas linhagens.(12) CEM da medula óssea e cordões umbilicais têm sido usadas em engenharia de tecidos e reparo neural porque são fáceis de serem isoladas dos adultos ou recém-nascidos e podem proliferar por mais de 30 passagens *in vitro* sem perder as suas diferenciações multipotentes.(27)

CEM de cordão umbilical humano são ideais para uso em aplicações terapêuticas devido à sua capacidade de diferenciação em multilinhagem, viabilidade de transplante autólogo, fácil aquisição e falta de problemas éticos. No entanto, CEM de cordão umbilical humano transplantado têm baixa taxa de sobrevivência no hospedeiro, e as células transplantadas da veia podem causar embolização capilar e incontável divisão celular.(3)

Sob condições de indução neuronal, as CEM podem ser induzidas a diferenciar-se em direção a células tipo neurônios e astrócitos.(3) CEM recentemente isoladas da medula óssea e células indiferenciadas mesmo antes da diferenciação são capazes de gerar marcadores característicos de células neurais.(28)

Evidências adicionais sugerem que o microambiente cerebral estimula a diferenciação de CEM em células neurais. Quando infundidas no estriado do cérebro de rato, foram relatadas a migrar e integrar-se. Até 72 dias após o transplante, as células são encontradas no córtex cerebral, no lobo temporal, através do eixo rostro-caudal, e mesmo contralateral ao local injetado.(28,29)

Existe uma elevada disponibilidade de CEM de várias fontes de tecidos e as preocupações éticas são menores em comparação com as CEE. Além disso, as CEM não são tumorigênicas em comparação com as CEE ou as CEPI. As CEM também secretam uma variedade de fatores tróficos para sinalização parácrina e têm a capacidade de se diferenciar numa ampla gama de tipos de células. Devido a estas características vantajosas das CEM, são assim, uma escolha atraente para o tratamento de várias doenças. (30)

4.3.3 Células estaminais hematopoiéticas

As CEH são células estaminais multipotentes tradicionalmente usadas para o tratamento de doenças malignas e não malignas do sangue e do sistema imunológico. Elas podem ser colhidas diretamente da medula óssea, sangue periférico (após o pré-tratamento para mobilizar CEH da medula óssea) ou sangue do cordão umbilical. Dependendo da condição a ser tratada, as CEH são recolhidas do paciente ou de um doador saudável para ser usado como autólogo ou transplante alogênico, respectivamente. Transplante alogênico, no entanto, vem com a restrição da necessidade de haver correspondência genética entre o doador e o receptor, a fim de evitar a rejeição do enxerto ou, mais preocupantemente, o risco de doença *graft vs host* e a sua associada mortalidade. Os pacientes serão também submetidos a terapia imunossupressora vitalícia.(12)

O transplante de CEH é realizado maioritariamente (90%) para tratar malignidades hematológicas, incluindo leucemia, linfoma e mieloma múltiplo. Secundário a essas

indicações é o tratamento de tumores sólidos, enquanto as condições não malignas incluem insuficiência da medula óssea, hemoglobinopatias e distúrbios imunológicos primários. Em todos estes casos, o princípio básico do transplante de CEH é repor a medula óssea com CE que reconstituam o sistema imunológico com uma linhagem funcional de células hematopoiéticas.(12)

Efetivamente, tem havido poucos estudos e pouca utilidade para uso de CEH em doenças neurológicas. Paralisia cerebral e encefalopatia isquêmica hipóxica são as indicações neurológicas mais tratadas com CEH, havendo pouca utilidade destas células na DP.(12)

4.3.4 Células estaminais embrionárias

CEE é um termo geral aplicado a células estaminais derivadas do início de fases de desenvolvimento de um embrião. As CEE são derivadas da massa celular interna de um blastocisto normalmente derivado de fertilização *in vitro*.(28)

As primeiras linhas de CEE foram isoladas em 1981 de blastocistos de ratos(31), e 17 anos depois, foram geradas linhas de CEE humanas. (32) Estas células possuem todas as características das verdadeiras células estaminais, são capazes de proliferar sem limitação de autorrenovação, dando origem a células que são derivadas de todas as três camadas germinativas. (28)

CEE são altamente proliferativas e retêm a pluripotência após longos períodos de expansão *in vitro*. Como podem dar origem a qualquer tipo de célula do corpo, incluindo neurónios dopaminérgicos, o seu potencial num ambiente clínico parece ser ótimo.(33) No entanto, uma grande desvantagem de usar CEE para o transplante é a tendência do tecido enxertado a formar tumores, principalmente teratocarcinomas derivados de CEE indiferenciadas ainda presentes na população transplantada. O crescimento do tumor pode ser evitado por separação de células pluripotentes daquelas que iniciaram a diferenciação, seja por fluorescência ou classificação de células magneticamente ativada, ou induzindo que todas as células transplantadas se comprometam com a via de diferenciação dopaminérgica. (34)

Um dos maiores obstáculos ao uso de CEE como terapia na DP é atingir a diferenciação destas células em progenitores neurais e neurónios dopaminérgicos funcionais. Assim, tentando combater esta adversidade, Kirkeby e colegas desenvolveram um estudo em que definem protocolos para a geração rápida e eficiente de neurónios específicos e regionalizados de CEE, baseados na inibição de SMAD dupla (direcionando a

sinalização de BMP e TGF β), juntamente com a ativação dupla das vias Wnt e SHH (*sonic hedgehog*), e formação de corpo embrióide facilitando a indução de neurónios dopaminérgicos do mesencéfalo enquanto suprime linhagens alternativas. Adicionando um produto químico (CHIR99021) inibidor da quinase sintetase de glicogénio 3 (GSK3) que funciona como um agonista de Wnt, foram capazes de induzir a especificação dose-dependente de progenitores neurais regionalmente definidos. Deste modo, a falta de sinalização por Wnt durante a indução neural resulta num destino rostral, enquanto um alto nível de Wnt levou a um destino caudal (medula espinhal). Níveis intermediários de sinalização por Wnt induzidos por 0,7 μ M de CHIR99021 foram ideais para as especificações do mesencéfalo, necessários para a produção de progenitores dopaminérgicos essenciais à terapia da DP. Através deste protocolo, dez dias após o início da diferenciação, os progenitores poderiam ser transplantados ao estriado de rato adulto, onde formaram enxertos ricos em neurónios e livres de tumor mantendo a sua especificação regional. Este é um avanço significativo em relação a outros protocolos existentes, visto que, elimina a necessidade de cultura prolongada antes do transplante, tornando-o económico e reduzindo a variação e assincronia associada à diferenciação *in vitro* prolongada antes do transplante.(35)

Duas desvantagens potenciais podem limitar a aplicação terapêutica das CEE. Primeiro, gerar estas células estaminais requer óvulos fertilizados de doadores e a destruição de embriões, o que levanta uma infinidade de questões éticas e preocupações legais. Em segundo lugar, os enxertos derivados de CEE são alogénicos para os pacientes recetores, sendo necessário assim, regimes imunossupressores vitalícios. Apesar dessas limitações, CEE são atualmente o *gold standard* para a terapia com células estaminais para a DP, e CEE derivadas de neurónios dopaminérgicos do mesencéfalo estão a ser atualmente desenvolvidas para ensaios clínicos.(36)

4.3.5 Células estaminais pluripotentes induzidas

Em 2006, Shinya Yamanaka e os seus colegas relataram o seu trabalho inovador sobre a reprogramação de células somáticas de ratos diferenciadas terminalmente em células estaminais pluripotentes induzidas de tipo embrionário.(37) Estes demonstraram que quatro fatores de transcrição (ou seja, Oct4, Sox2, Klf4 e c-Myc) poderiam reverter fibroblastos de ratos em CEPI semelhantes a CEE. Posteriormente, este e outros grupos reprogramaram tecidos somáticos humanos em CEPI usando os mesmos ou conjuntos semelhantes de fatores. (38,39)

Esta tecnologia de CEPI oferece a possibilidade de gerar células estaminais específicas para doenças e pacientes, sem a destruição de embriões. Assim, revolucionando não apenas a pesquisa com células estaminais destinadas a estudar o desenvolvimento humano e os mecanismos de doenças, mas também ofereceu um novo paradigma para a terapia celular personalizada, fornecendo fontes de células estaminais autólogas potencialmente ilimitadas.(2)

Transplantes de epitélio pigmentado da retina derivadas de CEE e CEPI foram testados em pacientes com degeneração macular relacionada à idade, uma das principais causas de cegueira entre a população idosa, e têm demonstrado resultados promissores no atraso da progressão da doença.(40)

De facto, as células dopaminérgicas derivadas de CEPI podem contornar muitos dos principais problemas associados ao transplante de células estaminais fetais, tais como, as questões éticas de uso de tecido abortado, as questões médicas relacionadas à rejeição imunológica e imunossupressão e também o problema do fornecimento e disponibilidade.(2) No entanto, tal como CEE, o risco de formação de tumor deve ser minimizado, antes que os neurónios dopaminérgicos derivados de CEPI possam ser considerados como uma opção de transplante em DP. Além disso, existem preocupações sobre se os neurónios dopaminérgicos recebidos por transplante autólogo em DP seriam mais suscetíveis à patologia da doença visto que, as mutações genéticas também podem estar presente nas células derivadas de fibroblastos.(33)

Uma vantagem de usar CEPI para terapia de substituição de células é que células autólogas derivadas destas podem ser usadas no próprio corpo do doador com reduzidas preocupações na rejeição imunológica.

