

Potencial terapêutico de células estaminais no AVC

Ana Sofia Fernandes Alves

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

Orientadora: Prof^a. Doutora Liliana Inácio Bernardino
Co-orientadora: Doutora Maria Francisca Fernandes Braz

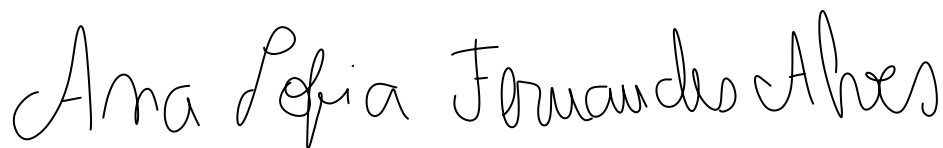
janeiro de 2025

Declaração de Integridade

Eu, Ana Sofia Fernandes Alves, que abaixo assino, estudante com o número de inscrição 43256 de Medicina da Faculdade de Ciências da Saúde, declaro ter desenvolvido o presente trabalho e elaborado o presente texto em total consonância com o **Código de Integridades da Universidade da Beira Interior**.

Mais concretamente afirmo não ter incorrido em qualquer das variedades de Fraude Académica, e que aqui declaro conhecer, que em particular atendi à exigida referenciação de frases, extratos, imagens e outras formas de trabalho intelectual, e assumindo assim na íntegra as responsabilidades da autoria.

Universidade da Beira Interior, Covilhã 19 /01 /2025

A handwritten signature in black ink that reads "Ana Sofia Fernandes Alves". The signature is written in a cursive, flowing style.

(assinatura conforme Cartão de Cidadão ou preferencialmente
assinatura digital no documento original se naquele mesmo formato)

Agradecimentos

À minha orientadora, Prof.^a Doutora Liliana Inácio Bernardino, pela sua incansável ajuda, disponibilidade e prontidão. Sem o seu apoio e motivação não teria conseguido concretizar esta tese de mestrado. Obrigada por tudo. Definitivamente foi a melhor escolha que fiz.

À minha co-orientadora, Doutora Francisca Braz, um obrigada pela sua presença e preocupação. Representa uma fonte de força e inspiração constante na minha vida. Ensinou-me a ter coragem e a lutar por aquilo que quero. Mostrou-me que as amizades são aquilo que a universidade nos dá de mais valioso e eterno. E fez-me perceber que sou capaz daquilo que sonho ser.

À minha mãe, um obrigada especial. Tu que tens o melhor abraço e sorriso do mundo. Tu que sabes sempre o que dizer, nos bons e maus momentos. Tu que sempre tiveste lá para me apoiar, para me ouvir e para me ajudar. És o pilar mais importante da minha vida. És o meu porto de abrigo. Sem ti não tinha conseguido. Espero que estejas orgulhosa.

Ao meu pai, um obrigada eterno. Tu que sempre me mostraste que amar o outro é o nosso maior superpoder. És o meu exemplo. És o meu herói. És a razão daquilo em que me tornei. Tu és força, és casa, és amor, és tudo para mim. Estarás sempre comigo.

Aos meus irmãos e sobrinho Luís, pelo amor, força e apoio inabalável, em todo o meu percurso pessoal. Por me ensinarem a amar o próximo incondicionalmente.

Aos meus avós, obrigada pelo amor e sabedoria que compartilham comigo. Obrigada por sempre acreditarem em mim.

À Carol, à Ana Luís, à Versos, ao Pedro e ao Ventura, que nunca desistiram de mim. Que foram o meu chão, quando eu fiquei sem saber o que fazer. Vocês são a família que eu escolhi.

À Ana Dias, à Jani, à Guidinha, à Graça, ao Kikinho, à Joana, à Carol, à Artesã Mor e à Martinha por fazerem da Covilhã uma casa especial. Vocês são o tesouro mais precioso que a vida me deu nestes 6 anos. Sorte a minha em vos ter ao meu lado. Seja nas minhas conquistas ou derrotas, sei que estarão lá para mim.

Resumo

O Acidente Vascular Cerebral corresponde a uma emergência médica e representa a segunda maior causa de mortalidade global, sendo responsável por milhões de mortes e por incapacidade temporária ou permanente em numerosos sobreviventes. Caracteriza-se por um déficit focal ou global da função cerebral, de início súbito, sendo classificado em dois tipos, o AVC isquêmico, o mais comum e resultante da obstrução do fluxo sanguíneo num vaso a nível cerebral, e o AVC hemorrágico, o menos comum e proveniente do rompimento de um vaso a nível cerebral. Os sinais mais comuns para o diagnóstico do AVC incluem a fraqueza, a paralisia e a perda de sensibilidade de um lado do corpo, a afasia, as alterações motoras, a perda de acuidade visual e, por fim, as alterações ao nível da consciência.

A rapidez do tratamento do AVC é crucial para minimizar os danos cerebrais, consistindo na trombólise intravenosa e trombectomia endovascular no AVCI e na cirurgia e controlo da pressão arterial no AVCH. Apesar dos seus comprovados benefícios, estas terapias apresentam diversas limitações e critérios de inclusão e exclusão, levando a que muitos dos pacientes não sejam intervencionados com estas técnicas.

O tratamento com células estaminais surge assim como uma proposta promissora para a recuperação funcional pós-AVC, oferecendo uma nova perspetiva para a regeneração neuronal. O mecanismo de ação das células estaminais no tratamento do AVC envolve a substituição das células neuronais degeneradas ou disfuncionais, restabelecimento das conexões nervosas e formação de novos vasos sanguíneos que promovem a irrigação da área afetada. A eficácia desta abordagem terapêutica depende de múltiplos fatores, incluindo o tipo de células utilizadas, a dose administrada, a via de administração, as características individuais do paciente e o *timing* da intervenção em relação ao evento vascular.

Desta forma, esta revisão analisa o potencial terapêutico das propriedades das células estaminais, exclusivamente investigadas em estudos pré-clínicos e clínicos, nos processos de angiogénese, neurogénese, migração e diferenciação, destacando o seu papel na reparação neuronal após um AVC. Com vista, a incentivar a realização de pesquisas adicionais que validem os resultados obtidos, definam protocolos otimizados para a administração destas células e assegurem a segurança em todas as etapas, desde a recolha até à sua aplicação.

Potencial terapêutico de células estaminais no AVC

Palavras-chave

Enfarte;AVC;Células estaminais;Terapia celular;Transplante de células estaminais

Abstract

Cerebral Vascular Accident is a medical emergency and the second leading cause of global mortality, responsible for millions of deaths and temporary or permanent disability in many survivors. It is characterized by a focal or global impairment of brain function, of sudden onset. It is classified into two types: ischemic stroke, the most common and results from the obstruction of blood flow in a cerebral vessel, and hemorrhagic stroke, the least common and results from the rupture of a cerebral vessel. The most common signs for diagnosing a stroke include weakness, paralysis and loss of sensation on one side of the body, aphasia, motor changes, loss of visual acuity, and, finally, changes in consciousness.

Rapid treatment of stroke is crucial to minimizing brain damage, consisting of intravenous thrombolysis and endovascular thrombectomy in ischemic stroke and surgery and blood pressure control in hemorrhagic stroke. Despite their proven benefits, these therapies have some limitations and inclusion and exclusion criteria, meaning many patients are not treated with these techniques. Stem cell treatment has thus emerged as a promising proposal for post-stroke functional recovery, offering a new perspective for neuronal regeneration. The mechanism of action of stem cells in the treatment of stroke involves the repair of degenerated or dysfunctional neuronal cells, the re-establishment of nerve connections, and the formation of new blood vessels that promote irrigation of the affected area. The effectiveness of this therapeutic approach depends on multiple factors, including the type of cells used, the dose administered, the route of administration, the individual characteristics of the patient, and the timing of the intervention concerning the vascular event.

Therefore, this review addresses the therapeutic potential that the properties of stem cells, exclusively investigated in preclinical and clinical studies, offer in the processes of angiogenesis, neurogenesis, migration, and differentiation for neuronal repair after a stroke. It aims to encourage further research to validate the results obtained, look for new methods of enhancing this cell therapy and guarantee safety in both their collection and use.

Keywords

Potencial terapêutico de células estaminais no AVC

Stroke;CVA;Stem cells;Cell therapy;Stem cell transplantation

Índice

Agradecimentos.....	v
Resumo.....	vii
Palavras-chave.....	viii
Abstract.....	ix
Keywords.....	ix
Lista de Figuras.....	xiii
Lista Tabelas.....	xv
Lista de Acrónimos.....	xvii
1.Introdução.....	1
1.1 Materiais e métodos.....	2
2. Acidente vascular cerebral.....	5
2.1 Epidemiologia, classificação e etiologia.....	5
2.2 Classificação e etiologia.....	5
2.3 Manifestações clínicas.....	6
2.4 Patofisiologia.....	7
2.5 Tratamento.....	11
3. Células estaminais.....	13
3.1 Definição e classificação.....	13
3.2 Fisiologia e propriedades.....	15
3.3 Administração de células estaminais.....	19
3.3.1 Modos de administração.....	19
3.3.2 Fatores condicionantes.....	22
4. Aplicações terapêuticas com células estaminais.....	25
4.1 Células estaminais embrionárias.....	25
4.2 Células estaminais adultas.....	29
4.2.1 Células estaminais mesenquimais.....	29
4.2.2 Células derivadas da medula óssea.....	34
4.2.3 Células estaminais derivadas do cordão umbilical.....	37
4.3 Células estaminais pluripotentes induzidas.....	38
4.4 Limitações.....	40
6. Conclusão.....	47
7. Referências bibliográficas.....	51

Lista de Figuras

Figura 1- Fluxograma de recolha de artigos.....	4
Figura 2- Mecanismos químicos e moleculares na patofisiologia do AVC. Adaptada do artigo (18).....	8
Figura 3- Distribuição por fases dos mecanismos químicos e moleculares envolvidos na patofisiologia do AVC. Adaptada do artigo (22).....	10
Figura 4- Tipos de CE de acordo com o seu grau de diferenciação e origem. Adaptado do artigo (29).....	14
Figura 5- Funções das CE. Adaptada dos artigos (32,33)	15
Figura 6- Mecanismos envolvidos na angiogénese, neurogénese e crescimento axonal. Adaptada do artigo (15)	17
Figura 7- Mecanismos envolvidos na secreção de fatores protetores celulares. Adaptada do artigo (15)	18

Lista Tabelas

Tabela 1- Subtipos do AVCI e AVCH. (4,10,11)	6
Tabela 2- Vantagens e desvantagens dos diferentes tipos de administração de CE.	20
Tabela 3- Estudos pré-clínicos e clínicos realizados com CEE para o tratamento de AVC. 27	
Tabela 4- Estudos pré-clínicos e clínicos realizados com CEMQ derivadas da medula óssea, CETA e CETD para o tratamento de AVC.	31
Tabela 5- Estudos pré-clínicos e clínicos realizados com CMNMO (CEH e CPE) para o tratamento de AVC.	35
Tabela 6- Estudos pré-clínicos e clínicos realizados com CECU para o tratamento de AVC.	37
Tabela 7- Estudos pré-clínicos realizados com CEPI para o tratamento de AVC.	39
Tabela 8- Resumo esquemático do potencial terapêutico e das limitações das diferentes CE analisadas nos estudos clínicos e pré-clínicos.....	43

Lista de Acrónimos

ACM	Artéria cerebral média
AIT	Acidente isquémico transitório
Akt	Serina/treonina quinase
Ang1	Angiotensina 1
ATP	Trifosfato de adenosina
AVC	Acidente vascular cerebral
AVCH	Acidente vascular cerebral hemorrágico
AVCI	Acidente vascular cerebral isquémico
bFGF	Fator de crescimento fibroblástico básico
Bcl-2	Linfoma de células B2
BDNF	Fator neurotrófico derivado do cérebro
c-Myc	Produto oncogénico de c-mielocitomatose
CE	Células estaminais
CEA	Células estaminais adultas
CECU	Células estaminais derivadas do cordão umbilical
CEMNMO	Células estaminais mononucleares da medula óssea
CEMQ	Células estaminais mesenquimais
CEN	Células estaminais neurais
CEPI	Células estaminais pluripotentes induzidas
CETA	Células estaminais derivadas do tecido adiposo
CETD	Células estaminais derivadas do tecido dentário
CEE	Células estaminais embrionárias
CEH	Células estaminais hematopoéticas
CPE	Células progenitoras endoteliais
CXCR	Recetor de quimiocina
DALYs	Anos de vida perdidos ajustados por incapacidade
DGS	Direção Geral da Saúde
DM	Diabetes mellitus
EPO	Eritropoetina
ERK	Quinase regulada por sinal extracelular
EV	Vesículas extracelulares

Potencial terapêutico de células estaminais no AVC

GABA	Ácido gama-aminobutírico
GCSF	Fator estimulador de colónias de granulócitos
GDNF	Fator neurotrófico derivado da linhagem das células gliais
HGF	Fator de crescimento de hepatócitos
HIF-1	Fator induzível por hipóxia
HSP	Proteína de choque térmico
HTA	Hipertensão Arterial
IA	Intra-arterial
IC	Intracerebral
IFN- γ	Interferão-gama
IGF-1	Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1
IL	Interleucinas
IN	Intranasal
iNOS	Óxido nítrico-sintase induzida
IP	Intraperitoneal
IT	Intratecal/intraventricular
IV	Intravenosa
JNK	Quinase c-Jun N-terminal
Klf4	Fator 4 semelhante a Kruppel
LCR	Líquido cefalorraquidiano
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
MCP-1	Proteína quimioatraente de monócitos 1
MEC	Matriz extracelular
MIP-1 α	Proteína inflamatória de macrófagos 1-alfa
MMP	Metaloproteinase da matriz
mi-RNA	Micro ácido ribonucleico
Nfr2	Fator nuclear relacionado com eritroide
NGF	Fator de crescimento nervoso
OMS	Organização Mundial da Saúde
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
PIC	Pressão intracraniana
PI3K	Fosfatidilinositol-3-quinase
rt-PA	Alteplase
ROS	Espécies reativas de oxigénio

Potencial terapêutico de células estaminais no AVC

SDF-1/CXCL12	Fator 1 derivado do estroma
SOD	Superóxido dismutase
Sox2	Fator de Transcrição SRY-box 2
TGF β 1	Fator de crescimento transformador beta 1
Th	Células T CD4+
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
Treg	Células T reguladoras
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
ZSG	Zona subgranular
ZSV	Zona subventricular

1.Introdução

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), o acidente vascular cerebral (AVC) é a segunda principal causa de morte e a terceira principal causa de incapacidade no mundo, devido à crescente adoção de estilos de vida sedentários e ao crescimento do número de pessoas idosas nas populações ocidentais (1,2). Segundo a Organização Mundial do AVC, a incidência desta patologia cerebrovascular a nível mundial traduz-se na ocorrência de um AVC a cada três segundos, estando comprovado que um em quatro indivíduos com idade superior a 25 anos terá um AVC no decorrer da sua vida (3).

De acordo com a Direção Geral da Saúde (DGS), esta doença cerebrovascular consiste num défice neurológico, focal ou global, de instalação súbita e é classificada em dois tipos: o acidente vascular cerebral isquémico (AVCI), resultante da privação de oxigénio e nutrientes às células cerebrais, por obstrução do fluxo sanguíneo num vaso cerebral; e o acidente vascular cerebral hemorrágico (AVCH), decorrente do rompimento de um vaso cerebral, o qual devido ao sangue acumulado, promove o desenvolvimento de edema, aumento da pressão intracraniana (PIC) e síntese de produtos tóxicos para os neurónios (3). O seu diagnóstico clínico requer confirmação através do uso de neuroimagem, contudo na presença súbita dos sintomas clínicos traduzidos pelo acrónimo FAST (*face, arms, speech, time*), tais como perda de função sensorial e/ou motora num lado do corpo (hemihipostesia/hemiparesia), alteração da visão (hemianopsia homónima), modificação da marcha (ataxia), perda da capacidade comunicativa (disartria), ausência de compreensão/fluência no discurso (afasia) e cefaleia súbita de intensidade severa, a suspeita de AVC, geralmente, é incontestável(4,5).

Atualmente, o tratamento do AVC tem como principal propósito garantir a estabilização hemodinâmica do paciente o mais rapidamente possível. Assim sendo, no AVCI o objetivo é o restabelecimento da perfusão sanguínea no tecido cerebral isquémico, através da trombólise endovenosa com alteplase (rt-PA)/revascularização farmacológica e/ou da trombectomia mecânica/revascularização, mecânica por via endovascular. Enquanto, no AVCH o tratamento consiste numa intervenção cirúrgica para remoção do hematoma ou reparação do vaso sanguíneo danificado (4). No entanto, apesar dos seus comprovados benefícios, estas terapêuticas convencionais são estritamente dependentes do momento temporal da sua realização e apresentam critérios e janelas de ação específicos para serem eficazes. Consequentemente, após o tratamento, os pacientes apresentam comorbilidades significativas, como perdas consideráveis da sua capacidade laboral e uma reabilitação

prolongada na fase de recuperação após o AVC (1). Desta forma, o AVC contribui para um enorme impacto socioeconómico a nível mundial, sendo uma das doenças cerebrovasculares mais devastadoras (4,6).

Com o objetivo de garantir aos sobreviventes pós-AVC o restabelecimento da função neurológica quase equivalente à pré-existente, bem como total independência nas atividades da vida diária e melhor qualidade de vida, surgiu a necessidade de investigar a possibilidade das células estaminais (CE) repararem os danos neuronais e gliais. Estas células apresentam características únicas que as tornam promissoras na regeneração de células e/ou tecidos danificados e mortos, nomeadamente a capacidade proliferativa e de diferenciação em novos neurónios (neurogénese) e células da glia. Além disso, as CE libertam fatores tróficos e anti-inflamatórios, reduzindo a inflamação e promovendo o crescimento de vasos sanguíneos (angiogénese) no cérebro, potenciando uma renovação mais eficaz e eficiente das células cerebrais lesionadas, após um AVC (6,7).

Esta revisão sistemática pretende analisar as alterações nas células cerebrais após a aplicação de CE, examinando os benefícios e o potencial terapêutico destas células indiferenciadas nas sequelas do AVC com recuperação de capacidades motoras, não-motoras e sensitivas prévias. Este tema é particularmente relevante, face à grande incidência e prevalência de AVC a nível mundial, particularmente em Portugal, visto que no nosso país, segundo a Sociedade Portuguesa de AVC, verifica-se que a cada hora três portugueses sofrem um AVC e que cerca de 50% dos sobreviventes ficam com limitações moderadas a graves nas atividades da vida diária (4,7).

1.1 Materiais e métodos

A realização desta revisão sistemática tem como principal objetivo identificar e reconhecer o potencial terapêutico das CE no tratamento do AVC, analisando as modificações e as adaptações desencadeadas pelas CE no tecido cerebral lesionado.

Na elaboração desta revisão realizou-se uma ampla pesquisa bibliográfica, recorrendo, principalmente, à base de dado *Pubmed*, complementada com normas da OMS, DGS e Sociedade Portuguesa de AVC, dados científicos da Organização Mundial do AVC e estatísticas da *American Heart Association*.

A pesquisa bibliográfica teve lugar entre os meses de julho de 2024 e agosto de 2024.

Potencial terapêutico de células estaminais no AVC

Para a pesquisa foram usados os termos *stroke*, *CVA*, *stem cells*, *cell therapy*, *stem cell transplantation*, os quais foram associados aos operadores booleanos OR e AND. Neste caso, como os termos *stroke* e *CVA* são sinónimos e *stem cells* e *stem cell transplantation* igualmente, foi utilizado o operador booleano OR entre estes e o operador booleano AND entre os termos referidos anteriormente e *stem cells*. (((*stroke*) OR (*CVA*)) AND ((*stem cells transplantation*) OR (*cell therapy*)) AND (*stem cells*)). Através desta pesquisa, foram reunidos 763 artigos.

Nesta revisão sistemática foram incluídos artigos sem limitação na data de publicação, nos idiomas Inglês, Português e Espanhol, com estudos realizados em modelos animais e humanos.

Os critérios de exclusão dos artigos basearam-se na eliminação dos artigos duplicados, no título e leitura dos respetivos *abstracts* e nos artigos com estudos em populações alvo de idades inferiores a 18 anos. A não existência de correlação entre o conteúdo dos *abstracts* e as temáticas abordadas nesta revisão sistemática foi o fator determinante na exclusão dos mesmos.

Além disso, foi realizada uma análise das referências dos artigos utilizados, de forma a garantir que outros estudos relevantes fossem incluídos nesta dissertação. Após a aplicação de todos estes critérios e da leitura e análise integral dos artigos obtidos na pesquisa foram incluídos nesta dissertação um total de 60 artigos.

É importante salientar que, embora esta dissertação cite um número substancialmente maior de referências bibliográficas, apenas foram integrados 60 artigos na análise dos resultados apresentados. Estes artigos refletem diretamente os estudos pré-clínicos e clínicos relacionados com a aplicação das CE no contexto do AVC, sendo os restantes utilizados para enquadramento teórico e metodológico.

A revisão está escrita cumprindo o Acordo Ortográfico da Língua Portuguesa.

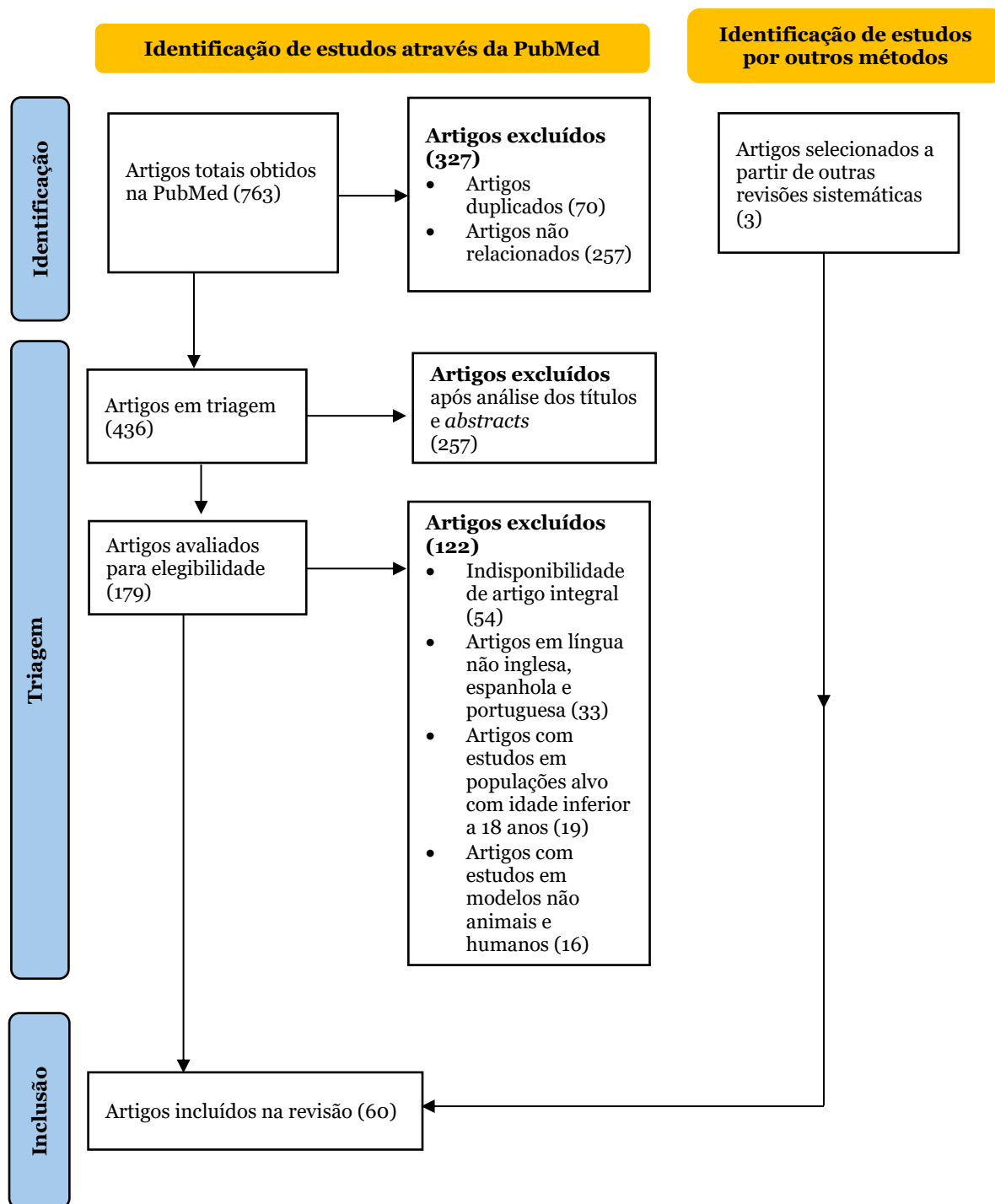


Figura 1- Fluxograma de recolha de artigos.

2. Acidente vascular cerebral

2.1 Epidemiologia, classificação e etiologia

A incidência mundial de AVC é estimada em 12,2 milhões de novos casos por ano, tendo aumentado cerca de 50% nos últimos 17 anos (1,2). Atualmente, a ocorrência de AVC prevalece em pessoas com menos de 70 anos, no AVCI nomeadamente entre os 20 e os 54 anos e com idade superior a 45 anos no AVCH (1,3,8). No que se refere à prevalência e à incidência por género, no AVCI são superiores nas mulheres, enquanto no AVCH são superiores nos homens (1,3). No que concerne à incapacidade associada ao AVC, medida através dos DALYs (anos de vida perdidos ajustados por incapacidade), esta traduz-se em mais de 143 milhões de anos de vida saudável perdidos por ano, prevalecendo nos indivíduos com idades inferiores a 70 anos (57%) e homens (54%) (1). Em relação à taxa de mortalidade associada ao AVC, esta é de cerca de 6,5 milhões de pessoas por ano, demonstrando maior predominância em idades compreendidas entre os 50 e os 70 anos e, simultaneamente, no sexo masculino (51%) (1).

2.2 Classificação e etiologia

O diagnóstico de um AVC implica a presença de sintomas neurológicos por mais de 24 horas e/ou evidências de isquémia nas técnicas de neuroimagem, independentemente do seu tipo ou subtipo. Desta forma, é de extrema importância diferenciar um AVC de um acidente isquémico transitório (AIT), o qual se classifica igualmente como um episódio breve de disfunção neurológica devido à interrupção do fornecimento de oxigénio e nutrientes ao cérebro. Todavia, o AIT apresenta manifestações clínicas que resolvem em menos de 24 horas (habitualmente menos de 60 minutos) e sem evidências de isquémia em exames imagiológicos cerebrais(9).

Os AVCs categorizam-se em dois grandes grupos, o AVCI, atualmente o mais frequente (80-90%) e o AVCH (10-20%), os quais, posteriormente, se subdividem em subtipos, como exemplificado na tabela 1 (10).

Potencial terapêutico de células estaminais no AVC

Tabela 1- Subtipos do AVCI e AVCH. (4,10,11)

AVCI		AVCH	
AVC aterotrombótico (doenças dos grandes vasos)	Oclusão vascular	Hemorragia intraparenquimatosa/intracerebral (profunda ou lobar)	Hipertensiva
	Embolia arterio-arterial		Anomalias vasculares Congénitas: Malformação arteriovenosa, malformações venosas, telangiectasias capilares. Adquiridas: Angiomas cavernosos e fístulas arteriovenosas durais.
	Mecanismo hemodinâmico por: - Hipotensão; - Diminuição do fluxo sanguíneo (estenose crítica); - Isquemia em zonas de fronteira vascular.		Angiopatia mieloide Outros -Terapia anticoagulante/trombótica; -Tumores metastáticos; -Distúrbios hematológicos; -Substâncias simpaticomiméticas (cocaína e anfetaminas); -Transformação hemorrágica de um AVCI.
AVC cardioembólico	Hemorragia subaracnóidea		
AVCs lacunares (doenças dos pequenos vasos)	Hemorragia epidural/subdural		
AVC por outras causas			
AVC de causa desconhecida			

AVC, acidente vascular cerebral; AVCI, acidente vascular cerebral isquémico; AVCH, acidente vascular cerebral hemorrágico

2.3 Manifestações clínicas

O AVCI ocorre mais frequentemente durante a noite (ateroembólico), com sinais intermitentes e flutuantes, ou de manhã (cardioembólico), com déficit neurológico máximo desde o início. As manifestações mais comuns incluem hemiparesia ou hemiplegia da face e/ou braço e/ou perna, disartria, afasias de Broca ou *Wernicke*, amaurose fugaz,

hemianopsia homônima contralateral, abulia, incontinência urinária, vertigem, nistagmo e ataxia, variando conforme a localização da lesão (4).