4.4 Utilidade na pesquisa farmacêutica

As qualidades únicas das CEPI oferecem várias vantagens ao tentar modelar e estudar a DP. Uma das suas características mais influentes é sua especificidade para o paciente. Os fibroblastos podem ser retirados de um indivíduo que sofre de DP, reprogramados para um estado pluripotente usando certos de fatores de transcrição e, em seguida, diferenciados em neurónios dopaminérgicos do mesencéfalo diretamente afetados pela DP.(13) As amostras de CEPI transformaram a forma como abordamos modelos científicos e também o estudo da neurodegeneração.(37) Estes modelos preservam a suscetibilidade genética, a maquinaria molecular nativa e as vias de transcrição individuais necessárias para tal doença.(13)

Embora os modelos atuais nunca possam imitar totalmente a DP, os modelos de CEPI alcançam condições robustas e fenotipicamente semelhantes para a estudar. Retendo as mutações genéticas dos próprios pacientes com DP, os neurónios produzidos a partir desta "DP num frasco" mantêm a sua suscetibilidade apoptótica natural e requerem menos indução química para resultar na morte de neurónios dopaminérgicos. CEPI específicas ao paciente abrem uma nova janela para avaliar as contribuições genéticas para a patogénese da DP. Não estando agora inacessíveis na profundidade do mesencéfalo, as mudanças celulares de mutação são vistas fisicamente em tempo real.(13)

Os modelos de CEPI também podem permitir a triagem de fármacos mais rápida sem efeitos colaterais em humanos.(13) A tecnologia CEPI fornece um número adequado de células necessárias para completar a pesquisa terapêutica e permite a investigação de vários tipos de células diferentes do mesmo paciente com DP. Por este meio, as CEPI podem ser exploradas para rastrear possíveis novos medicamentos e, simultaneamente, rastrear a toxicidade induzida por medicamentos nas culturas de células. Os medicamentos mais promissores são selecionados para estudos *in vivo* adicionais para prever a viabilidade de futuras terapêuticas.(41)

Deste modo, CEPI foram aplicadas na testagem de terapêuticas experimentais em cooperação com a indústria farmacêutica. A implementação da medicina personalizada com base no perfil genético, levando em consideração as mutações de risco de DP e a variação nas enzimas do metabolismo de drogas, oferece muitos benefícios potenciais para futuros pacientes em DP.(41)

Capítulo 5 - Terapia de células estaminais na doença de Parkinson

Células estaminais providenciaram uma nova forma de encarar a DP. Estas são capazes de se diferenciar em qualquer tipo de célula somática e têm como objetivo gerar células capazes de substituir estes neurónios perdidos, de forma a voltar a estabilizar os valores de dopamina existentes.

Para um transplante eficaz, é necessário descobrir se os neurónios dopaminérgicos derivados de CE podem reinervar com eficiência o estriado e fornecer recuperação funcional em pacientes com DP. Conhecimentos sobre o transplante de tecido do mesencéfalo ventral fetal em animais e humanos forneceu uma série de requisitos para estabelecer uma terapia baseada em CE clinicamente competitiva na DP. Os enxertos de CE devem possuir várias características fulcrais, tais como, exibir uma libertação regulada de DA e propriedades moleculares, eletrofisiológicas e morfológicas semelhantes aos dos neurónios da substância negra; permitir a sobrevivência de mais de 100.000 neurónios dopaminérgicos por putâmen humano; restabelecer a rede dopaminérgica dentro do estriado e restaurar a conectividade funcional com circuitos neurais extra estriatais do hospedeiro; reverter os déficits motores semelhantes a sintomas humanos em modelos animais de DP e induzir alívio sintomático major e de longa duração em pacientes com DP; e não produzir efeitos adversos, como formação de tumor, reações imunes e discinesias induzidas pelos enxertos.(33)

Os principais obstáculos da terapia com células dopaminérgicas do mesencéfalo incluem o controlo de qualidade da identidade, segurança e eficácia do produto celular de forma consistente e em tempo real; determinação de intervalos de tempo precisos em que precursores ou neurónios dopaminérgicos podem ser criopreservados e depositados sem afetar a sua qualidade; boa viabilidade após descongelamento de células; e alterações nulas ou mínimas nas características e funcionalidades da população de células após o descongelamento.(42)

Embora a segurança e a eficácia de diferentes terapias de substituição de células exijam mais investigação em humanos, estas são especuladas a fazer parte da gestão futura do doente com DP.(3)

5.1 Tipos de células estaminais a aplicar

Nas últimas duas décadas, investigadores têm procurado estratégias alternativas para suplementar DA, substituindo os neurónios dopaminérgicos perdidos na doença por CE equivalentes. CEN, CEM, CEE, e CEPI estão entre as tipologias de CE que os cientistas estão a utilizar para induzir a sua diferenciação em células maduras dopaminérgicas. A terapia com CE para o tratamento da DP demonstrou algum sucesso em modelos animais.

Atualmente, existem dois tipos de recursos de enxertos para DP, um dos quais é alogénico e outro é autógeno. Os alogénicos incluem cérebro fetal ou de outro tecido embrionário humano, e neurónios dopaminérgicos derivados de CEE humanas, enquanto enxertos autólogos derivam de células somáticas específicas do paciente via reprogramação por CEPI *in vitro* ou direta conversão da linhagem.(9)

Uma visão convencional é que a terapia celular autóloga é sempre mais cara do que a terapia com células alogénicas. É verdade que uma abordagem alogénica ou compatível com HLA permitiria uma produção de lotes maiores e de controle de qualidade testado de células para uso em vários pacientes, enquanto uma abordagem de transplante de células autólogas requer preparação de lotes de células únicas para cada paciente e testes de controle de qualidade de cada lote, o que aumentará o custo de produção de células. No entanto, ao olhar para o custo total de saúde, esta visão não é necessariamente verdadeira.(43)

Uma perspetiva interessante é que muitos pagadores podem tentar evitar transplantes alogénicos, dado os altos custos atuais da supressão imunológica e dos custos relacionados à rejeição do transplante. Um exemplo desta perspetiva é a terapia por transplante de células estaminais da medula óssea, onde a morbilidade e os custos para transplantes alogénicos falhados é muito maior do que para transplantes autólogos. Para transplante de células estaminais da medula óssea pode-se estimar mais de 100.000 dólares por paciente para terapia celular autóloga de transplante de medula óssea e o seu acompanhamento. No entanto, a estimativa média para transplantes alogénicos pode ser várias vezes maior. A razão é que o transplante alogénico apresenta um significativo risco de morbilidade para os pacientes devido a fatores imunológicos e problemas de supressão imunológica associados. (43)

Se estas considerações também se aplicam ao transplante alogénico vs autólogo de células no SNC, tal tornar-se-á evidente no início dos ensaios clínicos de fase 1 em humanos.

5.2 Estudos com CE em animais

Existem várias fontes de CEN, como CEE humanas, CEPI, CEN derivadas do cérebro fetal humano, entre outras. Duas classes de CEN podem ser distinguidas: CEE (células pluripotentes, que criam células de cada uma das três camadas germinativas embrionárias) e células estaminais adultas (multipotentes, que podem criar tipos de células específicos da linhagem).(44) Ao contrário das CEE e CEPI, as CEN são consideradas menos tumorogênicas, no entanto, o seu uso é dificultado pela baixa taxa de sobrevivência, falta de fonte adequada e obtenção de números suficientes para transplante.

O transplante de neurónios dopaminérgicos começou na década de 1970, quando Björklund e colegas transplantaram pequenas porções de tecido contendo neurónios dopaminérgicos, serotoninérgicos e noradrenérgicos extraídos do cérebro fetal de rato para o córtex cerebral e hipocampo de ratos adultos não lesionados. Essas células mostraram boa sobrevivência após o transplante com crescimento axonal substancial que formou extensos padrões de fibras dentro do próprio enxerto e com tecido cerebral adjacente.(45) Posteriormente, em roedores modelos da DP, Perlow et al. em 1979 transplantaram pedaços de tecido sólido para o ventrículo lateral em contacto com o caudado e putâmen (15), enquanto Björklund et al. em 1980, transplantaram pedaços de tecido para a cavidade cortical dorsal que recobre o caudado e putâmen.(17) Ambos os estudos notaram melhoria no comportamento rotacional induzido por anfetaminas, e a análise *post mortem* revelou sobrevivência e reinervação do estriado lesado.(46)

Outra fonte de CEN pode ser também o uso de CE partenogênicas humanas que são CE pluripotentes derivadas de oócitos não fertilizados quimicamente ativados. Estas células demonstram as características típicas exibidas por CEE, incluindo divisão infinita e diferenciação *in vitro* e *in vivo* em células de todas as três linhagens germinativas, evitando o problema ético de destruir um embrião humano potencialmente viável.(47)

As CEN partenogênicas foram injetadas bilateralmente no estriado e na substância negra de macacos imunossuprimidos. O transplante foi seguro e bem tolerado pelos animais sem discinesia, tumores, formação de tecido ectópico ou outros eventos adversos sérios relacionados. Assim, foi observado que as CEN promoveram a recuperação comportamental, aumento da concentração de DA estriatal, da inervação das fibras, do número de neurónios dopaminérgicos e induziu a expressão de genes e vias prejudicados na DP em comparação com animais do grupo controlo.(47) Estes resultados fornecem mais evidências para a transição clínica de CEN e apoiam a aprovação do primeiro estudo de fase I/IIa (NCT02452723) baseado em células estaminais pluripotentes do mundo para o tratamento da DP. (47)

O uso de CEM tem sido considerado como uma fonte ideal para a produção de neurónios dopaminérgicos, principalmente devido à sua alta aceitação ética, ampla disponibilidade, facilidade de isolamento e capacidade de serem prontamente multiplicadas sem formar teratomas.(30)

Em 2015 foi publicada uma meta-análise por Jenny Riecke et al, com o objetivo de realizar uma revisão sistemática da literatura para identificar estudos que usaram testes comportamentais para avaliar o efeito do tratamento de CEM não modificadas em modelos animais de DP.(48) Vinte e cinco estudos, incluindo três vias de administração, uma ampla gama de doses e vários modelos de DP foram estudados. Foi examinado o comportamento rotacional, que é uma medida de longa data do estado funcional em modelos de roedores hemiparkinsonianos que demonstrou correlacionar-se com os marcadores negroestriatais em ratos lesados com 6-OHDA. Trabalhos mais recentes sugeriram também que, embora o comportamento rotacional seja um bom indicador de depleção de dopamina negroestriatal, testes adicionais da função de membro fornecem mais relevância clínica. Assim, foi observada uma melhoria significativa na diferença média padronizada agrupada, para o comportamento rotacional e a função do membro. (48)

Os resultados deste estudo indicam que as CEM podem ser um candidato promissor para levar adiante nos ensaios clínicos.(48) Não foram encontradas diferenças nos efeitos do tratamento, nomeadamente no comportamento rotacional, independentemente das vias de entrega e tempo de administração. Contudo, é interessante notar que os estudos que utilizaram a administração intravenosa mostraram um maior efeito positivo na função do membro do que a administração intraestriatal. No geral, esses achados sugerem que as CEM podem exercer efeitos semelhantes por meio de entrega intravenosa e que abordagens intracranianas mais invasivas podem não ser necessárias para a entrega de CEM. Também foi observado um maior efeito da terapia com CEM na função do membro em estudos que tratam animais com níveis de dose mais altos. Estudos de longo prazo mostraram efeitos positivos até 1 ano, indicando efeitos sustentados do tratamento a longo prazo.(48)

Estudos demonstraram um efeito terapêutico positivo de CEM sobre os sintomas de modelos de animais de laboratório com parkinsonismo, como redução dos sintomas motores, normalização dos níveis de dopamina e outros neurotransmissores, aumento do número de neurónios em áreas danificadas e um atraso na progressão da doença.(49) Estes resultados encorajadores apresentam um argumento convincente para realizar estudos semelhantes em pacientes com DP. O transplante de CEM da medula óssea e do cordão umbilical em modelos de ratos com DP induzida por 6-OHDA mostraram proteger neurónios dopaminérgicos danificados e diferenciar-se em CE neurais e em neurónios dopaminérgicos adultos, demonstrando a sua eficácia terapêutica para DP.(50,51) Estudos

in vitro de CEM da medula óssea provaram que estas são capazes de se induzir para células neuronais que expressam marcadores de neurónios, como TuJ1, e de neurónios dopaminérgicos, como TH.(27)

Ao contrário de outros ensaios clínicos com enxertos fetais, o tratamento com CEM visa alterar o ambiente celular de áreas cerebrais lesadas ou vulneráveis. Embora alguns estudos sugiram a diferenciação de CEM em direção a um fenótipo neuronal ou fusão com neurónios do hospedeiro, a recuperação funcional que ocorre com o tratamento de CEM em animais é muito mais provável que resulte de fatores biológicos secretados que as CEM produzem. As CEM são conhecidas por modularem fortemente o sistema imunológico e amortecer a resposta inflamatória em vários modelos de lesão cerebral. Em modelos de DP, as CEM reduzem várias citocinas pró-inflamatórias e a ativação microglial, que se acredita contribuir para a degeneração neuronal e progressão da doença. As CEM também demonstraram proteger os neurónios regulando positivamente a expressão de fatores antiapoptóticos. (48)

Posto isto, existem vários estudos que apoiam um potencial de tratamento de CEM numa ampla gama de doses, por múltiplas vias de entrega em modelos animais de DP. Assim, as meta-análises contribuem para a consideração clínica inicial de ensaios de CEM em pacientes com DP.

De outra forma, as CEE são pluripotentes e podem, em teoria, diferenciar-se em qualquer tipo de célula do corpo, incluindo neurónios dopaminérgicos.

Em 2002 foi conduzido um estudo demonstrando que uma população altamente enriquecida de CEN do mesencéfalo pode ser derivada de CEE de ratos. Os neurónios dopaminérgicos gerados por essas células estaminais apresentaram propriedades eletrofisiológicas e comportamentais esperadas dos neurónios do mesencéfalo. Estes resultados encorajaram um estudo contínuo do uso de CEE na terapia de reposição celular para a DP.(52) E assim foi feito, com os próximos estudos, reportando que roedores com células neuroprogenitoras injetadas no mesencéfalo após lesão química mostraram sinais de recuperação. Um desses exemplos é o estudo por Rodríguez-Gómez et al que demonstrou que, num transplante em modelo animal, neurónios derivados de CEE de ratos sobreviveram por mais de 32 semanas, mantiveram marcadores do mesencéfalo e demonstraram benefícios comportamentais.(53)

Noutro estudo, Roy et al., relataram que neurónios dopaminérgicos derivados de CEE quando implantados no nigroestriado de ratos lesados com 6-OHDA, mostraram recuperação das funções motoras. No entanto, enxertos TH+ transplantados exibiram diferenças neuroblásticas no fenótipo associado a propriedades tumorogénicas.(54)

Posto isto, verifica-se a existência de potenciais problemas com esta abordagem, que não se aplicavam muito para os primeiros transplantes de mesencéfalo ventral fetal humano, incluindo um risco de tumorigênese e o desenvolvimento de teratomas que contêm células de todas as três camadas de células que as CEE normalmente podem dar origem.

Os protocolos iniciais usando CEE humanas eram relativamente ineficientes, mas isso tem mudado na última década após um melhor entendimento de como esses neurónios normalmente surgem no cérebro humano em desenvolvimento. Sendo assim, agora existem vários protocolos bem validados que recapitulam esta via.(55) Contudo, as abordagens mais recentes evoluíram para um ponto onde os protocolos garantem que não haja proliferação celular descontrolada e formação de tumor após enxerto. (55)

Noutro exemplo, um estudo comparou a função de neurónios dopaminérgicos do mesencéfalo derivados de CEE partenogénicas em dois protocolos canónicos num modelo primata da DP. Desta forma, descobriram que os enxertos não formaram tumores e produziram melhoria comportamental variável, mas aparente, por pelo menos 24 meses na maioria dos macacos em ambos os grupos. Além disso, um ligeiro aumento de DA no estriado correlacionou-se com uma melhoria funcional significativa. Esses resultados demonstraram que CEE podem servir como uma fonte confiável de células para o tratamento da DP.(56) Estas descobertas de prova de conceito fornecem dados pré-clínicos para o primeiro estudo clínico da China de CEE na DP de fase I / IIa (NCT03119636).

A terapia de substituição celular baseada em CEPI ganhou popularidade desde a sua descoberta por Shinya Yamanaka (37) visto que, as CEPI têm um potencial de diferenciação semelhante às CEE, com menos preocupações éticas.

Num estudo em 2011, CEPI foram geradas e diferenciadas em neurónios dopaminérgicos e transplantados em ratos com lesões estriatais, tendo sido observadas melhorias motoras significativas.(57) No entanto, também foi acompanhado pela formação de tumores. Embora massas tumorigénicas tenham sido reportadas quando um grande número de células foi transplantado, tal foi provavelmente causado pelas restantes células indiferenciadas. Assim, é de ressaltar a importância de estabelecer métodos clinicamente seguros para remoção completa de células indiferenciadas. (57)

Noutra investigação semelhante, a terapia celular usando CEPI não resultou numa resposta imune do hospedeiro nem na formação de tumor. Além disso, biópsias cerebrais nos ratos estudados revelaram mais células TH positivas e menos neurónios positivos para serotonina quando as CEPI progenitores foram separadas e classificadas antes da injeção.(58) Aqui, foi demonstrado que as células progenitoras dopaminérgicas derivadas de

CEPI humanas podem ser isoladas eficientemente por classificação de células usando um marcador da placa de piso neural, CORIN. O transplante das células CORIN+ e das não classificadas melhorou o comportamento dos ratos lesionados com 6-OHDA. No entanto, estes enxertos continham mais células TH+ do que aqueles derivados de células não classificadas. Além disso, estes enxertos apresentavam apenas um pequeno número de células KI67+ (um marcador de células em proliferação) em comparação com as células não classificadas.(58)

A ponte lógica entre ensaios com ratos e ensaios clínicos humanos está na pesquisa em primatas não humanos. Apoiando os achados em roedores, este conceito foi demonstrado em primatas. O transplante de neurónios dopaminérgicos derivados de CEPI autólogas em cérebros de macaco-cinomolgo com lesão por MPTP, de forma a assemelhar DP, revelaram uma melhoria acentuada da disfunção motora, sem imunossupressão.(59) Em relação aos ensaios clínicos, células dopaminérgicas derivadas de CEPI de origem humana devem ser testadas num modelo pré-clínico de primata não humano com observações de segurança e eficácia mais longas pós-transplante. As células dopaminérgicas progenitoras derivadas de células pluripotentes humanas demonstraram sobreviver, amadurecer e funcionar com bons resultados como neurónios dopaminérgicos do mesencéfalo num modelo primata de DP induzida por MPTP, sem formação de tumores no cérebro por pelo menos dois anos.(60)

Com estes resultados pré-clínicos encorajadores, os ensaios clínicos usando produtos celulares derivados de CEPI para o tratamento da DP foram iniciados, mas têm uma gestão de risco necessariamente superior do que outros ensaios clínicos usando, por exemplo CEM.(3)

5.3 Ensaios clínicos com CE em humanos

O potencial terapêutico de células estaminais foi comprovado pré-clinicamente no supracitado. Sendo assim, o próximo passo lógico, nesta linha de investigação, será a transição para ensaios clínicos em humanos.