O AVCH manifesta-se geralmente durante a atividade diurna ou esforços físicos, com instalação súbita (minutos). É caracterizado por cefaleia severa, náuseas, vômitos, fotofobia, convulsões, alteração do estado de consciência e déficit neurológico agudo, decorrente do efeito de massa e toxicidade do hematoma, bem como da elevação da PIC. Os sinais e sintomas associados também diferem consoante o local da lesão (4).

2.4 Patofisiologia

Após um AVC, ocorre uma complexa cadeia de eventos a nível molecular, estrutural e químico das células cerebrais (neurónios e células da glia) e da barreira hematoencefálica (BHE), que culmina na perturbação do equilíbrio homeostático cerebral (12,13).

Num AVCI, uma oclusão vascular por trombo ou êmbolo provoca isquemia celular pela interrupção do aporte de oxigénio e nutrientes às células cerebrais, traduzindo-se na rápida depleção de trifosfato de adenosina (ATP), devido à intensificação do metabolismo anaeróbio e inibição das bombas de $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{ATPase}$ e $\text{Ca}^{2+}/\text{ATPase}$ da membrana plasmática; no início precoce de acidose metabólica, por aumento do ácido láctico; e no desequilíbrio iónico (12–14). Na região com fluxo sanguíneo severamente reduzido (núcleo isquémico), esses processos culminam na necrose celular imediata de todos os elementos celulares. Concomitantemente, surge a zona de penumbra, uma região ao redor do núcleo isquémico, que mantém transitoriamente um suprimento sanguíneo colateral suficiente para a viabilidade celular(12). Num AVCH, proveniente do extravasamento de sangue do vaso sanguíneo para o espaço envolvente, a estase sanguínea num determinado espaço cerebral associa-se à produção de compostos neurotóxicos, provocando o aumento da PIC, um estado de hipercoagulabilidade e a hemólise (12,13).

Os neurónios são as unidades fundamentais do sistema nervoso mais vulneráveis a alterações nos níveis de oxigénio, podendo tornar-se, em segundos, disfuncionais ou até morrer. Minutos após a ocorrência de um AVC as células lesionadas entram num estado de excitotoxicidade (figura 2), em resultado da concentração aumentada de glutamato no espaço extracelular, o qual potencia a ativação dos recetores NMDA (N-metil-D-aspartato) e AMPA (ácido alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiónico) (15). A despolarização persistente da membrana citoplasmática dos neurónios incentiva o influxo de iões de cálcio, sódio e cloreto, e efluxo de iões de potássio, os quais induzem a ativação de várias enzimas,

Potencial terapêutico de células estaminais no AVC

como a óxido nítrico sintase induzida (iNOS), a ciclo-oxigenase, a fosfolipase A2 e a calpaína 1 (16). A formação excessiva de óxido nítrico e superóxido, por estimulação da enzima fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina oxidase, eleva a concentração de espécies reativas de oxigênio (ROS) provocando *stress* oxidativo, disfunção mitocondrial e, simultaneamente, aumento de prostaglandinas, estimulando a resposta inflamatória (16). A cascata inflamatória desencadeia a ativação dos recetores do fator de necrose tumoral (TNF) e da proteína ligante Fas, bem como das quinases do grupo Janus (JAK1, JAK2, JAK3 e tirosina quinase 2) e dos genes da família Bcl-2 (linfoma de células B 2), que emitem um sinal à mitocôndria para a libertação de citocromo c. Após algumas horas ocorre a ativação da caspase-12, caspase-3 e caspase-9, que induzem a ativação das vias de morte celular por semanas (17,18).

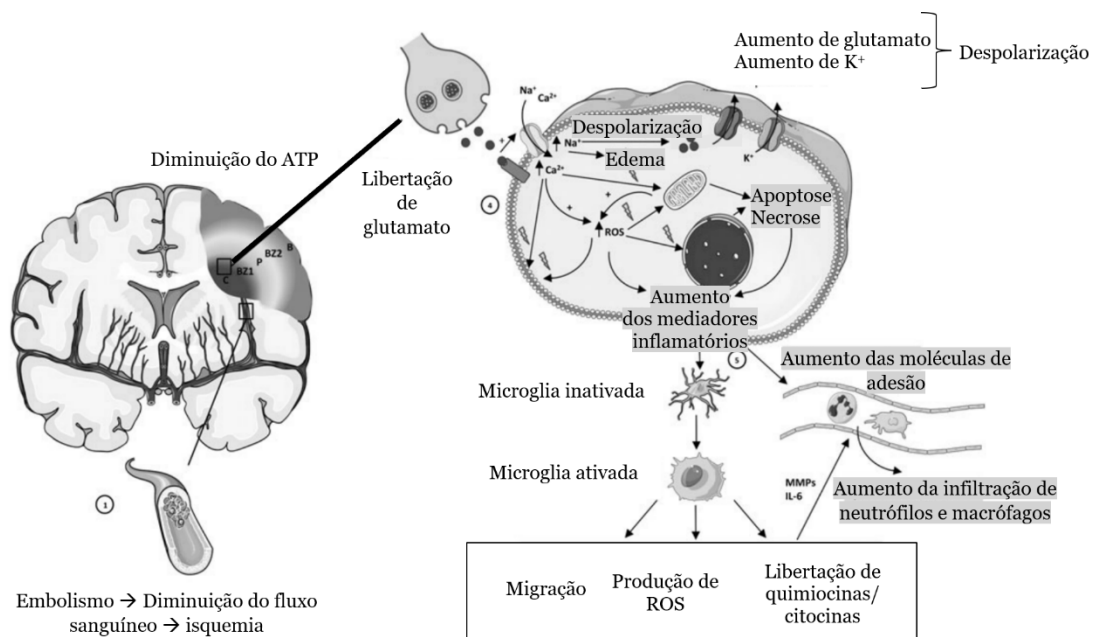


Figura 2- Mecanismos químicos e moleculares na fisiopatologia do AVC. Adaptada do artigo (18). ATP, trifosfato de adenosina; Ca^{2+} , íons de cálcio; IL, interleucinas; K^+ , íons de potássio; MMP, metaloproteinase da matriz; Na^+ , íons de sódio; ROS, espécies reativas de oxigênio

Estas alterações estruturais e químicas expressam-se sob a forma DAMPs (padrões moleculares associados a danos) que são reconhecidos pelos recetores de reconhecimento de padrões, nomeadamente os recetores *Toll-like* (16,19). Esta sinalização celular promove o recrutamento e ativação das células do sistema imunológico inato (microglia, neutrófilos, mastócitos, monócitos e macrófagos) e adaptativo (células T e B, células *natural-killer* e células dendríticas). Cada uma destas células apresenta uma função específica e a capacidade de produzir interleucinas (IL) (IL-1, IL-6 e IL- β), MMP tipo 2 e 9, TNF- α , entre outras moléculas sinalizadoras com propriedades inflamatórias (13,18). Em particular, as células da microglia, parte do sistema imunitário inato, adotam diferentes estados de

Potencial terapêutico de células estaminais no AVC

ativação ou polarização, em resposta a um AVC (20). Na fase aguda do AVC, as células da microglia ficam ativadas e apresentam fenótipo pró-inflamatório, através da libertação do TNF- α , interferão-gama (IFN- γ), IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-23 e iNOS (7,19). Após 12 horas da ocorrência do AVC e nas fases subaguda e crónica do AVC, as células da microglia alteram o fenótipo estimulando mecanismos com ação protetora e reparadora (7,19), tais como, a angiogénese, o crescimento axonal, a maturação sináptica, a remoção de neurónios danificados e detritos celulares, a libertação de fatores tróficos, como o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), o BDNF e o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), e a produção de citocinas anti-inflamatórias, como a IL-4, IL-10 e IL-13 e o TGF- β 1 (14,19).

De acordo com a figura 3, nas fases iniciais após o AVC, ocorrem mecanismos endógenos protetores no cérebro, nomeadamente a reperfusão via artérias colaterais ou fibrinólise e a ativação de canais, recetores ou reguladores anti excitotóxicos, como o ácido aminobutírico (GABA) e recetores de K⁺. Com o decorrer do tempo, além dos fenómenos relacionados com compensação funcional adaptativa há plasticidade cerebral "estrutural", uma capacidade inata do cérebro de renovar os neurónios danificados e conter a morte celular na zona de penumbra. É conseguida pela neurogénese, angiogénese e sinaptogénese, que são realizados graças à amplificação da atividade das quinases, dos fatores de transcrição, dos fatores de crescimento (neurotrofina 3, fator estimulador de colónias de granulócitos - GCSF, VEGF, angiotensina- Ang1, fator derivado do estroma - SDF1/CXCL12, fator neurotrófico derivado do cérebro - BDNF) e das moléculas antiapoptóticas (proteína de choque térmico - HSP 70, proteína Bcl-2, inibidores de proteínas de apoptose, fator induzível por hipóxia - HIF1), anti-inflamatórias (IL10, fator de crescimento transformador b1 – TGF- β 1) e antioxidantes (alfa-tocoferol, vitamina C) (19,21).

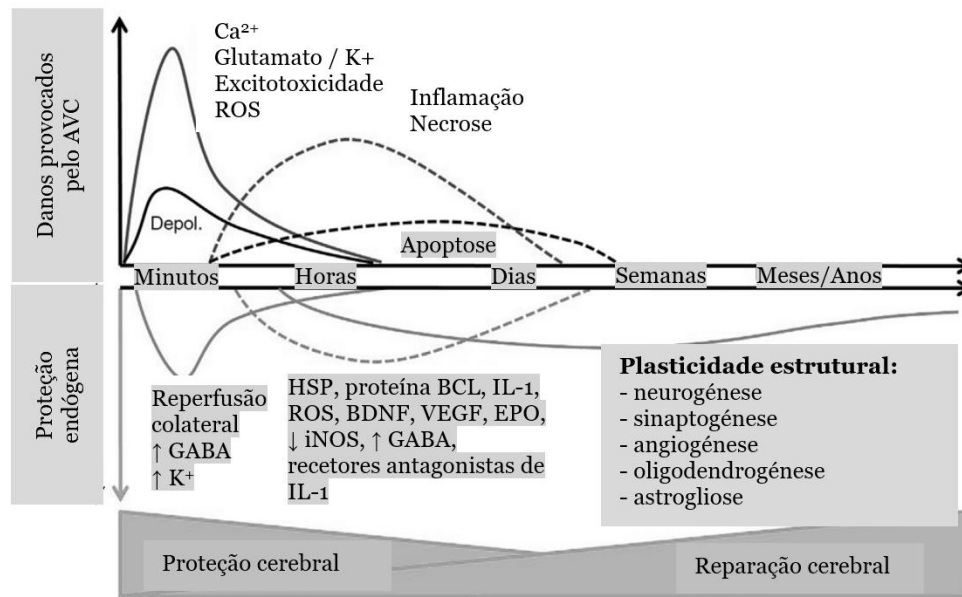


Figura 3- Distribuição por fases dos mecanismos químicos e moleculares envolvidos na patofisiologia do AVC. Adaptada do artigo (22). AVC, acidente vascular cerebral; BDNF, fator neurotrófico derivado do cérebro; Ca^{2+} , íon de cálcio; Depol., despolarização; EPO, eritropoetina; GABA, ácido gama-aminobutírico; HSP, proteína de choque térmico; IL, interleucina; iNOS, óxido nítrico sintetase induzida; K^+ , íon de potássio; ROS, espécies reativas de oxigénio; VEGF, fator de crescimento endotelial vascular

Os astrócitos oferecem suporte estrutural e metabólico aos neurónios e contribuem para a formação e manutenção da BHE (13,18). Perante um AVC, os astrócitos tornam-se reativos, e contribuem para a formação de uma cicatriz glial que isola a área lesionada. Nesta fase, os astrócitos contribuem para a exacerbação da lesão neuronal (11). Em contraste, posteriormente a esta fase deletéria, os astrócitos regulam muitos fatores neurotróficos como a neurotrofina 1 e a pentraxina 3, responsáveis pela cicatrização da lesão (13,18).

O comprometimento da integridade da BHE também constitui o fator chave inicial na patofisiologia do AVC. A disfunção da BHE resulta da hipóxia e disponibilidade aumentada de citocinas locais que desencadeiam disrupção das ligações intercelulares, devido à intensificação da expressão de MMP-2 e MMP-9. Ocorre diminuição da expressão de proteínas de zona de oclusão (ZO-1), ocludina e claudina-5 em células endoteliais, proteólise dos componentes do citoesqueleto, polimerização disfuncional da actina e formação de fibras de stress, alterando a permeabilidade celular da BHE(17,23). As células imunes, iões e outros compostos nocivos passam a mover-se livremente através da BHE e surge um aumento da PIC, devido à interrupção do fluxo sanguíneo, no AVCI, e ao edema cerebral, no AVCH, por disrupção dos canais de água, designados de aquaporinas (13,18,22).

2.5 Tratamento

No AVCI, o suporte inicial inclui o controle rigoroso da glicemia (140-180 mg/dL), temperatura (antipiréticos/arrefecimento em caso de pirexia) e tensão arterial (6). Os tratamentos disponíveis são: trombólise endovenosa com rt-PA, trombectomia mecânica e terapia antiplaquetária com ácido acetilsalicílico (300 mg/dia na fase aguda), exceto em candidatos a trombólise ou com indicação para anticoagulação (4,24).

No AVCH, a abordagem inicial foca-se no controle da hipertensão arterial (HTA) (definida por pressão arterial sistólica <140 mmHg nas 6h iniciais com labetalol), diabetes *mellitus* (DM), coagulopatias e gestão da PIC elevada (elevação da cabeceira, evitar estímulos externos, manitol 20%, drenagem de líquido cefalorraquidiano (LCR), ventilação mecânica e cirurgia, se necessário). A cirurgia está indicada para: hematomas >3 cm na fossa posterior ou hemisfério não dominante, hemorragias cerebelosas >3 cm, compressão do tronco ou hidrocefalia; hematomas lobares volumosos (>30 cm³) próximos ao córtex (<1 cm); deterioração neurológica (Glasgow 9-12) em boas condições clínicas (craniotomia); hidrocefalia na TC; hemorragia ventricular (derivação externa); hemorragia subaracnóidea (embolização com "coils" em 72h); malformações arteriovenosas hemorrágicas (ressecção/embolização) (6,25).

Apesar dos tratamentos atualmente disponíveis para o AVC representarem avanços significativos na medicina de emergência, estes enfrentam importantes questões sobre as suas limitações e a sua aplicação prática. A trombólise endovenosa com rt-PA é, sem dúvida, um marco na gestão do AVCI, permitindo uma dissolução eficaz do trombo e recanalização vascular quando administrada precocemente. Contudo, o sucesso desta abordagem depende de uma janela terapêutica muito limitada, de apenas 4,5 horas após o início dos sintomas. Este intervalo temporal estreito, associado a atrasos frequentes no reconhecimento dos sinais do AVC e na transferência rápida dos doentes para centros especializados, exclui um número significativo de doentes. Além disso, o risco de complicações graves, como a hemorragia intracerebral, é elevado, especialmente em grupos mais vulneráveis, como idosos ou doentes com HTA não controlada ou distúrbios de coagulação (26).

A trombectomia mecânica, por outro lado, oferece uma solução eficaz para doentes com oclusões em grandes vasos cerebrais, como a artéria cerebral média (ACM). Este procedimento tem demonstrado elevada eficácia na recanalização, mesmo em doentes que ultrapassaram a janela temporal da trombólise, desde que ainda apresentem uma zona de penumbra cerebral viável. Porém, a sua aplicação está limitada a doentes que cumpram

critérios rigorosos, como a anatomia favorável e a identificação radiológica de tecido cerebral potencialmente recuperável. Acresce que a trombectomia exige infraestruturas altamente especializadas e equipas treinadas, o que resulta numa oferta limitada a centros de referência. Esta realidade cria desigualdades geográficas no acesso ao tratamento, particularmente em regiões rurais ou com recursos insuficientes, levantando preocupações quanto à equidade na prestação de cuidados (26).

Já a neurocirurgia, como a craniectomia descompressiva em casos de edema cerebral grave ou intervenções para hemorragias intracranianas, desempenha um papel essencial em situações específicas. Estas abordagens podem reduzir significativamente a mortalidade e melhorar os resultados funcionais em casos adequados, mas envolvem riscos elevados e critérios de exclusão rígidos, baseados no estado funcional prévio do doente, extensão das lesões e estabilidade clínica (26).

Apesar das vantagens inegáveis destas terapias, subsistem limitações transversais. Nenhuma delas é capaz de intervir eficazmente na mitigação das consequências da crise metabólica cerebral desencadeada pela isquemia e pela reperfusão sanguínea, tais como a excitotoxicidade, o *stress* oxidativo e a resposta inflamatória exacerbada, que contribuem para a progressão do dano cerebral secundário. Além disso, os critérios de exclusão necessários para garantir a segurança e eficácia do tratamento reduzem significativamente o número de doentes elegíveis, evidenciando lacunas importantes nas opções terapêuticas atuais (27).

Nesse sentido, a investigação tem vindo a concentrar-se no desenvolvimento de estratégias inovadoras, como a aplicação de CE, que demonstram um potencial promissor na abordagem ao AVC (27).

3. Células estaminais

Desde a década de 1990, as terapias celulares baseadas em CE têm sido alvo de intensa investigação. Apesar dos desafios ainda a superar, a terapia com CE destaca-se como uma estratégia terapêutica promissora e inovadora da medicina regenerativa, com potencial para redefinir o paradigma atual do tratamento do AVC. Diferenciam-se das terapias convencionais, por neutralizarem os processos patológicos subjacentes ao AVC, estimularem simultaneamente a regeneração e recuperação tecidual e permitirem uma intervenção em fases mais avançadas da recuperação, ultrapassando as limitações impostas pelos critérios de exclusão e pela janela terapêutica estreita das abordagens tradicionais (21).

3.1 Definição e classificação

As CE estão presentes em embriões, diferenciam-se em todos os tecidos e órgãos do corpo, e no ser humano adulto, fornecem uma capacidade de renovação dos órgãos (28). Nos tecidos e órgãos adultos, as CE residentes, estão sob um estado quiescente, aspecto fundamental para a manutenção desta população de células em locais específicos e com capacidade de células diferenciadas ao longo da vida (14).

As CE classificam-se com base em 2 critérios: a origem e o potencial de diferenciação. Apresentam várias "potências", restringindo assim o tipo de células que podem originar, conforme ilustrado na figura 4 (14,28).

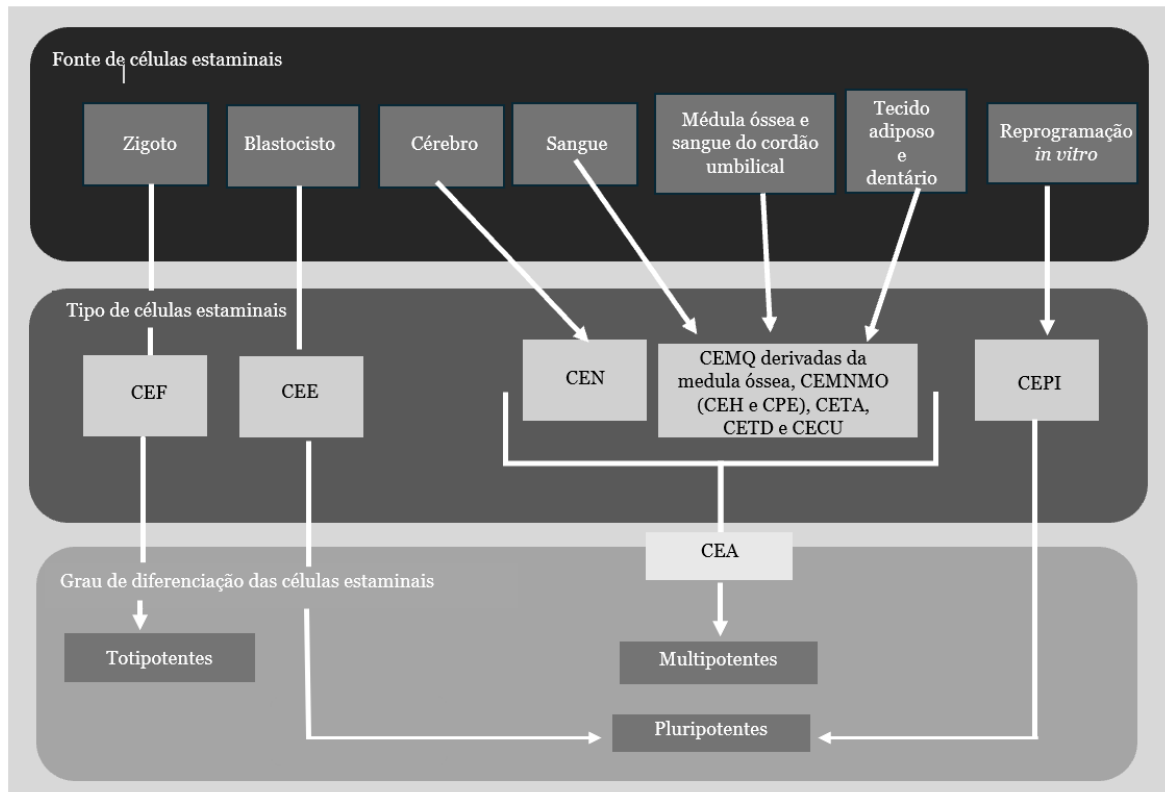


Figura 4- Tipos de CE de acordo com o seu grau de diferenciação e origem. Adaptado do artigo (29). CEA, células estaminais adultas; CETA, células estaminais derivadas de tecido adiposo; CECU, células estaminais derivadas do cordão umbilical; CEE, células estaminais embrionárias; CEF, células estaminais fetais; CEH, células estaminais hematopoéticas; CEMNMO, células estaminais mononucleares da medula óssea; CEMQ, células estaminais mesenquimais; CEN, células estaminais neurais; CEPI, células pluripotentes induzidas; CPE, células progenitoras endoteliais

Seguindo o processo de divisão e especialização das CE, existem as CE totipotentes provenientes das fases primordiais do desenvolvimento humano (zigoto) e consideradas as células mais indiferenciadas. Seguidamente, as CE pluripotentes, com origem no embrião (blastocisto) e capazes de se diferenciar em qualquer tecido das 3 linhagens embrionárias. Posteriormente, as CE multipotentes, presentes no indivíduo adulto, diferenciam-se apenas em células de um tipo de tecido ou órgão. Sucedem-se as CE oligopotentes capazes de originar duas ou mais linhagens celulares de apenas um tipo de tecido. De seguida, as CE unipotentes, habilitadas apenas para a formação de uma linhagem celular de um único tipo de tecido. Por fim, inclusive há pouco tempo, descobriu-se que a diferenciação das CE não é estritamente unidirecional e, por isso, pode ser modificada em laboratório, a partir da reprogramação de células diferenciadas, produzindo as CEPI (29,30).

3.2 Fisiologia e propriedades

As CE exibem um enorme potencial para a regeneração e recuperação de células e/ou tecidos danificados. Detêm a capacidade de proliferar e originar células idênticas a si (autorrenovação) e podem sofrer divisões assimétricas e simétricas, seguido da diferenciação em células especializadas (14,29).

Abordagens terapêuticas para o AVC com base nas CE incluem o transplante ou modulação endógena das CE residentes nos tecidos (31). Os mecanismos de terapia com CE podem ser categorizados em duas formas distintas: a ação direta, caracterizada pela migração celular para a área de enfarte, e a ação indireta, caracterizada pela melhoria do microambiente local por meio de fatores parácrinos, favorecendo a angiogênese, neurogênese endógena e neuromodulação e a modulação da resposta inflamatória (15). Estas principais funções no AVC são sumariadas na figura 5.

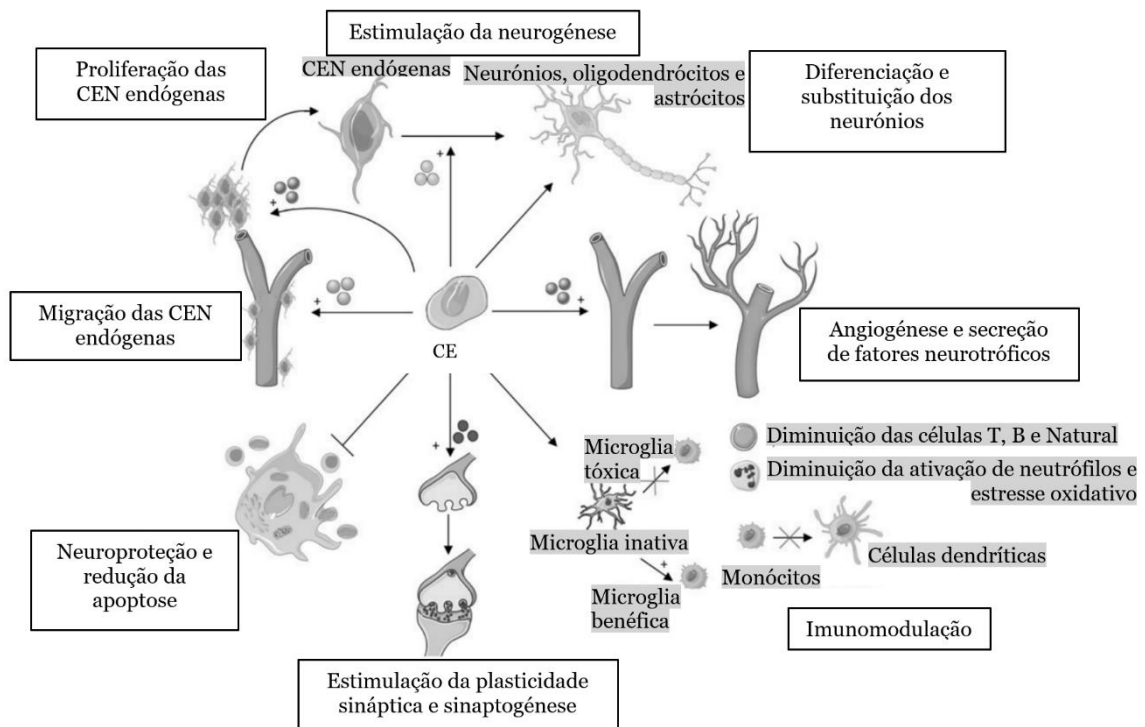


Figura 5- Funções das CE. Adaptada dos artigos (32,33). CE, células estaminais; CEN, células estaminais neuronais

As CEN endógenas e exógenas desempenham papéis distintos e complementares na regeneração neural, particularmente no contexto de lesões cerebrais, como o AVC (15). As CEN endógenas são CE nativas do cérebro, localizadas em zonas específicas onde ocorre a neurogênese, como a zona subventricular (ZSV) dos ventrículos laterais e a zona subgranular (ZSG) do giro dentado no hipocampo. Estas células são responsáveis pela formação natural de novos neurónios ao longo da vida (15).

A migração das CE endógenas para a área a regenerar no cérebro após um AVC é mediada por um conjunto de quimiocinas e recetores especializados, que atuam em resposta às condições de hipóxia. Logo após o AVC, a hipóxia estimula a expressão do fator HIF-1, que, por sua vez, aumenta a libertação de EPO. A EPO promove a expressão do fator BDNF, facilitando a migração quimiotática das CE para a zona lesada (15).

O HIF-1 desempenha também um papel crucial na ativação do SDF-1/CXCL12 e na expressão do recetor de quimiocina (CXCR4) na membrana plasmática das CE. A interação entre o SDF-1 e o CXCR4 desencadeia a ativação de várias vias de sinalização, como a via da fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K), da serina/treonina quinase (Akt), da quinase regulada por sinal extracelular (ERK1/2), da quinase c-Jun N-terminal (JNK) e da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK), que em conjunto intensificam a migração das CE para o local do dano (44). Além disso, a lesão isquémica ativa os recetores TLR4, que têm um papel essencial na expressão precoce de SDF-1 e na rápida libertação de BDNF, facilitando a migração das CE endógenas para as áreas afetadas (15).