A capacidade do tecido enxertado de MVF de fornecer recuperação funcional foi demonstrada em vários estudos, todos os quais deram confiança de que essa abordagem poderia funcionar como uma terapia dopaminérgica em pacientes com DP. Assim, os primeiros programas clínicos usando esta abordagem, lançados em meados da década de 1980, foram construídos numa base robusta e reprodutível de dados pré-clínicos.

Na década de 1980, dois pacientes receberam enxertos intraestriatais de tecido de MVF humano, rico em neuroblastos dopaminérgicos, como tratamento restaurador para a DP. Para avaliar a eficácia a longo prazo dos enxertos, avaliações clínicas foram realizadas 15 e 18 anos após o transplante. Estas demonstraram benefícios sustentados, com *scores* motores ainda mais baixos do que os basais pré-operatórios. Apesar de cada paciente ter quase 30 anos de DP com flutuações problemáticas e discinesias antes do transplante, ambos os pacientes apresentam agora sintomas muito leves e foram independentes de qualquer tratamento farmacológico dopaminérgico. Os resultados desses dois casos indicam que o transplante de células dopaminérgicas pode oferecer alívio sintomático a longo prazo em pacientes com DP e fornecer suporte de prova de conceito para futuros ensaios clínicos usando terapia de células estaminais ou fetais.(61)

Há, no entanto, uma série de pontos a referir em relação a estas observações. Estes pacientes representam dois de um total de dezoito pacientes. Além dos dois indivíduos descritos no supracitado (paciente 7 e paciente 15), pelo menos outros dois desta coorte tiveram um resultado igualmente favorável dez ou mais anos após o transplante, é o caso do paciente 4 (62), e do paciente 13(63). O restante da coorte faleceu, por razões não descritas no estudo, ou foi perdido no seguimento a longo prazo.(61)

As discinesias induzidas por enxerto ocorreram em ambos os pacientes, mas não tiveram um impacto funcional significativo e a sua ocorrência foi superada pelos efeitos benéficos na função motora adquiridos ao longo dos anos. No entanto, estas discinesias representam um evento adverso grave que pode ser debilitante, mas que parece ser ajudado pela estimulação cerebral profunda do segmento interno do globo pálido. Porém, nenhum paciente foi suficientemente perturbado pelas discinesias para considerar a estimulação cerebral profunda como um tratamento.(61) Sem dúvida, entender e encontrar maneiras de evitar discinesias será de grande importância para futuros estudos. Neste relatório, é de notar que apenas 2 indivíduos estão incluídos e que estes representam 2 casos

particularmente bem-sucedidos e, portanto, quaisquer conclusões devem ser tiradas com cautela.

Por conseguinte, os primeiros ensaios clínicos em pacientes com DP usando células do MVF humano sugerem que a estratégia de substituição celular tem potencial terapêutico. As informações obtidas a partir dessas investigações forneceram prova de conceito de que o transplante de neuroblastos dopaminérgicos são seguros.(64)

Para melhor compreender e resolver os problemas da variabilidade e efeitos adversos com transplantes de MVF na DP, foi iniciado um estudo multicêntrico financiado pela UE chamado TRANSEURO (NCT01898390). Este estudo procura realizar um novo e aprimorado projeto de ensaios clínicos que abrirá caminho para protocolos de transplante de células mais padronizados e reprodutíveis para DP que podem ser usados para a próxima geração de terapias baseadas em CE que estão atualmente em desenvolvimento. Este estudo procurou otimizar a seleção de pacientes, preparação e implantação de tecidos e suporte pós-enxerto, bem como o desenho do estudo. (65)

No que diz respeito aos pacientes, o ideal para qualquer abordagem reparadora celular, é selecionar aqueles mais jovens com doença menos avançada e que estão livres de grandes discinesias induzidas por levodopa. Assim, para o TRANSEURO foram selecionados pacientes com menos de 65 anos com duração de doença menor que 10 anos e sem discinesias significativas. É necessário, também, estarem livres de quaisquer problemas cognitivos ou psiquiátricos importantes. Foram também incluídos apenas pacientes com perda de dopamina restrita ao estriado dorsal.(65) Na preparação do tecido, este precisa de ser enxertado de uma maneira que garanta a proporção ideal de DA para serotonina com suficientes células dopaminérgicas enxertadas para obter um benefício clínico. Tal é estimado em cerca de 100.000 células dopaminérgicas sobreviventes por hemisfério, traduzindo-se na necessidade de tecido de MVF de pelo menos três a quatro fetos. O tecido é armazenado pelo número mínimo de dias necessário, de modo a permitir que seja logisticamente viável, sem comprometer a viabilidade das células.(65) Para a implantação do tecido, é usado uma versão ligeiramente modificada do instrumento Rehncrona original, que demonstrou proporcionar boa sobrevivência celular, distribuição de neurónios dopaminérgicos e inervação da estrutura alvo.(65)

Com o objetivo de contornar os problemas de cirurgia simulada e efeitos placebo, incluindo viés do investigador, foi adotado um planeamento de estudo em que um grande número de pacientes é acompanhado num estudo observacional independente com avaliações a cada 6 meses. Os pacientes são gravados em vídeo em todas as suas avaliações, para que um terceiro possa avaliar o seu exame motor, com o paciente usando um boné em

todos os casos, de forma que o avaliador seja cego para a sua intervenção terapêutica. Da coorte inicialmente inscrita de 137 pacientes, 40 foram selecionados para imagem de PET, dos quais, cerca de metade foram randomizados para enxerto.(65)

Os pacientes transplantados e os seus controlos sem transplante, da mesma idade e gravidade de doença, serão comparados com uma população semelhante de pacientes na coorte observacional que não foram randomizados para o braço ativo do estudo e em vez disso, serão seguidos como uma coorte de história natural. Atualmente, este ensaio enxertou 11 pacientes jovens em fase inicial de DP em Cambridge, Reino Unido e Lund, Suécia desde 2019. Não há mais cirurgias planeadas. A avaliação desses pacientes continuará semestralmente ao lado de um grupo de controlo que não recebeu nenhuma intervenção. O paciente final completará o desfecho clínico do estudo (36 meses pós-enxerto) em 2021, sendo esta data, a conclusão estimada do estudo, no entanto, não foram publicados os resultados até à data.(21)

Um grande obstáculo remanescente para a aplicação clínica desta substituição com células transplantadas é o uso de tecido fetal como fonte de células, especialmente porque são precisas células de 4 fetos para um único paciente.(24) Apesar da importância deste estudo em estabelecer a utilidade da terapia celular para a DP, a fonte de células fetais ainda está associada a questões éticas e problemas sociais. No estudo TRANSEURO, muitos procedimentos cirúrgicos foram cancelados devido à falta de quantidades suficientes ou adequadas de tecido fetal, resultando em atrasos substanciais, complicações logísticas e experiências negativas para os pacientes.(66)

Apesar dos atrasos do estudo TRANSEURO levarem a um adiamento da publicação dos resultados, é possível, nesta altura, tirar algumas conclusões e lições que poderão ajudar investigadores e facilitar o planeamento de futuros ensaios clínicos. Assim, parece haver necessidade de continuação do tratamento imunossupressor por 12 meses após o enxerto. O regime ideal ainda não é claro, e também não pode ser assumido que a composição do enxerto e a apresentação de antigénios são os mesmos em enxertos derivados de células estaminais e fetais. Alguma forma de terapia combinada, como é usada em programas de transplante de órgãos sólidos seria preferível, embora formas aprimoradas de medir a rejeição do enxerto ainda são urgentemente necessárias. (21)

Por conseguinte, outra lição providenciada por este ensaio é o facto de que, estudos usando novas terapêuticas dopaminérgicas baseadas em células estaminais necessitarão de considerar cuidadosamente o método de entrega. Não se referindo tanto aos locais ou ao volume de destino, mas ao instrumento usado para a entrega. Devem ser fornecidas evidências de que tal instrumento é compatível, não apenas com a prática da maioria dos

centros neurocirúrgicos, mas também com a sobrevivência das células implantadas e a sua capacidade de reinervar o estriado. Os próximos ensaios com células dopaminérgicas derivadas de células estaminais terão que abordar a tolerabilidade e a viabilidade, com ênfase na segurança e não na eficácia. Porém, este estudo recomenda o acompanhamento a longo prazo de todos os pacientes recrutados para ensaios de terapia celular, idealmente indefinidamente, e que esses pacientes façam declarações de intenção de doação de cérebro *post mortem* para que os benefícios a longo prazo e os efeitos histológicos destas intervenções irreversíveis possam ser descritos. (21)

Assim, embora o ensaio TRANSEURO seja altamente informativo na compreensão da resposta de diferentes tipos de pacientes com DP ao transplante e na otimização do procedimento do mesmo, a fonte de tecido fetal não representa uma opção terapêutica realista para o grande número de pacientes com DP. Para progredir para aplicações clínicas em larga escala, são necessárias células prontamente disponíveis, renováveis e financiáveis de forma a tornar esta abordagem para a DP uma estratégia terapêutica viável.(65)

Atualmente, apenas dados preliminares estão disponíveis sobre o uso de CEM na DP humana. Num estudo em 2010, investigadores administraram 10 milhões de CEM autólogas da medula óssea por quilograma de peso corporal unilateralmente na zona ventricular sublateral por meio de cirurgia estereotáxica em sete pacientes com DP. Os pacientes foram seguidos num período de 10 a 36 meses. Três dos 7 pacientes mostraram uma melhoria constante na Escala Unificada de Avaliação da Doença de Parkinson (UPDRS). O procedimento foi bem tolerado. A pontuação de base "off" foi de 65, e a pontuação base "on" foi 50.6. Após os transplantes, a pontuação média "off" no último acompanhamento foi de 43,3 com uma melhoria de 22,9%, e a pontuação "on" no último acompanhamento foi de 31,7, com uma melhoria de 38%.(67) Este estudo estabelece a segurança imediata e a curto prazo de CEM autólogas da medula óssea na terapia de transplante unilateral na DP(67), e conseqüentemente, estudos posteriores demonstraram uma diminuição na gravidade dos sintomas motores e não motores da doença no período pós-transplante.(49)

Noutro estudo, CEM foram transplantadas em 12 pacientes com DP, tendo a eficácia da terapia sido avaliada 1 e 3 meses após o transplante.(49) A intensidade dos sintomas motores e não motores foi avaliada com ajuda de *scores* internacionais. Neste estudo, a avaliação inicial da UPDRS para o período "off" era de 36.5 antes do tratamento e apenas um mês depois, melhorou para 33.5, sendo uma diferença totalizada em 9%. Conseqüentemente, foi relatada uma diminuição estatisticamente significativa na gravidade dos sintomas motores e não motores no grupo de estudo no período pós-transplante. Estes resultados positivos permitem considerar o transplante de CEM como uma estratégia

terapêutica modificadora na DP. No entanto, este método de tratamento da DP não é um processo totalmente compreendido, o que requer estudos e um período de acompanhamento mais longo para monitorizar a condição dos pacientes pós-transplante.(49)

Descobertas sobre a eficácia de CEE em modelos animais fornecem dados pré-clínicos para o primeiro estudo clínico da China de CEE na DP de fase I / IIa (NCT03119636). O estudo envolverá 50 pacientes para injeção celular, administrando uma única dose de células precursoras neurais por injeção estereotáxica intraestriatal. Atualmente, na plataforma clinicaltrials.gov, o estado deste estudo encontra-se como “desconhecido”, designação atribuída quando um estudo ultrapassa a data de conclusão, sendo esta estimada em dezembro de 2020, e em que o estado não foi alterado nos últimos dois anos. Assim, até à data, os resultados não foram ainda publicados.

De forma a melhorar a segurança e qualidade dos ensaios clínicos emergentes foi desenvolvido um consórcio global que reúne as principais equipas que trabalham no desenvolvimento de células estaminais para terapia de transplante para DP chamado GForce-PD. Este grupo envolve equipas multidisciplinares da Europa, Estados Unidos e Japão, e juntos trabalham para desenvolver melhores células, melhores ensaios e, finalmente, a melhor terapia disponível para indivíduos com PD.(65) O EUROPEAN STEM-PD, a ser preparado na Suécia e Reino Unido, e NYSTEM-PD, com decisão pendente pela FDA nos EUA com 10 participantes, são ensaios clínicos planeados por membros do GForce-PD usando CEE humanas. Para chegar a estes ensaios clínicos foram necessários programas anteriores como o NeuroStemCell que desenvolveu protocolos para derivar células dopaminérgicas mesencefálicas funcionais e transplantáveis de CEE humanas, e o NeuroStemCellRepair que desenvolveu boas práticas de produção em conformidade com protocolos e ensaios de controlo de qualidade para produção de células dopaminérgicas funcionais a partir de CEE humanas.(65,68) Os resultados destes estudos são altamente antecipados porque o sucesso destes ditarão enormes possibilidades para o uso de terapia celular.

Uma decisão inicial que deverá ser feita é determinar a fonte de células pluripotentes a ser usada: CEE ou CEPI. Enquanto as linhagens de CEE são consideradas o *gold standard* para células pluripotentes, as CEPI podem contornar muitos dos problemas éticos e políticos principais associados às CEE e podem até permitir terapias específicas para pacientes com necessidade mínima de imunossupressão. Por outro lado, as CEPI trazem consigo um risco aumentado de anomalias genéticas e epigenéticas, sendo que as consequências a longo prazo de tais anomalias ainda não são conhecidas.(65)

Uma vez que há evidências clínicas de que transplantes neurais alogénicos podem sobreviver no cérebro de pacientes com DP por mais de 20 anos, com apenas curtos períodos de cerca de 6 a 18 meses, de imunossupressão pós-enxerto(69), para o estudo STEM-PD, tal como para o NYSTEM-PD, os autores optaram por usar CEE em vez de CEPI como fonte de células clínicas de forma a evitar os riscos desconhecidos e o aumento dos custos associados às CEPI.(65)

O STEM-PD é o primeiro ensaio clínico em humanos para a DP na Europa. Assim, no planeamento de um primeiro ensaio em humanos, a tolerabilidade e a viabilidade de enxertar o produto celular são os objetivos primários e não a eficácia, que é mais o domínio dos estudos de fase II/III. Assim, o estudo de fase I proposto iniciar-se-á com apenas 6 pacientes (3 transplantados e 3 controlos). A seleção dos pacientes teve em conta o modelo TRANSEURO. Prevê-se que os três primeiros pacientes sejam enxertados com a menor dose de células que se acredita ser eficaz, ou seja, 1 a 2 milhões de células enxertadas para atingir um total de 50 a 100.000 neurónios TH+ maduros nos enxertos, como comprovado em estudos anteriores.(69) Se nenhum efeito adverso for observado em 12 meses então será tomada uma decisão sobre permanecer com essa dose de células ou aumentá-la para a próxima coorte de três pacientes. Os pacientes terão avaliações clínicas conforme o modelo TRANSEURO, aos 6 e 12 meses, com ressonância magnética aos 3, 6 e 12 meses e PET aos 12 meses, sendo posteriormente avaliados a cada 6 meses por pelo menos 3 anos pós-transplante para que uma comparação possa ser feita com os pacientes do TRANSEURO, transplantados com MVF.(65)

Outro estudo pertinente será o NYSTEM-PD, caracterizado por um grupo de várias equipas que iniciam um dos primeiros ensaios clínicos em humanos baseados no uso de neurónios dopaminérgicos derivados de CEE. Pelo menos 10 pacientes serão estudados inicialmente, divididos em duas doses de células, para demonstrar a segurança do procedimento numa dose de células maior ou menor. (70)

De forma a transferir o produto de estudos clínicos em fase inicial para um estudo definitivo de fase III, que poderia permitir a aprovação no mercado, serão necessárias várias etapas adicionais, incluindo expandir o processo de fabrico, otimizar ainda mais a conformidade com boas práticas de produção e a transferibilidade do processo de fabrico para uma instalação em larga escala, adequada para a produção numa escala comercial. Deste modo, é provável que alguns desses próximos passos incluam a interação com parceiros comerciais para agilizar o esforço e assegurar apoio financeiro suficiente.(70) Um dos principais objetivos deste estudo foi o desenvolvimento de um produto “pronto para uso” que esteja disponível sempre que necessário por um paciente, em vez da necessidade de produzir novas células para cada paciente individualmente. Assim, foi proposto o uso de

um produto criopreservado, que não facilitará apenas uma abordagem terapêutica “pronta para uso”, mas também aumentará a segurança. O estabelecimento de grandes lotes de células criopreservadas permite realizar estudos de segurança e eficácia na mesma população de células utilizadas para o estudo clínico, tal como reduzir os custos de produção de uma dose de células por paciente, pois será possível gerar milhares de doses de uma só vez.(70)

O desfecho primário para todos estes estudos será a tolerabilidade e a viabilidade, visto que não serão suficientes para mostrar segurança ou eficácia. Além disso, como acontece com qualquer terapia celular, quaisquer sinais de eficácia clínica podem levar 3 a 5 anos para serem evidenciados com base no que é observado com transplantes de MVF. Assim, a maioria dos grupos esperará pelo menos 2 anos após o transplante para publicar os resultados para que melhores medidas de tolerabilidade possam ser relatadas.(71)

As CEPI fornecem várias vantagens sobre as CEE como uma fonte de células para substituição na DP, incluindo a capacidade de usar células do próprio paciente (autólogas) ou células HLA-compatíveis e, assim, reduzir ou eliminar a necessidade de qualquer imunossupressão, assim como eliminar os problemas éticos. Recentemente, células dopaminérgicas progenitoras derivadas de CEPI autólogas foram injetadas bilateralmente num homem de 69 anos, com uma história de 10 anos de DP idiopática progressiva e relatando mau controlo dos sintomas pelo regime de fármacos dopaminérgicos. Foram demonstrados sinais de melhorias na avaliação motora 24 meses após a cirurgia e nenhum evento adverso relacionado à intervenção foi relatado. Houve uma diminuição modesta (6%) em equivalentes de levodopa em comparação com doses utilizadas antes das implantações. Os exames de imagem são encorajadores, pois não mostraram quaisquer sinais de formação de tumores ou supercrescimento de transplante, que é a principal preocupação associada ao uso de preparações de células estaminais pluripotentes.(72) Este é o primeiro relatório de terapia baseada em células estaminais num paciente com DP e como tal apresenta um marco importante neste campo.