A hipóxia associada ao AVC também induz a secreção de VEGF, fator responsável pela formação de novos vasos sanguíneos que se ramificam a partir dos capilares pré-existentes. Estes vasos recém-formados permitem fornecer novamente oxigénio e nutrientes à área lesionada, bem como promover o crescimento axonal e neurogénese endógena (15). Estes capilares funcionam como a estrutura guia para a zona lesionada, por meio da ligação da integrina $\beta 1$, expressa pelos neuroblastos, à laminina, expressa nos vasos sanguíneos. As CE aderem aos vasos sanguíneos e juntamente com as células endoteliais destes, aumentam a secreção de uma variedade de fatores neurotróficos, incluindo VEGF, BDNF, GDNF, Ang-1 e Ang-2, IGF-1 e bFGF, estimulando a angiogénese e a reparação do tecido (20,34). Adicionalmente, fatores quimiotáticos inflamatórios e citocinas expressas pelas áreas do cérebro lesado, como a proteína quimioatraente de monócitos 1 (MCP-1), a proteína inflamatória de macrófagos 1-alfa (MIP-1 α) e a IL-8, podem intensificar a migração das CE para as regiões enfartadas (15). Alguns destes mecanismos celulares e moleculares estão sumariados na figura 6.

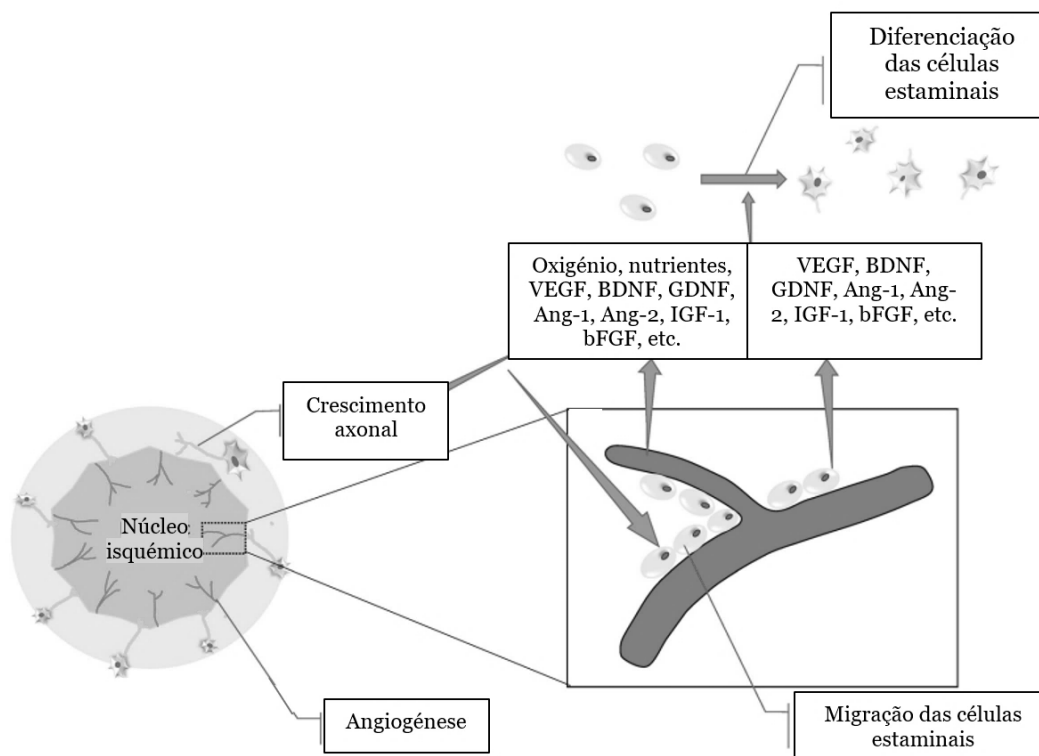


Figura 6- Mecanismos envolvidos na angiogênese, neurogênese e crescimento axonal. Adaptada do artigo (15). Ang, angiopoietina; BDNF, fator neurotrófico derivado do cérebro; bFGF, fator de crescimento fibroblástico básico; GDNF, fator neurotrófico derivado da linhagem das células gliais; IGF-1, fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1; VEGF, fator de crescimento endotelial vascular

Após a proliferação e migração, as CE endógenas diferenciam-se em diferentes neurónios maduros de acordo com o microambiente local em que estão localizadas, para reparar áreas cerebrais danificadas (15). No entanto, após um AVC, a capacidade regenerativa das CEN endógenas é insuficiente para substituir os neurónios e conexões nervosas perdidos, uma vez que a taxa de sobrevivência dos novos neurónios é bastante baixa. Esta incapacidade resulta numa recuperação parcial e pouco eficaz, insuficiente para compensar os danos extensivos causados pelo AVC (15). Numerosos estudos pré-clínicos têm explorado estratégias destinadas a potenciar a atividade das CE endógenas, recorrendo, nomeadamente, à manipulação genética, à aplicação de moléculas com propriedades pró-neurogénicas, entre outras abordagens (15). Contudo, dado que estas estratégias ainda não foram suficientemente investigadas no contexto clínico, a presente revisão centrar-se-á exclusivamente na utilização de células estaminais exógenas.

As CEN exógenas são aplicadas através de transplantes ou infusões, o que permite que atuem de forma mais robusta e controlada na reparação neuronal. Além disso, as CEN exógenas contribuem para a restauração da integridade da BHE e libertam fatores de crescimento, como o BDNF, que estimulam a proliferação e a migração de neuroblastos

gerados a partir das CEN endógenas (15,20), a angiogênese (VEGF, Ang 2) e a neuroplasticidade (integrina $\beta 1$). A sua libertação no ambiente circundante realiza-se por meio de permeação direta ou vesículas extracelulares (EV), como os exossomas ou as microvesículas. As EV servem como mediadores, participando na comunicação intercelular e nas mudanças epigenéticas e modificações funcionais de células vizinhas ou distantes, através da transferência de moléculas pequenas de ácido ribonucleico (miRNA) e proteínas funcionais (26,31). (figura 7)

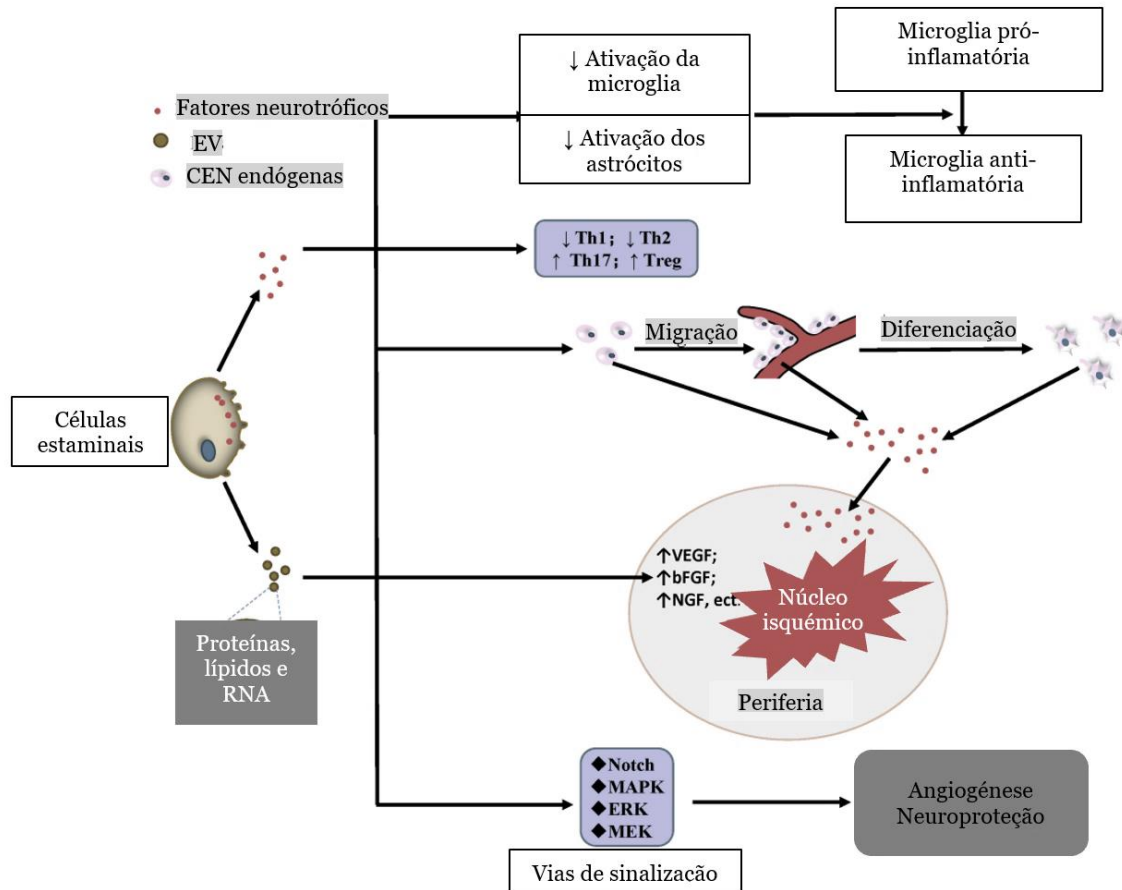


Figura 7-Mecanismos envolvidos na secreção de fatores protetores celulares. Adaptada do artigo (15). ↑, aumento; ↓, diminuição; bFGF, fator de crescimento fibroblástico básico; CEN, células estaminais neurais; ERK, quinase regulada por sinal extracelular; EV, vesículas extracelulares; MAPK, proteína quinase ativada por mitógeno; MEK, quinase ativadora de MAP quinase; miRNA, moléculas pequenas de ácido ribonucleico; NGF, fator de crescimento nervoso; RNA, ácido ribonucleico; Th1, Th2, Th17, células T CD4⁺; Treg, células T reguladoras; VEGF, fator de crescimento endotelial vascular

Assim, a introdução de CEN exógenas revela-se uma abordagem mais eficaz para a reparação dos tecidos neurais danificados, uma vez que essas células oferecem suporte estrutural e funcional nas áreas afetadas, ajudando não só na recuperação das conexões neuronais, mas também na proteção dos neurónios remanescentes. Este potencial terapêutico explica a crescente realização de ensaios clínicos destinados a avaliar a eficácia e segurança da aplicação das CE em diferentes patologias neurológicas (35).

Neste contexto, a presente revisão irá aprofundar os benefícios, avanços e desafios associados à terapia celular com CE exógenas, iniciando-se com uma análise detalhada das vias de administração destas células e dos fatores que influenciam a sua viabilidade, distribuição e integração nos tecidos-alvo. Estes aspetos são fundamentais para otimizar as estratégias terapêuticas e continuam a constituir um dos grandes focos de investigação na área da medicina regenerativa (35).

3.3 Administração de células estaminais

3.3.1 Modos de administração

As vias de administração desempenham um papel crucial na eficácia, segurança e nos resultados terapêuticos, pois influenciam diretamente a biodistribuição, sobrevivência e funcionalidade das CE no organismo após um AVC (36,37). Fatores como a especificidade do tecido-alvo, o tipo de CE utilizada, a dosagem, o momento da administração, o estado clínico do paciente e os potenciais efeitos adversos são determinantes na escolha da via de injeção que proporciona a melhor relação risco-benefício (37).

Os tipos de aplicação de CE dividem-se em dois grandes grupos: administração por via parenteral, considerada menos invasiva, mais segura e mais confortável para o paciente, e por via local, associada a maior eficiência, eficácia e menor segurança. A via parenteral abrange diversas modalidades, como a intra-arterial (IA), a intravenosa (IV), a intraperitoneal (IP) e a intranasal (IN). Por sua vez, a administração local inclui principalmente as modalidades intracerebral (IC) e intratecal/intraventricular (IT). Cada uma dessas vias de infusão apresenta vantagens e desvantagens, conforme detalhado na tabela 2, o que influencia a escolha da abordagem mais adequada para cada caso. Dentro dessas opções, a via IA e IT destacam-se por serem as mais estudadas e amplamente incluídas nos estudos clínicos (31,36).

Tabela 2- Vantagens e desvantagens dos diferentes tipos de administração de CE.

Via de administração	Vantagens	Desvantagens/Limitações	Outras informações
<p>IV (Veias: infusão através de cateter venoso central ou periférico)</p>	<p>Segura; Eficaz e de fácil administração; Efeito e ação generalizada; Invasão mínima;</p>	<p>Necessidade de doses elevadas de CE; Capacidade limitada para atravessar a BHE; Retenção de CE em órgãos periféricos (fígado, pulmões, baço e rim); Risco elevado de imunorrejeição; Biodistribuição insuficiente até ao cérebro; Complicações tromboembólicas pulmonares e cerebrais; Dependente do fluxo sanguíneo; Exacerbação da resposta imune inata (maior probabilidade de piroxia ou doença do enxerto contra o hospedeiro).</p>	<p>Método de administração mais amplamente usado; Compatível com a administração concomitante de outros tratamentos iniciais após um AVC.</p>
<p>IA (Artérias: infusão através da punção da artéria carótida, femoral ou radial)</p>	<p>Segura; Eficaz; Administração direta no cérebro, aumentando o número de CE disponíveis; Evita retenção nos órgãos periféricos (fígado, pulmões, baço e rim); Proporciona melhor integração celular em comparação com a via IV.</p>	<p>Requer doses reduzidas de CE; Capacidade limitada para atravessar a BHE; Risco elevado de oclusão vascular devido ao tamanho das células e/ou à formação de microêmbolos; Necessita de radiologista intervencionista especializado; Risco de hemorragia, especialmente com altas velocidades de perfusão; Risco elevado de imunorrejeição; Altas mortalidade e morbidade associadas à técnica.</p>	<p>Requer anestesia local e monitorização do paciente durante todo o processo; Uso de microagulhas reduz mortalidade e complicações em comparação com cateteres.</p>