Embora os estudos de casos individuais não tenham o rigor científico dos ensaios clínicos, estes podem ser úteis em alguns aspetos, no entanto não devem ser superestimados. Por exemplo, neste caso, nenhum comentário pode ser feito sobre a eficácia, porque parecia haver um efeito placebo devido ao relato do paciente de grandes melhorias numa escala subjetiva de qualidade de vida, embora não houvesse alterações significativas na imagem cerebral da dopamina ou em escalas clínicas mais objetivas. Em última análise, a eficácia só poderá ser comprovada em ensaios duplo-cegos controlados por placebo.(55)

Em agosto de 2018, um ensaio clínico, atualmente em fase I / IIa, de transplante de células para DP liderado por Jun Takahashi e colegas no Centro de pesquisa e aplicação de CEPI da Universidade de Kyoto, Japão (CiRA) começaram a recrutar os seus primeiros pacientes. Neste ensaio, sete pacientes foram selecionados para transplante cirúrgico de 4,8 milhões de células dopaminérgicas progenitoras derivadas de CEPI alogénicas de um doador HLA-homozigoto para o putâmen bilateralmente, via cirurgia estereotáxica do cérebro. Os pacientes foram tratados com o medicamento imunossupressor, tacrolimus, para evitar a rejeição do transplante, visto ser um transplante alogénico. Até agora, nenhum evento adverso severo foi relatado, no entanto os resultados finais não foram ainda publicados. (41,73)

Os principais objetivos deste ensaio são a investigação dos efeitos adversos deste tratamento (por exemplo, discinesia, formação de tumor), tolerabilidade, viabilidade e segurança sem eventos adversos. Se os ensaios forem bem-sucedidos, os ensaios de eficácia terão início.(41) Como parte do processo de fabrico de células para garantir a homogeneidade destas, o ensaio CiRA implementa classificação CORIN para purificar as células progenitoras que, eventualmente, darão origem a neurónios dopaminérgicos. A estratégia de classificação CORIN é uma etapa fundamental no protocolo de derivação e não serve apenas para eliminar tumorigénese, mas também para remover neurónios serotoninérgicos e precursores que são conhecidos por causar discinesias quando transplantados em pacientes.(24,58) Os pacientes serão seguidos por pelo menos dois anos após o transplante para avaliar de forma abrangente resultados qualitativos e quantitativos, incluindo motores, não motores, avaliações cognitivas, psiquiátricas e de qualidade de vida. (73)

Os resultados do ensaio CiRA serão de extrema importância porque representam o primeiro ensaio em humanos a usar células neurais derivadas de CEPI. A cura da DP com terapia celular permanece duvidosa, e os próximos resultados devem ser examinados em contexto com outros tratamentos. Muitas perguntas sobre o futuro da terapia celular para a DP permanecem, contudo, o futuro do tratamento da neurodegeneração parece otimista.

Potencial terapêutico de células estaminais na doença de Parkinson

Tabela 1: Ensaios clínicos a usar células estaminais como terapia na DP

Tipo de células	Título do estudo	Agente/ Localização	Fase	Identificador clinical trial	Ano de início	Estado
Células estaminais neurais humanas	A Study to Evaluate the Safety of Neural Stem Cells in Patients With Parkinson's Disease	Cyto Therapeutics Pty Limited (Australia)	Fase 1	NCT 02452723	2015	Desconhecido
	Transplantation of Neural Stem Cell-Derived Neurons for Parkinson's Disease	Neurogenerati on	Fase 1/2	NCT 03309514	2017	Ainda não está a recrutar
Células estaminais embrionárias	Safety and Efficacy Study of Human ESC-derived Neural Precursor Cells in the Treatment of Parkinson's Disease	Chinese Academy of Sciences (China)	Fase 1/2	NCT 03119636	2017	Desconhecido
Células estaminais mesenquimais	Umbilical Cord Derived Mesenchymal Stem Cells Therapy in Parkinson's Disease	Guangzhou General Hospital of Guangzhou Military Command (China)	Fase 1	NCT 03550183	2018	Inscrições por convite
	Phase IIa Randomized Placebo Controlled Trial: Mesenchymal Stem Cells as a Disease-modifying Therapy for iPD	The University of Texas Health Science Center (USA)	Fase 2	NCT 04506073	2020	Ativo, não recrutando
Células estaminais pluripotentes induzidas	A Study on the Treatment of Parkinson's Disease With Autologous Neural Stem Cells	Allife Medical Science and Technology Co. Ltd. (China)	Fase 1 inicial	NCT 03815071	2019	Desconhecido
	Kyoto Trial to Evaluate the Safety and Efficacy of iPSC-derived dopaminergic progenitors in the treatment of Parkinson's Disease	Kyoto University Hospital (Japão)	Fase 1/2	JMA-IIA00384	2018	Suspenso

Capítulo 6 - Conclusão

Nas últimas décadas, estudos pré-clínicos demonstraram o vasto potencial terapêutico de células estaminais na DP.

Esta revisão monográfica centrou-se nas vantagens e potenciais da terapia com células estaminais. No entanto, existem várias dúvidas e obstáculos. Atualmente, os principais desafios que limitam os usos clínicos de CE envolvem questões éticas, tumorigênese, resposta imune e, até certo ponto, toxicidade, bem como, um dos mais relevantes, os custos financeiros.

Atualmente, CEE e CEPI parecem as mais simples de manipular, para um destino dopaminérgico, produzindo um grande número de neurónios *in vitro*, mas CEN e CEM também podem ser úteis para aplicação clínica.

Por enquanto, as CEPI estabeleceram-se como uma das opções mais promissoras, visto que são capazes de evitar os problemas das questões éticas, utilizando fontes de vias autólogas, evitando também a tumorigênese e as discinesias associadas aos transplantes, através da estratégia de classificação CORIN, que é capaz de remover neurónios serotoninérgicos e precursores causadores destas adversidades. Não obstante, tantos benefícios são também acompanhados de custos financeiros elevados. Um grande investimento comercial será importante para um maior desenvolvimento, dado as terapias celulares serem bastante dispendiosas, especialmente quando comparadas às abordagens farmacológicas atuais, usando terapia dopaminérgica oral.

É de esperar que os resultados dos próximos ensaios clínicos guiem os próximos passos no desenvolvimento de transplantes de neurónios dopaminérgicos baseados em CE para DP, porém a direção de futuros esforços de pesquisa, não deve ser determinada pelo sucesso ou fracasso de um único estudo. A terapia com CE está atualmente numa fase inicial, e grandes esforços são necessários para a progressão. O processo de transplantação e os procedimentos necessários não estão ainda otimizados e mais pesquisas serão imprescindíveis para revolucionar o tratamento de uma doença tão complexa como a DP. Contudo, para que tal seja possível, é necessário demonstrar um efeito terapêutico competitivo a um preço acessível.

Em suma, apesar de ainda não estarmos perante um tratamento modificador da doença, o transplante de CE tem potencial para estar na vanguarda não só do tratamento da DP, como da medicina regenerativa de inúmeras doenças humanas no futuro.

Referências Bibliográficas

1. de Lau LM, Breteler MM. Epidemiology of Parkinson's disease. *Lancet Neurol* [Internet]. 2006 Jun;5(6):525–35. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1016319010600444>
2. Sonntag K-C, Song B, Lee N, Jung JH, Cha Y, Leblanc P, et al. Pluripotent stem cell-based therapy for Parkinson's disease: Current status and future prospects. *Prog Neurobiol* [Internet]. 2018 Sep;168:1–20. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0301008217301041>
3. Liu Z, Cheung H-H. Stem Cell-Based Therapies for Parkinson Disease. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2020 Oct 29;21(21):8060. Available from: <https://www.mdpi.com/1422-0067/21/21/8060>
4. Tysnes O-B, Storstein A. Epidemiology of Parkinson's disease. *J Neural Transm* [Internet]. 2017 Aug 1;124(8):901–5. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00702-017-1686-y>
5. Poewe W, Seppi K, Tanner CM, Halliday GM, Brundin P, Volkmann J, et al. Parkinson disease. *Nat Rev Dis Prim* [Internet]. 2017 Dec 21;3(1):17013. Available from: <http://www.nature.com/articles/nrdp201713>
6. Cabreira V, Massano J. Doença de Parkinson: Revisão Clínica e Atualização. *Acta Med Port* [Internet]. 2019 Oct 1;32(10):661. Available from: <https://actamedicaportuguesa.com/revista/index.php/amp/article/view/11978>
7. Cerri S, Mus L, Blandini F. Parkinson's Disease in Women and Men: What's the Difference? *J Parkinsons Dis* [Internet]. 2019 Jul 30;9(3):501–15. Available from: <https://www.medra.org/servlet/aliasResolver?alias=iospress&doi=10.3233/JPD-191683>
8. Kasper DL, Hauser SL, Jameson JL, Fauci AS, Longo DL LJ. *Harrison's Principles of Internal Medicine*. 20th ed. Mc Graw Hill Education; 2018. Chapter 427; pp. 3120–3132.
9. Zhang Q, Chen W, Tan S, Lin T. Stem Cells for Modeling and Therapy of Parkinson's Disease. *Hum Gene Ther* [Internet]. 2017 Jan;28(1):85–98. Available from: <http://www.liebertpub.com/doi/10.1089/hum.2016.116>