Potencial terapêutico de células estaminais no AVC

<p>IT (Infusão das CE no espaço intratecal, entre as meninges aracnoide e a pia-máter)</p>	<p>Entrega direta e distribuição das CE através do LCR.</p>	<p>Requer doses reduzidas de CE; Técnica invasiva com maior risco de complicações; Potencial de agregação celular; Segurança reduzida (necessidade de cirurgia); Provável associação a pirexia e sinais meníngeos; Risco elevado de imunorrejeição; Possível hidrocefalia e aumento da PIC.</p>	<p>Método de injeção menos complexo em relação ao da via IC.</p>
<p>IC (Infusão numa área cerebral específica através de catéter/agulha, após perfuração do crânio)</p>	<p>Infusão direta de CE no local danificado pelo AVC; Alta biodistribuição local; Elevada concentração de CE na região lesionada pelo AVC.</p>	<p>Necessidade de doses reduzidas de CE; Técnica altamente invasiva; Risco elevado de imunorrejeição; Baixa taxa de sobrevivência celular no microambiente hostil; Potencial para défices neurológicos, convulsões, síncope e hemorragias cerebrais.</p>	<p>Exige anestesia geral, vigilância pós-operatória rigorosa e localização estereotáxica para navegação intraoperatória.</p>
<p>IN (Nasal: pelas vias neuronais olfativas e placa cribiforme)</p>	<p>Rápida biodistribuição de CE ao cérebro.</p>	<p>Requer doses reduzidas de CE; Potencial para agregação celular; Risco elevado de imunorrejeição; Biodistribuição limitada até ao tecido cerebral.</p>	<p>Necessita de estudos adicionais para validar eficácia com diferentes tipos de CE.</p>
<p>IP (Infusão na cavidade peritoneal através de catéter/agulha)</p>	<p>Técnica pouco invasiva e de fácil acesso; Mais confortável para o paciente.</p>	<p>Biodistribuição até ao cérebro comprometida; Risco elevado de imunorrejeição; Retenção de CE nos órgãos periféricos (fígado, pulmões, baço e rim).</p>	<p>Aplicação restrita devido à ausência de dados suficientes que comprovem eficácia e segurança significativas.</p>

AVC, acidente cerebrovascular; BHE, barreira hematoencefálica; CE, células estaminais; IA, intra-arterial; IC, intracerebral; IN, intranasal; IP, intraperitoneal; IT, intratecal; IV, intravenosa; LCR, líquido cefalorraquidiano; PIC, pressão intracraniana

3.3.2 Fatores condicionantes

Dose, número de injeções e velocidade de injeção

Determinar índices terapêuticos apropriados para o transplante de CE é vital, pois dosagens insuficientes não produzem efeitos terapêuticos e quantidades elevadas apresentam maiores riscos e efeitos adversos, como tumorigênese e formação de coágulos (35,38). A prioridade deve ser alcançar o maior benefício com a menor dose possível de células viáveis e a menor toxicidade (39).

A dose de CE aplicada em ensaios clínicos pode diferir amplamente de 10^6 a 10^9 CE. Considerando o fácil acesso e a menor invasividade das vias IV e IA, a dose celular pode chegar a mais de 10^8 CE, enquanto nas vias IT e IC a dose a infundir não deve ultrapassar as 10^7 CE (31,38). É importante referir que certas vias de administração, notavelmente a via IV, requerem doses mais altas de CE e injeções repetidas, devido à maior perda destas durante o trajeto até ao cérebro, por retenção nos órgãos periféricos (pulmão e fígado) (39).

Enquanto as vias de administração local, a IC e a IT, como permitem injeção direta na área lesionada, necessitam de doses menores (15). Junto com o número de células, a velocidade de infusão das mesmas também é crítica. Uma alta velocidade, valores superiores a 1 ml/min, podem levar a micro derrames, enquanto uma velocidade de infusão na ordem dos 0,2 ml/min é considerada como segura (39).

Tempo

Atualmente, nem todos os pacientes são elegíveis para tratamento de reperfusão devido à estreita janela de tempo, embora a trombectomia mecânica e a administração de rt-PA sejam amplamente utilizadas na prática clínica. A utilização das CE deverá seguir assim uma lógica de proteção e recuperação do paciente consoante a evolução que este tiver ao longo do tempo (35).

Em particular, nas fases subaguda (1 semana a 1 mês) e crónica (mais de 1 mês), após um AVC, os mecanismos de reparação neuronal, como a neurogênese, a angiogênese e a plasticidade neuronal, são privilegiados pois precisam de mais tempo para se estabelecer, daí ser dada prioridade às vias IT e IC, para se conseguir uma substituição neuronal mais rápida e eficaz, privilegiando a ação neuroregenerativa (15,38). Assim, a utilização das CE em fases mais tardias do AVC mostra-se particularmente vantajosa, uma vez que, nestas fases, o foco está na regeneração tecidual e na recuperação funcional a longo prazo.

Local do transplante

No cenário agudo após um AVC, é preferível injetar as CE na zona da penumbra, onde o ambiente viável está presente e onde pode ocorrer angiogênese (27,40). Contudo, na fase crônica devido à cicatrização glial, a entrega de CE nas áreas periféricas é dificultada (38). Em alternativa, a fim de evitar zonas citotóxicas nas áreas de enfarte, a entrega das CE pode ser realizada numa zona distante da área do enfarte. O lado contralateral à lesão no cérebro é uma opção exequível, pois é aproveitado o ambiente saudável e bem vascularizado para potenciar a sobrevivência das CE injetadas (27).

Alogénico vs. Autogénico

O transplante autólogo e alogénico de CE representam duas estratégias críticas na medicina regenerativa, e a sua aplicação em pacientes com AVC é uma área de interesse crescente (41). No transplante autólogo, as CE são colhidas do próprio paciente, como da medula óssea ou do sangue periférico. Essas células, após serem processadas, são reintroduzidas no corpo do paciente. Esta abordagem é valorizada principalmente pelo seu menor risco de rejeição imunológica, uma vez que as células se originam do paciente (37,41).

Por outro lado, o transplante alogénico envolve o uso de CE de um doador, que pode ser um parente ou um doador compatível não relacionado. O estabelecimento de um banco de células alogénicas permite o transplante a qualquer momento após o AVC, incluindo nas primeiras horas. Estes tipos de CE já foram selecionados para serem seguras para o paciente e preferencialmente de doadores jovens saudáveis, estando prontas de imediato para uso. No entanto, no caso do aloenxerto, existe o risco de resposta imunológica por parte do hospedeiro, podendo resultar em rejeição do transplante (37,41).

Em ambas as abordagens, as CE precisam de ser expandidas em meio de cultura durante semanas antes de obter quantidades suficientes e eficazes para o transplante, impedindo que sejam usadas na fase aguda em que a neuroproteção é essencial. Além disso, as potenciais alterações cromossómicas não garantem que, no final, sejam fiáveis para utilização como tratamento para o paciente (37,41).

4. Aplicações terapêuticas com células estaminais

A terapêutica com CE pode ser dividida em endógena e exógena. Contudo, este capítulo irá focar exclusivamente nas terapêuticas exógenas, que envolvem a transferência de CE, autólogas ou alogênicas, diretamente para a área da lesão cerebral, seja por via IT, IC ou sistêmica. A opção por analisar apenas as terapias exógenas deve-se ao facto de que a maioria dos estudos pré-clínicos e clínicos disponíveis se concentram nesta abordagem, demonstrando o seu potencial terapêutico e eficácia no tratamento do AVC (26).

4.1 Células estaminais embrionárias

As CEE são pluripotentes, ao contrário das CEA (42). A sua origem reside na massa celular interna do blastocisto, após 5-6 dias à ocorrência da fecundação e apresentam a capacidade de diferenciação nas 3 camadas germinativas primárias (ectoderme, mesoderme e endoderme) (14,28). Estas células podem ser mantidas em cultura, sob microambientes específicos, num estado indiferenciado por um período prolongado. As células da camada celular interna do embrião são separadas do trofoblasto, presentes na camada externa, e transferidas para condições *in vitro* específicas para o desenvolvimento das várias linhagens germinativas. As CEE são identificadas pela presença de fatores de superfície (antígeno específico de estágio embrionário-1- SSEA-1, antígeno específico de estágio embrionário-3- SSEA-3, antígeno específico de estágio embrionário-4- SSEA-4, antígeno específico de traço 1-60- TRA-1-60, e antígeno específico de traço 1-81- TRA-1-81) e fatores de transcrição (fator de transcrição de ligação ao octâmero 4- Oct4, fator de transcrição SRY-box 2- Sox2, Nanog, fator 4 semelhante a Kruppel- Klf4, produto oncogénico de c-mielocitomatose- c-Myc) que as mantêm num estado indiferenciado (14,43).

Os resultados apresentados na tabela 3, evidenciam que as CEE administradas em modelos animais por via IC, potenciam a restauração de conexões sinápticas, redução do volume de enfarte e melhorias nas funções motoras. Estes efeitos são especialmente evidentes em intervenções precoces, realizadas até 24 horas após o AVC, sugerindo que o momento da administração é um fator crítico para maximizar os benefícios terapêuticos. As células

precursoras neuronais derivadas de CEE reforçam esta tendência, apresentando efeitos positivos na diferenciação neuronal e na recuperação da integridade cerebral.

Em modelos humanos, as células precursoras neuronais derivadas de CEE, administradas por via IV, destacaram-se pela sua capacidade em promover a plasticidade neuronal e aumentar a densidade de sinapses funcionais. Simultaneamente, os estudos realizados mostram que estas células podem proporcionar melhorias neurológicas mesmo quando administradas semanas após o AVC, traduzindo-se em maior mobilidade e redução nos *scores* da escala *National Institutes of Health Stroke Scale* (NIHSS)¹, destacando os efeitos neuroregenerativos das CEE. Por fim, as células estaminais derivadas de tecido embrionário revelaram benefícios complementares, os quais sugerem que estas células podem atuar em múltiplos mecanismos de reparação, tanto ao nível vascular como neuronal, o que amplia o seu potencial terapêutico (44–57).

¹ Escala clínica padronizada utilizada para avaliar os défices neurológicos (gravidade) relacionados com um AVC; estratificar o prognóstico; monitorizar a recuperação ou deterioração cerebral; e auxiliar na decisão terapêutica (113).

Tabela 3- Estudos pré-clínicos e clínicos realizados com CEE para o tratamento de AVC.

Tipo de CE	Modelo	Administração	Resultados	Efeitos adversos	Refs.
CEE alogénicas	Modelo animal (roedores)	IC (3 horas após a AVC induzido por oclusão da ACM)	Restauração das conexões sinápticas, redução do volume de enfarte, melhoria da função motora e desempenho neurológico e aumento da sobrevivência neuronal.	Inflamação no local da injeção	(47)
		IC (1 semana após AVC induzido por oclusão da ACM)	Melhoria da função dopaminérgica, aumento da sobrevivência neuronal e redução dos sintomas motores associados à disfunção dopaminérgica.	N.A	(46)
			Diferenciação em neurónios maduros, melhoria da função motora, redução da área de enfarte e aumento da sobrevivência neuronal.	N.A	(45)
Células precursoras neuronais derivadas de CEE		IC (24 horas depois do AVC induzido por oclusão da ACM)	Diferenciação celular, melhoria da função motora e cognitiva, redução da área de enfarte e melhoria da integridade cerebral.	Sinais inflamatórios no local de injeção e tecido cicatricial na área transplantada.	(48)
			Potenciação da diferenciação neuronal, melhoria significativa na recuperação motora e funcional e redução da área de enfarte.	Sinais de inflamação no local de infeção e tecido cicatricial na área transplantada.	(49)
Células progenitoras neurais humanas derivadas de CEE		IV (3 horas após AVC induzido pela ACM)	Melhoria da função motora e potenciação da plasticidade e número de sinapses axonais.	<u>N.A</u>	(50)
	IV (1 semanas após AVC induzido pela ACM)	Promoção da proliferação celular e aumento da densidade dos vasos sanguíneos.	Inflamação no local da injeção	(57)	

Potencial terapêutico de células estaminais no AVC

		IN (1 dia após AVC induzido pela ACM)	Recuperação funcional neurológica e redução da área lesada.	Irritação nasal	(51)
Células progenitoras neurais humanas derivadas de tecido embrionário	Modelo animal (roedores)	IC (24 horas após AVC induzido pela ACM)	Redução dos marcadores inflamatórios (IL-1 β e TNF- α) e melhoria da função neurológica.	N.A	(52)
		IV (24 horas após AVC induzido pela ACM)	Aumento do número de neurónios e da velocidade de condução nervosa nos axónios.	Inflamação no local da injeção	(53)
			Aumento da função motora e comportamental e potenciação da neurogénese.	N.A	(54)
		Células precursoras neuronais derivadas de CEE	Modelo humano	IV (2 a 4 semanas após o AVC)	Melhoria da função neurológica e das capacidades de mobilidade dos pacientes.
Células progenitoras neurais humanas derivadas de tecido embrionário	IV (3 a 6 meses após o AVC)	Aumento da função motora e melhoria da função neurológica.		3 pacientes com cefaleia e 2 com pirexia.	(55)
	IC (6 meses ou mais após o AVC)	Recuperação da função motora e melhoria da qualidade de vida.		2 pacientes com aumento da PIC.	(56)

ACM, artéria cerebral média; AVC, acidente vascular cerebral; CE, células estaminais; CEE, células estaminais embrionárias; IC, intracerebral; IL, interleucinas; IN, intranasal; IV, intravenosa; N.A, não apresentados; PIC, pressão intracraniana; Refs., referência(s); TNF- α , fator de necrose tumoral alfa

4.2 Células estaminais adultas

4.2.1 Células estaminais mesenquimais

As CEMQ são CE multipotentes amplamente estudadas devido à sua segurança, facilidade de colheita e capacidade de diferenciação em linhagens mesodérmicas, endoteliais e ectodérmicas. Estão presentes em diversos tecidos, como a medula óssea, a gelatina de *Wharton* do cordão umbilical, o tecido adiposo, os músculos, a polpa dentária e o baço, expressando marcadores de superfície específicos como o CD73, CD90 e CD105. A sua imunogenicidade quase inexistente, resultante da ausência de expressão de antígenos do complexo principal de histocompatibilidade, torna-as uma ferramenta segura e versátil (28,58).

Entre as diversas fontes de CEMQ, destacam-se as CEMQ derivadas da medula óssea, que representam uma das fontes mais tradicionais e bem caracterizadas. Estas células possuem uma elevada capacidade de autorrenovação e diferenciação, sendo amplamente utilizadas em ensaios pré-clínicos e clínicos, sobretudo no âmbito de terapias regenerativas e imunomoduladoras. Adicionalmente, as CEMQ, dependendo da sua origem acabam por se categorizar em outros subtipos especializados, que incluem por exemplo as CETA, as CETD e as CECU, estas últimas abordadas numa secção adiante, entre outras.