10. Postuma RB, Berg D, Stern M, Poewe W, Olanow CW, Oertel W, et al. MDS clinical diagnostic criteria for Parkinson's disease. *Mov Disord* [Internet]. 2015 Oct;30(12):1591–601. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/mds.26424>
11. Haddad F, Sawalha M, Khawaja Y, Najjar A, Karaman R. Dopamine and Levodopa Prodrugs for the Treatment of Parkinson's Disease. *Molecules* [Internet]. 2017 Dec 25;23(1):40. Available from: <https://www.mdpi.com/1420-3049/23/1/40>
12. Alessandrini M, Preynat-Seauve O, De Briun K, Pepper MS. Stem cell therapy for neurological disorders. *South African Med J* [Internet]. 2019 Sep 10;109(8b):70. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00441-004-0946-y>
13. Stoddard-Bennett T, Reijo Pera R. Treatment of Parkinson's Disease through Personalized Medicine and Induced Pluripotent Stem Cells. *Cells* [Internet]. 2019 Jan 7;8(1):26. Available from: <https://www.mdpi.com/2073-4409/8/1/26>
14. Zhao X, Moore DL. Neural stem cells: developmental mechanisms and disease modeling. *Cell Tissue Res* [Internet]. 2018 Jan 2;371(1):1–6. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00441-017-2738-1>
15. Perlow MJ, Freed WJ, Hoffer BJ, Seiger A, Olson L, Wyatt RJ. Brain Grafts Reduce Motor Abnormalities Produced by Destruction of Nigrostriatal Dopamine System. *Science* (80-) [Internet]. 1979 May 11;204(4393):643–7. Available from: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.571147>
16. Boronat-García A, Guerra-Crespo M, Drucker-Colín R. Historical perspective of cell transplantation in Parkinson's disease. *World J Transplant* [Internet]. 2017;7(3):179. Available from: <http://www.wjgnet.com/2220-3230/full/v7/i3/179.htm>
17. Björklund A, Schmidt R, Stenevi U. Functional reinnervation of the neostriatum in the adult rat by use of intraparenchymal grafting of dissociated cell suspensions from the substantia nigra. *Cell Tissue Res* [Internet]. 1980 Nov;212(1):39–45. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/BF00234031>
18. Bolam JP, Freund TF, Björklund A, Dunnett SB, Smith AD. Synaptic input and local output of dopaminergic neurons in grafts that functionally reinnervate the host neostriatum. *Exp Brain Res* [Internet]. 1987 Sep;68(1):131–46. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/BF00255240>

19. Strecker RE, Sharp T, Brundin P, Zetterström T, Ungerstedt U, Björklund A. Autoregulation of dopamine release and metabolism by intrastriatal nigral grafts as revealed by intracerebral dialysis. *Neuroscience* [Internet]. 1987 Jul;22(1):169–78. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0306452287902077>
20. Freed CR, Greene PE, Breeze RE, Tsai WY, DuMouchel W, Kao R, Dillon S, Winfield H, Culver S, Trojanowski JQ et al. Transplantation of embryonic dopamine neurons for severe Parkinson's disease. *N Engl J Med*. 2001;344(10):710–9.
21. Barker RA. Designing stem-cell-based dopamine cell replacement trials for Parkinson's disease. *Nat Med* [Internet]. 2019 Jul 1;25(7):1045–53. Available from: <http://www.nature.com/articles/s41591-019-0507-2>
22. Hallett PJ, Cooper O, Sadi D, Robertson H, Mendez I, Isacson O. Long-Term Health of Dopaminergic Neuron Transplants in Parkinson's Disease Patients. *Cell Rep* [Internet]. 2014 Jun;7(6):1755–61. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2211124714004197>
23. Kordower JH, Dodiya HB, Kordower AM, Terpstra B, Paumier K, Madhavan L, et al. Transfer of host-derived alpha synuclein to grafted dopaminergic neurons in rat. *Neurobiol Dis* [Internet]. 2011 Sep;43(3):552–7. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0969996111001550>
24. Fan Y, Winanto, Ng S-Y. Replacing what's lost: a new era of stem cell therapy for Parkinson's disease. *Transl Neurodegener* [Internet]. 2020 Dec 7;9(1):1–10. Available from: <https://translationalneurodegeneration.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40035-019-0180-x>
25. Fricker RA, Carpenter MK, Winkler C, Greco C, Gates MA, Björklund A. Site-Specific Migration and Neuronal Differentiation of Human Neural Progenitor Cells after Transplantation in the Adult Rat Brain. *J Neurosci* [Internet]. 1999 Jul 15;19(14):5990–6005. Available from: <https://www.jneurosci.org/lookup/doi/10.1523/JNEUROSCI.19-14-05990.1999>
26. Gonzalez R, Garitaonandia I, Abramihina T, Wambua GK, Ostrowska A, Brock M, et al. Deriving dopaminergic neurons for clinical use. A practical approach. *Sci Rep* [Internet]. 2013 Dec 15;3(1):1–5. Available from: <http://www.nature.com/articles/srep01463>
27. Han F, Hu B. Stem Cell Therapy for Parkinson's Disease. In 2020. p. 21–38. Available from: http://link.springer.com/10.1007/978-981-15-4370-8_3

28. Roybon L, Christophersen NS, Brundin P, Li J-Y. Stem cell therapy for Parkinson's disease: where do we stand? *Cell Tissue Res* [Internet]. 2004 Oct 11;318(1):261–73. Available from: <http://www.samj.org.za/index.php/samj/article/view/12715>
29. Azizi SA, Stokes D, Augelli BJ, DiGirolamo C, Prockop DJ. Engraftment and migration of human bone marrow stromal cells implanted in the brains of albino rats—similarities to astrocyte grafts. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 1998 Mar 31;95(7):3908–13. Available from: <https://pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.95.7.3908>
30. Venkatesh K, Sen D. Mesenchymal Stem Cells as a Source of Dopaminergic Neurons: A Potential Cell Based Therapy for Parkinson's Disease. *Curr Stem Cell Res Ther* [Internet]. 2017 Apr 11;12(4):326–47. Available from: <http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&iissn=1574-888X&volume=12&issue=4&spage=326>
31. Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* [Internet]. 1981 Jul;292(5819):154–6. Available from: <http://www.nature.com/articles/292154a0>
32. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, et al. Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts. *Science* (80-) [Internet]. 1998 Nov 6;282(5391):1145–7. Available from: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.282.5391.1145>
33. Politis M, Lindvall O. Clinical application of stem cell therapy in Parkinson's disease. *BMC Med* [Internet]. 2012 Dec 4;10(1):1–7. Available from: <http://www.biomedcentral.com/1741-7015/10/1>
34. Vidaltamayo R, Bargas J, Covarrubias L, Hernández A, Galarraga E, Gutiérrez-Ospina G, et al. Stem Cell Therapy for Parkinson's Disease: A Road Map for a Successful Future. *Stem Cells Dev* [Internet]. 2010 Mar;19(3):311–20. Available from: <https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/scd.2009.0205>
35. Kirkeby A, Grealish S, Wolf DA, Nelander J, Wood J, Lundblad M, et al. Generation of Regionally Specified Neural Progenitors and Functional Neurons from Human Embryonic Stem Cells under Defined Conditions. *Cell Rep* [Internet]. 2012 Jun;1(6):703–14. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2012.04.009>
36. Chen Z-Z, Niu Y-Y. Stem cell therapy for Parkinson's disease using non-human primate models. *Zool Res* [Internet]. 2019;40(5):349–57. Available from: <http://www.zoores.ac.cn/EN/10.24272/j.issn.2095-8137.2019.053>

37. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell* [Internet]. 2006 Aug;126(4):663–76. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867406009767>
38. Park I-H, Zhao R, West JA, Yabuuchi A, Huo H, Ince TA, et al. Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors. *Nature* [Internet]. 2008 Jan 23;451(7175):141–6. Available from: <http://www.nature.com/articles/nature06534>
39. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, et al. Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell* [Internet]. 2007 Nov;131(5):861–72. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867407014717>
40. Ford E, Pearlman J, Ruan T, Manion J, Waller M, Neely GG, et al. Human Pluripotent Stem Cells-Based Therapies for Neurodegenerative Diseases: Current Status and Challenges. *Cells* [Internet]. 2020 Nov 20;9(11):1–23. Available from: <https://www.mdpi.com/2073-4409/9/11/2517>
41. Nielsen JJJ, Lillethorup TP, Glud AN, Sørensen JCH, Orłowski D. The application of iPSCs in Parkinson's disease. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* [Internet]. 2020;80(3):273–85. Available from: https://www.exeley.com/acta_neurobiologiae_experimentalis/doi/10.21307/ane-2020-024
42. Jang SE, Qiu L, Chan LL, Tan E-K, Zeng L. Current Status of Stem Cell-Derived Therapies for Parkinson's Disease: From Cell Assessment and Imaging Modalities to Clinical Trials. *Front Neurosci* [Internet]. 2020 Oct 16;14(October):1–16. Available from: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fnins.2020.558532/full>
43. Osborn TM, Hallett PJ, Schumacher JM, Isacson O. Advantages and Recent Developments of Autologous Cell Therapy for Parkinson's Disease Patients. *Front Cell Neurosci* [Internet]. 2020 Apr 3;14(April):1–13. Available from: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fncel.2020.00058/full>
44. Grochowski C, Radzikowska E, Maciejewski R. Neural stem cell therapy—Brief review. *Clin Neurol Neurosurg* [Internet]. 2018 Oct;173(January):8–14. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0303846718302889>

45. Björklund A, Stenevi U, Svendgaard NA. Growth of transplanted monoaminergic neurones into the adult hippocampus along the perforant path. *Nature* [Internet]. 1976;262(5571):787–90. Available from: <https://www.nature.com/articles/262787a0>
46. Moriarty N, Parish CL, Dowd E. Primary tissue for cellular brain repair in Parkinson's disease: Promise, problems and the potential of biomaterials. *Eur J Neurosci* [Internet]. 2019 Feb;49(4):472–86. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/ejn.14051>
47. Gonzalez R, Garitaonandia I, Poustovoitov M, Abramihina T, McEntire C, Culp B, et al. Neural Stem Cells Derived from Human Parthenogenetic Stem Cells Engraft and Promote Recovery in a Nonhuman Primate Model of Parkinson's Disease. *Cell Transplant* [Internet]. 2016 Nov 1;25(11):1945–66. Available from: <http://journals.sagepub.com/doi/10.3727/096368916X691682>
48. Riecke J, Johns KM, Cai C, Vahidy FS, Parsha K, Furr-Stimming E, et al. A Meta-Analysis of Mesenchymal Stem Cells in Animal Models of Parkinson's Disease. *Stem Cells Dev* [Internet]. 2015 Sep 15;24(18):2082–90. Available from: <https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/scd.2015.0127>
49. Boika A, Aleinikava N, Chyzhyk V, Zafranskaya M, Nizheharodava D, Ponomarev V. Mesenchymal stem cells in Parkinson's disease: Motor and nonmotor symptoms in the early posttransplant period. *Surg Neurol Int* [Internet]. 2020 Nov 11;11(437):380. Available from: <http://surgicalneurologyint.com/surgicalint-articles/mesenchymal-stem-cells-in-parkinsons-disease-motor-and-nonmotor-symptoms-in-the-early-posttransplant-period/>
50. Han F, Chen C, Wang W, Song H, Li S, Duan J, et al. Human umbilical cord-derived mesenchymal stromal cells ameliorated motor defects of 6-OHDA-induced rat model of Parkinson's disease. *Oncotarget* [Internet]. 2018 Jan 2;9(1):1–15. Available from: <https://www.oncotarget.com/lookup/doi/10.18632/oncotarget.24103>
51. Blandini F, Cova L, Armentero MT, Zennaro E, Levandis G, Bossolasco P, et al. Transplantation of undifferentiated human mesenchymal stem cells protects against 6-hydroxydopamine neurotoxicity in the rat. *Cell Transplant*. 2010;19(2):203–17.
52. Kim J-H, Auerbach JM, Rodríguez-Gómez JA, Velasco I, Gavin D, Lumelsky N, et al. Dopamine neurons derived from embryonic stem cells function in an animal model of Parkinson's disease. *Nature* [Internet]. 2002 Jul 20;418(6893):50–6. Available from: <http://www.nature.com/articles/nature00900>

53. Rodríguez-Gómez JA, Lu J-Q, Velasco I, Rivera S, Zoghbi SS, Liow J-S, et al. Persistent Dopamine Functions of Neurons Derived from Embryonic Stem Cells in a Rodent Model of Parkinson Disease. *Stem Cells* [Internet]. 2007 Apr 1;25(4):918–28. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3624763/pdf/nihms412728.pdf>
54. Roy NS, Cleren C, Singh SK, Yang L, Beal MF, Goldman SA. Functional engraftment of human ES cell-derived dopaminergic neurons enriched by coculture with telomerase-immortalized midbrain astrocytes. *Nat Med* [Internet]. 2006 Nov 1;12(11):1259–68. Available from: <http://www.nature.com/articles/nm1495>
55. Barbuti PA, Barker RA, Brundin P, Przedborski S, Papa SM, Kalia L V., et al. Recent Advances in the Development of Stem-Cell-Derived Dopaminergic Neuronal Transplant Therapies for Parkinson’s Disease. *Mov Disord* [Internet]. 2021 Aug 8;36(8):1772–80. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/mds.28628>
56. Wang YK, Zhu WW, Wu MH, Wu YH, Liu ZX, Liang LM, et al. Human Clinical-Grade Parthenogenetic ESC-Derived Dopaminergic Neurons Recover Locomotive Defects of Nonhuman Primate Models of Parkinson’s Disease. *Stem Cell Reports* [Internet]. 2018;11(1):171–82. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2018.05.010>
57. Rhee Y-H, Ko J-Y, Chang M-Y, Yi S-H, Kim D, Kim C-H, et al. Protein-based human iPS cells efficiently generate functional dopamine neurons and can treat a rat model of Parkinson disease. *J Clin Invest* [Internet]. 2011 Jun 1;121(6):2326–35. Available from: <http://www.jci.org/articles/view/45794>
58. Doi D, Samata B, Katsukawa M, Kikuchi T, Morizane A, Ono Y, et al. Isolation of human induced pluripotent stem cell-derived dopaminergic progenitors by cell sorting for successful transplantation. *Stem Cell Reports* [Internet]. 2014;2(3):337–50. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.stemcr.2014.01.013>
59. Hallett PJ, Deleidi M, Astradsson A, Smith GA, Cooper O, Osborn TM, et al. Successful Function of Autologous iPSC-Derived Dopamine Neurons following Transplantation in a Non-Human Primate Model of Parkinson’s Disease. *Cell Stem Cell* [Internet]. 2015 Mar;16(3):269–74. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1934590915000569>

60. Kikuchi T, Morizane A, Doi D, Magotani H, Onoe H, Hayashi T, et al. Human iPS cell-derived dopaminergic neurons function in a primate Parkinson's disease model. *Nature* [Internet]. 2017;548(7669):592–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nature23664>
61. Kefalopoulou Z, Politis M, Piccini P, Mencacci N, Bhatia K, Jahanshahi M, et al. Long-term Clinical Outcome of Fetal Cell Transplantation for Parkinson Disease. *JAMA Neurol* [Internet]. 2014 Jan 1;71(1):83. Available from: <http://archneur.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/jamaneurol.2013.4749>
62. Piccini P, Brooks DJ, Björklund A, Gunn RN, Grasby PM, Rimoldi O, et al. Dopamine release from nigral transplants visualized in vivo in a Parkinson's patient. *Nat Neurosci* [Internet]. 1999 Dec;2(12):1137–40. Available from: https://www.nature.com/articles/nn1299_1137
63. Politis M, Oertel WH, Wu K, Quinn NP, Pogarell O, Brooks DJ, et al. Graft-induced dyskinesias in Parkinson's disease: High striatal serotonin/dopamine transporter ratio. *Mov Disord* [Internet]. 2011 Sep;26(11):1997–2003. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/mds.23743>
64. Wenker SD, Pitossi FJ. Cell therapy for Parkinson's disease is coming of age: current challenges and future prospects with a focus on immunomodulation. *Gene Ther* [Internet]. 2020 Feb 16;27(1–2):6–14. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41434-019-0077-4>
65. Kirkeby A, Parmar M, Barker RA. Strategies for bringing stem cell-derived dopamine neurons to the clinic: A European approach (STEM-PD) [Internet]. 1st ed. Vol. 230, *Progress in Brain Research*. Elsevier B.V.; 2017. 165–190 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/bs.pbr.2016.11.011>
66. Parmar M, Grealish S, Henchcliffe C. The future of stem cell therapies for Parkinson disease. *Nat Rev Neurosci* [Internet]. 2020 Feb 6;21(2):103–15. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41583-019-0257-7>
67. Venkataramana NK, Kumar SKV, Balaraju S, Radhakrishnan RC, Bansal A, Dixit A, et al. Open-labeled study of unilateral autologous bone-marrow-derived mesenchymal stem cell transplantation in Parkinson's disease. *Transl Res* [Internet]. 2010;155(2):62–70. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.trsl.2009.07.006>

68. Stoker TB, Barker RA. Recent developments in the treatment of Parkinson's Disease. *F1000Research* [Internet]. 2020 Jul 31;9:862. Available from: <https://f1000research.com/articles/9-862/v1>
69. Li W, Englund E, Widner H, Mattsson B, van Westen D, Lätt J, et al. Extensive graft-derived dopaminergic innervation is maintained 24 years after transplantation in the degenerating parkinsonian brain. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 2016 Jun 7;113(23):6544–9. Available from: <http://www.pnas.org/lookup/doi/10.1073/pnas.1605245113>
70. Studer L. Strategies for bringing stem cell-derived dopamine neurons to the clinic—The NYSTEM trial. In: *Progress in Brain Research* [Internet]. 1st ed. Elsevier B.V.; 2017. p. 191–212. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/bs.pbr.2017.02.008>
71. Barker RA, Parmar M, Studer L, Takahashi J. Human Trials of Stem Cell-Derived Dopamine Neurons for Parkinson's Disease: Dawn of a New Era. *Cell Stem Cell* [Internet]. 2017;21(5):569–73. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.stem.2017.09.014>
72. Schweitzer JS, Song B, Herrington TM, Park T, Lee N, Ko S, et al. Personalized iPSC-Derived Dopamine Progenitor Cells for Parkinson's Disease. *N Engl J Med* [Internet]. 2020 May 14;382(20):1926–32. Available from: <http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa1915872>
73. Takahashi J. iPS cell-based therapy for Parkinson's disease: A Kyoto trial. *Regen Ther* [Internet]. 2020 Mar;13:18–22. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.reth.2020.06.002>