As CETA constituem uma subpopulação obtida a partir do tecido adiposo através de lipoaspiração. Estas células são altamente abundantes, de fácil acesso e rapidamente cultivadas para transplantes autólogos, sem implicações éticas. Tal como as CEMQ, expressam marcadores semelhantes e têm a capacidade de se diferenciar em osteócitos, condroblastos e adipócitos (59). As CETD, também inseridas no grupo das CEMQ, constituem uma fonte promissora de CE, sendo obtidas de dentes de leite ou terceiros molares, isoladas através de procedimentos minimamente invasivos, posicionando-se como um recurso acessível para futuras aplicações terapêuticas (40,43).

Dos estudos apresentados na tabela 4, depreende-se que as CEMQ derivadas da medula óssea no AVC demonstraram ser eficazes nas diferentes fases da administração. A aplicação precoce (até 6 horas) foi a que revelou melhores *outcomes*, uma vez que permitiu uma redução significativa da lesão cerebral e melhoria das funções imunomoduladoras, anti-inflamatórias e motoras. Em fases subagudas (24-72 horas), embora o impacto na diminuição da lesão seja menor, ainda há uma restauração funcional relevante. Já, em fases

crônicas (semanas a anos), observou-se uma recuperação motora, sensitiva e cognitiva moderadas (60–72).

Dos estudos em modelos humanos apresentados na tabela 4, depreende-se que mais de metade dos pacientes tratados com CETA apresentaram melhorias significativas na incapacidade neurológica funcional e redução do volume do infarto cerebral confirmada por técnicas de imagem. Em modelos animais sob CETA, observou-se uma redução do volume do infarto, um aumento de marcadores neuroprotetores como BDNF e TGF- β 1 e melhorias na memória e motricidade dos roedores. Estes achados indicam que as CETA promovem neuroproteção, regeneração neuronal e recuperação neurológica funcional (73–77).

Da análise dos últimos 3 estudos, presentes na tabela 4, destes estudos, foram ainda notáveis a capacidade de diferenciação em linhagens neuronais e gliais e a capacidade de neuroproteção e neuroplasticidade das CETD, com evidência de melhorias neurológicas funcionais a longo prazo. Apesar da baixa taxa de sobrevivência celular das CETD, a sua eficácia foi atribuída às suas propriedades parácrinas, que modularam a inflamação, estimularam a regeneração neuronal e favoreceram a cicatrização. Estes resultados reforçam o papel das CETD como uma alternativa eficaz em relação a outras fontes de CE, destacando o seu grande potencial terapêutico no tratamento de lesões e doenças neurológicas (78–80).

Tabela 4- Estudos pré-clínicos e clínicos realizados com CEMQ derivadas da medula óssea, CETA e CETD para o tratamento de AVC.

Tipo de CE	Modelo	Administração	Resultados	Efeitos adversos	Refs.
CEMQ derivadas da medula óssea	Modelo animal (roedores)	IV (24 horas após a indução por oclusão da ACM)	Redução das ROS, aumento da atividade da SOD, redução do dano hipocampal e diminuição dos mecanismos de apoptose.	N.A	(62)
		IT (imediatamente após a indução por oclusão da ACM)	Aumento na produção de IL-6, ativação de NFκB, redução do dano neuronal e melhoria da função motora.	N.A	(72)
		IV (24 horas após a indução por oclusão da ACM)	Potenciação da migração celular e diminuição do volume de enfarte.	N.A	(71)
		IT (dentro de 24 a 72 horas após a indução por oclusão da ACM)	Redução do volume de enfarte e melhoria da função neurológica (cognitiva, sensitiva, motora).	N.A	(61)
		IV (24 horas após a indução por oclusão da ACM)	Aumento da expressão de conexina-43, BMP-4, BMP-2 e sinaptofisina e redução do volume de enfarte.	N.A	(66)
		IV (24 horas após a indução por oclusão da ACM)	Aumento da expressão de marcadores neuronais (NeuN e β-III-tubulina), potenciação de efeitos tróficos e redução do volume do enfarte.	N.A	(64)
		IV (24 horas após a indução por oclusão da ACM)	Potenciação do metabolismo da glicose na área lesionada e redução do volume do enfarte.	Pirexia e alterações comportamentais (10% dos roedores).	(65)

Potencial terapêutico de células estaminais no AVC

		IV (24 horas após a indução por oclusão da ACM)	Potenciação da migração celular, diminuição dos processos inflamatórios e redução do volume do enfarte.	Pirexia e alterações comportamentais (15% dos roedores).	(63)
		IA (imediatamente às 6 horas e às 24 horas após a indução por oclusão da ACM)	Redução do volume de enfarte e melhoria da função neurológica (cognitiva, sensitiva, motora).	Hemiparesia	(60)
	Modelo humano	IC (administração única entre os 6 meses e os 5 anos após o AVCI)	Melhoria da função motora e coordenadora, capacidade perceptiva e sensitiva e potenciação da sobrevivência.	Convulsões e dor no local da injeção; Cefaleias e pirexia transitórias em alguns pacientes.	(70)
		IA (2 a 4 semanas após a indução por oclusão da ACM)	Melhoria da função motora (coordenação e equilíbrio).	Pirexia (25% dos pacientes), cefaleias (15% dos pacientes), e fadiga (10% dos pacientes).	(61)
		IT (dentro de 24 a 72 horas após a indução por oclusão da ACM)	Redução do volume de enfarte e melhoria da função neurológica.	Pirexia (15% dos pacientes) e desconforto temporário no local da infusão de CE (10% dos pacientes).	(69)
		IV (administração única entre os 6 meses e os 5 anos após AVC)	Melhoria da função neurológica (cognitiva, sensitiva, motora) e redução do volume de enfarte.	Pirexia (10% dos pacientes), cefaleias (15% dos pacientes), e mal-estar geral (10% dos pacientes).	(68)
CETA alogénicas	Modelo animal (roedores)	IV (24 horas após AVC induzido por oclusão da ACM)	Diminuição do volume de enfarte, melhoria da função neurológica e aumento dos marcadores de neuroproteção (BDNF e TGF- β 1).	Leve inflamação no local de injeção	(73)
		IV (24 horas após AVC induzido por oclusão da ACM)	Diminuição do volume de enfarte e melhoria da coordenação motora.	Sinais inflamação ligeiros no local da injeção	(77)
CETA autólogas		IA (3 dias após AVC induzido por oclusão da ACM)	Diminuição do volume de enfarte, diminuição da área de necrose cerebral e melhoria da função motora e memória espacial.	Reação inflamatória ligeira à injeção e breves episódios de elevação da pressão arterial.	(75)

Potencial terapêutico de células estaminais no AVC

CETA alógenicas		IV (2 semanas após AVC induzido por oclusão da ACM)	Diminuição do volume de enfarte e melhoria da função neurológica.	Dor ligeira no local de injeção e pirexia.	(74)
	Modelo humano	IV (após 2 semanas da ocorrência do AVC)	Melhoria do déficit neurológico e redução do volume de enfarte.	Cefaleias e febre transitórias.	(76)
CETD derivadas da polpa dentária (alógenicas)	Modelo animal (roedores)	IC (24 horas após AVC induzido por oclusão da ACM)	Diminuição da área de enfarte e melhoria da capacidade cognitiva e comportamental.	N.A	(78)
		IV (1 semana após AVC induzido por oclusão da ACM)	Redução significativa do edema cerebral, potenciação da migração das CE para a área de lesão e aumento da diferenciação neuronal.		(79)
		IV (4 semanas após AVC induzido por oclusão da ACM)	Aumento da sobrevivência neuronal, aumento dos marcadores de neurogênese e redução do volume de enfarte e edema cerebral.		(80)

ACM, artéria cerebral média; AVC, acidente vascular cerebral; BMP-2 e 4, proteínas morfogênicas ósseas; BDNF, fator neurotrófico derivado do cérebro; CE, células estaminais; CEMQ, células estaminais mesenquimais; CETA, células estaminais derivadas do tecido adiposo; CETD, células estaminais derivadas do tecido dentário; IL, interleucina; IA, intra-arterial; IC, intracerebral; IV, intravenosa; IT, intratecal; N.A, não apresentados; NeuN, antígeno neuronal nuclear; NFκB, fator nuclear kappa B; Refs., referência(s); ROS, espécies reativas de oxigênio; SOD, superóxido dismutase; TNF, fator de necrose tumoral; TGF-β1, fator de crescimento transformador beta

4.2.2 Células derivadas da medula óssea

Adicionalmente, a medula óssea fornece outra subpopulação relevante: as células estaminais mononucleares da medula óssea (CEMNO), um grupo heterogêneo que inclui as CEH e as CPE, constituindo um recurso rico e adaptável para aplicações clínicas (28,58).

As CEH, também multipotentes, são extraídas essencialmente da medula óssea, mas também do sangue periférico ou do sangue do cordão umbilical. Diferenciam-se em componentes celulares do sangue, como hemácias, megacariócitos, fatores solúveis de coagulação e células do sistema imunitário inato e adquirido (macrófagos, linfócitos e granulócitos), essenciais para a defesa do organismo (28,81).

As CPE, derivadas da medula óssea, circulam no sangue periférico em resposta a estímulos. Apresentam marcadores típicos de CEH, como CD34 e CD133, e possuem funções angiogênicas (proteína do recetor do VEGF2) e regenerativas (proteínas de adesão molecular, fator de *Von Willebrand* e caderina endotelial vascular), o recetor de tirosina quinase e a E-selectina (82). São classificadas em CPE precoces, se secretarem fatores de crescimento angiogênicos, e CPE tardias, se integrarem a vasculatura regeneradora, com características moleculares distintas dependendo do tempo de cultura (82).

Das CEMNO analisadas na tabela 5, as CEH promoveram melhorias significativas na recuperação funcional e na redução da gravidade do AVC, com maior eficácia quando administradas precocemente (dentro de 24 horas). Em fases crônicas, observaram-se benefícios como melhorias na força e tônus musculares, embora a segurança ainda exija mais dados viáveis e seguros. Resultados pré-clínicos indicaram que as CEH estimularam processos como a neurogênese, angiogênese e neuroplasticidade, além de reduzirem a inflamação e limitarem o alargamento do volume do enfarte. Ocorreu, simultaneamente, a detecção da libertação de fatores neuroprotetores e regenerativos pelas CEH, o que destaca seu potencial no tratamento do AVC (83–88). Em relação aos estudos das CPE apresentados, depreende-se que estas CE promoveram neuroproteção, modularam o microambiente cerebral e reduziram o volume do enfarte, favorecendo a recuperação funcional. Melhorias na destreza motora e nos *scores* de função neurológica e independência demonstraram sua eficácia terapêutica no AVC. Além disso, as CPE estimularam a angiogênese, melhorando o fornecimento de oxigênio, e a neurogênese, facilitando a reparação neuronal. Esses efeitos foram potencializados pela libertação de fatores parácrinos, que modularam os processos regenerativos (89–93)

Tabela 5- Estudos pré-clínicos e clínicos realizados com CMNMO (CEH e CPE) para o tratamento de AVC.

Tipo de CE	Modelo	Administração	Resultados	Efeitos adversos	Refs.
CEH CD4+	Modelo animal (roedores)	IV (48 horas depois do enfarte induzido por oclusão da ACM)	Potenciação da neurogênese, angiogênese e expressão de fatores tróficos neuroprotetores e diferenciação em neurónios, astrócitos e linhagens vasculares endoteliais.	N.A	(84)
		IC (7 dias após AVC induzido pela oclusão da ACM)	Potenciação da regeneração de neurónios, potenciação da angiogênese e neurogênese, melhoria da função neurológica, aumento da libertação de fatores neuroprotetores.	N.A	(86)
		IA (durante as 24 horas após o início dos sintomas provocados pelo AVC)	Diminuição do volume de enfarte e melhoria do défice neurológico, durante os 6 meses de seguimento.	Cefaleias, pirexia e 1 paciente com episódio de HTA transitória.	(88)
CEH alogénicas	Modelo humano	IV (24 horas depois do enfarte induzido por oclusão da ACM)	Redução da expressão de TNF e IL-1 β , diminuição da ativação da microglia, redução do volume de enfarte e melhoria da função neurológica.	N.A	(85)
CEH autólogas		IV (entre o 7 ^o e o 10 ^o dia após o AVC)	Potenciação da regeneração neuronal e melhoria do défice neurológico.	Pirexia, rubor no local da injeção e alterações temporárias na pressão arterial e frequência cardíaca.	(87)
		IT (Fase crónica do AVC- entre os 6 meses)	Melhoria do tónus, rigidez e força motora dos músculos e melhoria do défice neurológico.	Cefaleias transitórias e dor no local da injeção.	(83)

Potencial terapêutico de células estaminais no AVC

CPE autólogas		IV (24 horas após AVC induzido por oclusão da ACM)	Redução do volume de enfarte, aumento da neurogênese e melhoria significativa da função neurológica.	N.A	(93)
CPE alogénicas	Modelo animal (roedores)	IV (24 horas após AVC induzido por oclusão da ACM)	Redução do volume de enfarte, melhoria das funções motoras e neurológicas e aumento da densidade dos vasos sanguíneos.	N.A	(92)
		IV (24 horas após AVC induzido por oclusão da ACM)	Redução do volume de enfarte, melhoria das funções motoras e neurológicas e aumento da densidade dos vasos sanguíneos.	N.A	(89)
		IA (7 dias após AVC induzido por oclusão das ACM)	Redução do volume de enfarte, aumento do fluxo sanguíneo cerebral, aumento da densidade de vasos sanguíneos e melhoria significativa da função motora.	N.A	(90)
		IV (24 horas após AVC induzido por oclusão da ACM)	Potenciação da integração de CPE nos capilares cerebrais por ação parácrina, potenciação da preservação da morfologia mitocondrial nos neurónios afetados, observação de atividade pinocítica, redução do volume de enfarte e melhoria significativa da função neurológica.	N.A	(94)
		IV (7 dias após o AVC)	Melhoria significativa do défice neurológico.	N.A	(91)
CPE autólogas	Modelo humano	IV (7 dias após o AVC)	Melhoria significativa do défice neurológico.	N.A	(91)

ACM, artéria cerebral média; AVC, acidente vascular cerebral; CE, células estaminais; CEH, células estaminais hematológicas; CPE, células progenitoras endoteliais; IL, interleucina; IA, intra-arterial; IC, intracerebral; IV, intravenosa; IT, intratecal; N.A, não apresentados; Refs., referência(s); TNF, fator de necrose tumoral

4.2.3 Células estaminais derivadas do cordão umbilical

As CECU, isoladas do sangue do cordão e da gelatina de *Wharton*, apresentam uma combinação rica de propriedades mesenquimais, hematopoiéticas e endoteliais. Estas características pluripotentes tornam-nas uma fonte promissora para o tratamento de doenças regenerativas, como o AVC (95).

Dos estudos apresentados na tabela 6, com CECU em humanos, observou-se a estabilização da área de lesão e melhorias na qualidade de vida dos pacientes, reforçando a viabilidade clínica do uso deste tipo de células no tratamento de AVC. Em modelos animais, foi igualmente inferida a redução da área de lesão cerebral, destacando o potencial regenerativo e neuroprotetor das CECU. Adicionalmente, os estudos em roedores demonstraram uma redução das citocinas inflamatórias e das ROS, ressaltando anti-inflamatório deste tipo de CE (96–101).

Tabela 6- Estudos pré-clínicos e clínicos realizados com CECU para o tratamento de AVC.

Tipo de CE	Modelo	Administração	Resultados	Efeitos adversos	Refs.
CECU alogénicas	Modelo animal (roedores)	IV (24 horas depois de AVC induzido por oclusão da ACM)	Diminuição do volume de enfarte, melhoria do défice neurológico, redução dos níveis de citocinas inflamatórias (IL-6, TNF- α) e diminuição da expressão de células T.	N.A	(97)
		IC (48 horas depois de AVC induzido por oclusão da ACM)	Potenciação da sobrevivência de neurónios, redução da área de enfarte e redução da densidade de macrófagos hipertrofiados e células da glia pró-inflamatórias.		(101)
		IV (24 horas depois de AVC induzido por oclusão da ACM)	Redução do volume de enfarte, melhoria da função neurológica, redução dos níveis de ROS e potenciação da ativação do eixo citoprotetor AKT/GSK-3 β / β -TrCP/Nrf2.		(100)

		IV (48 horas depois de AVC induzido por oclusão da ACM)	Recuperação neuro comportamental significativa, redução da área de enfarte e diminuição dos marcadores inflamatórios (TNF- α e IL-6).		(99)
		IV (24 horas depois de AVC induzido por oclusão da ACM)	Redução do volume de enfarte, potenciação da preservação neuronal, redução das áreas de necrose e diminuição dos marcadores inflamatórios (TNF- α e IL-6).	Presença transitória de rubor no local da injeção.	(96)
	Modelo humano	IV (3 a 9 dias após o AVC)	Melhoria significativa da função neurológica, aumento significativo na qualidade de vida e estabilização da área de enfarte.	Pirexia e dor no local da injeção.	(98)

ACM, artéria cerebral média; AKT, proteína quinase B; AVC, acidente vascular cerebral; CE, células estaminais; CECU, células estaminais derivadas do cordão umbilical; IL, interleucina; IC, intracerebral; IV, intravenosa; IT, intratecal; N.A, não apresentados; NFkB, fator nuclear kappa B; Nrf2, fator nuclear relacionado ao eritróide; Refs., referência(s); ROS, espécies reativas de oxigênio; TNF, fator de necrose tumoral; TGF- β 1, fator de crescimento transformador beta; β -TrCP, proteína com repetição de beta-transducina

4.3 Células estaminais pluripotentes induzidas

As CEPI são produzidas por reprogramação genética de células somáticas adultas, adquirindo, *in vitro*, a pluripotência, a morfologia, a capacidade de proliferação, os antígenos de superfície, a expressão gênica e o *status* epigenético, através da aplicação de fatores envolvidos na autorrenovação das CE (102). Três grupos independentes, constituídos por *John B. Gurdon* (2007) e *Shinya Yamanaka* (2007), no Japão, *James Thomson* (2007), em Wisconsin, e *George Q. Daley* (2009), em Boston, demonstraram reverter fibroblastos de ratos em CEPI semelhantes a CEE. Isto com a ajuda de 4 fatores de transcrição (através de vetores retrovirais e oncogenes), como o c-Myc, Klf4, o OCT4 e o Sox2. A fim de evitar o uso de genes tumorigênicos, estes e outros grupos de investigadores reprogramaram tecidos somáticos humanos em CEPI usando o fator Klf4 e a sua combinação com abordagens vetoriais não retrovirais, tais como compostos químicos, plasmídeos, adenovírus e *transposons*. Contudo, a diferenciação de CEPI em neurónios maduros é mais complicada do que a partir de CEE (102,103).

Dos estudos apresentados na tabela 7, depreende-se que as CEPI apresentaram benefícios na melhoria das funções neurológicas, neuroplasticidade e redução do volume de enfarte. A administração precoce (24 horas a 7 dias após o enfarte) mostrou-se particularmente eficaz,

promovendo diferenciação neuronal, migração celular e sobrevivência neuronal, pela potencialização de fatores neuroprotetores, como VEGF e BDNF. Modelos animais de maior complexidade, como o estudo em porcos, indicaram resultados alinhados com os de roedores, sugerindo uma transição viável para ensaios clínicos em humanos (104–110).

Tabela 7- Estudos pré-clínicos realizados com CEPI para o tratamento de AVC.

Tipo de CE	Modelo	Administração	Resultados	Efeitos adversos	Refs.
CEPI alogénicas	Modelo animal (roedores)	IC (7 dias após AVC induzido por oclusão da ACM)	Melhoria das funções neurológicas, redução do volume e potenciação da diferenciação em neurónios e células da glia.	N.A	(104)
		IC- zona de penumbra (7 dias após AVC induzido por oclusão da ACM)	Potenciação da migração e neuroplasticidade das células, melhoria da função motora e redução do tamanho da lesão.		(108)
Células precursoras neuronais derivadas de CEPI	Modelo animal (roedores)	IC- hipocampo (3 dias após AVC induzido por oclusão da ACM)	Reparação neurológica precoce, potenciação dos efeitos parácrinos, modulação do microambiente, redução do volume de enfarte e melhoria da função motora.		(109)
		IC- zona de penumbra (3 dias após AVC induzido por oclusão da ACM)	Aumento das conexões sinápticas e integração das células, melhoria da função sensitivo-motora, potenciação da diferenciação em neurónios e aumento da neuroplasticidade e neuroproteção (expressão de VEGF e BDNF).		(106)
		IC (24 horas após AVC induzido por oclusão da ACM)	Potenciação da sobrevivência neuronal e migração, melhoria da função neurológica e redução do volume de enfarte.		(107)
	Modelo animal (mamífero não ruminante)	IC (7 dias após AVC induzido por oclusão da ACM)	Melhoria das funções neurológicas, diferenciação em neurónios e células da glia e redução do volume de enfarte.	(110)	

	Modelo animal (mamífero não ruminante)	IC- zona de penumbra (5 dias após AVC induzido por oclusão da ACM)	Promoção da recuperação da postura motora, estado mental e apetite.	N.A	(105)
--	--	--	---	-----	-------

ACM, artéria cerebral média; AVC, acidente vascular cerebral; BDNF, fator neurotrófico derivado do cérebro; CE, células estaminais; CEPI, células estaminais pluripotentes induzidas; IC, intracerebral; N.A, não apresentados; Refs., referência(s); VEGF, fator de crescimento endotelial vascular

A análise intensiva dos estudos apresentados, permitiu assim decifrar as vantagens e desvantagens associadas a cada tipo de CE, como explícito na tabela 8, tendo por base os mecanismos de ação intrínsecos e extrínsecos subjacentes das CE, corroborados pelas tabelas 3 a 7. Isto oferece garantia de que as CE sejam selecionadas com maior segurança, especificidade, permitindo potenciar, individualmente, apenas os processos moleculares regenerativos e protetores requeridos por cada paciente sujeito a AVC, aumentando, assim, a eficácia do transplante celular.

4.4 Limitações

A análise dos 60 artigos revelou várias limitações metodológicas, tanto em ensaios pré-clínicos como clínicos, destacando desafios específicos associados aos diferentes tipos de CE utilizadas no tratamento do AVC.

Todos os estudos analisados foram realizados na Europa ou nos Estados Unidos da América, o que limita a representatividade global, dado que variáveis externas, como condições socioeconómicas e prevalência de comorbidades, diferem significativamente noutras regiões. Esta restrição compromete a generalização dos resultados à população mundial.

Além disso, foram identificadas discrepâncias importantes entre as amostras animais e humanas. Enquanto os modelos animais incluem frequentemente roedores jovens e saudáveis, os estudos clínicos envolvem pacientes adultos, muitas vezes com comorbidades. Estas diferenças podem enviesar os resultados, pois fatores intrínsecos às amostras humanas, como idade avançada e condições pré-existentes, alteram as respostas ao tratamento e dificultam a extrapolação direta dos dados obtidos em modelos pré-clínicos para a prática clínica.

Os grupos de controlo, comuns em estudos com modelos animais, contribuem para a obtenção de resultados mais robustos e comparáveis. Contudo, a ausência de grupos de

controle em estudos clínicos humanos é uma limitação significativa, dificultando a comparação entre pacientes tratados com CE e aqueles que não recebem a terapia. Restrições éticas impedem a formação de grupos de controle humano, uma vez que não seria aceitável privar indivíduos de tratamento apenas para fins experimentais. Adicionalmente, o número reduzido de participantes nos estudos clínicos (normalmente entre 15 e 20 pacientes) e nos modelos animais (no máximo 65 roedores) constitui uma limitação, tornando as conclusões obtidas pouco generalizáveis.

Outro problema identificado foi o curto período de seguimento analisado nos estudos. Nenhum deles acompanhou os participantes, humanos ou animais, por mais de um ano, e a maioria das medições dos resultados foi realizada semanas ou meses após o transplante de CE. Isto limita a avaliação de efeitos a longo prazo, tanto em termos de eficácia terapêutica como de potenciais efeitos adversos. Assim, há uma necessidade urgente de estudos longitudinais que acompanhem os impactos das CE ao longo de períodos mais duradouros.

A diversidade de escalas e testes utilizados para avaliar a recuperação pós-AVC é também uma limitação relevante. Nos humanos, instrumentos como a NIHSS e a *Modified Rankin Scale*² são amplamente utilizados, fornecendo medições quantitativas do impacto do AVC. Contudo, estas escalas são menos eficazes na avaliação de aspetos especializados da recuperação. Em contraste, nos modelos animais, testes como o *Barre Test*³, o *Morris Water Maze*⁴ e o *Rotarod Test*⁵ permitem analisar funções específicas, mas não replicam adequadamente a complexidade dos défices neurológicos humanos, particularmente em termos de funcionalidade e qualidade de vida.

Para além das limitações metodológicas, os diferentes tipos de CE apresentam características próprias que influenciam a sua segurança, eficácia, acessibilidade e viabilidade ética. (tabela 8)

As CEE destacam-se pela sua capacidade de diferenciação, devido à pluripotência, tornando-as valiosas para investigações pré-clínicas. No entanto, enfrentam obstáculos éticos relacionados com a destruição de embriões e riscos clínicos, como imunorrejeição e

² Escala que avalia o grau de incapacidade ou dependência nas atividades quotidianas de pessoas que sofreram AVC ou de outras causas de incapacidade neurológica (111,113)

³ Método utilizado para avaliar a força muscular e a capacidade de manter um determinado posicionamento de um membro contra a gravidade(111,113)

⁴ Teste comportamental utilizado para avaliar funções cognitivas (memória espacial e a aprendizagem)(111,113)

⁵ Método amplamente utilizado para avaliar a coordenação motora, equilíbrio, resistência física, e função neuromuscular (111,113).

formação de teratomas (43). Em contrapartida, as CEPI oferecem uma alternativa ética, pois derivam de tecidos somáticos. Contudo, enfrentam desafios técnicos, como o risco de mutagênese insercional durante a reprogramação e a senescência precoce, especialmente em células de indivíduos mais idosos (14,43,111).

As CEMQ, provenientes da medula óssea ou do tecido adiposo, apresentam um perfil promissor devido à sua imunomodulação e secreção de fatores parácrinos (43). Embora promovam a regeneração tecidual, existe o risco de estimularem microambientes favoráveis ao desenvolvimento tumoral ou à progressão de metástases em tecidos com células cancerígenas latentes (59). As CEH, por outro lado, são amplamente utilizadas pelo seu papel imunomodulador, mas têm limitações na restauração de tecidos neuronais ou na capacidade de atravessar a BHE. As CETA, em particular, enfrentam desafios na obtenção de populações puras e na expansão *in vitro* sem mutações indesejadas, limitando a sua aplicabilidade generalizada (42,43).

As CPE têm um papel crucial na reparação vascular, mas a sua eficácia é limitada em pacientes com comorbidades como a DM ou a HTA. Além disso, podem agravar condições como aterosclerose em indivíduos com dislipidemias. As CECU, apesar do baixo risco de rejeição e relativa segurança, enfrentam desafios relacionados com a disponibilidade limitada no momento do parto e à quantidade insuficiente para aplicações terapêuticas em larga escala (81,95). Por fim, as CETD apresentam potencial em terapias localizadas, mas a sua capacidade de diferenciação restrita a tecidos mesodérmicos limita a sua aplicabilidade em condições neurológicas complexas, como o AVC (82,112).

Em síntese, as CEE e CEPI destacam-se pela sua plasticidade, sendo atraentes para investigações e terapias futuras, mas enfrentam limitações éticas e de segurança que restringem o seu uso clínico. Por outro lado, as CEMQ, CEH e CECU oferecem maior segurança e acessibilidade, mas apresentam eficácia limitada na regeneração neuronal e vascular. A seleção do tipo de CE a utilizar depende do contexto clínico e das necessidades específicas de cada caso. Por exemplo, em situações onde a reparação vascular é prioritária, as CPE podem ser mais eficazes do que as CEH, mesmo com limitações relacionadas com comorbidades. Da mesma forma, as CETD, embora menos versáteis, podem ser mais úteis em terapias direcionadas do que as CEPI, que ainda enfrentam barreiras técnicas significativas (82,112).

Tabela 8- Resumo esquemático do potencial terapêutico e das limitações das diferentes CE analisadas nos estudos clínicos e pré-clínicos.

Tipo de CE	Origem/Grau de diferenciação	Mecanismos de ação e vantagens	Limitações e desvantagens
CEE	Embriões em estágio blastocisto Pluripotentes	<ul style="list-style-type: none"> - Liberação de EPO e efeito angiogénico; - Regulação positiva da expressão de Bcl-2, HIF-1α, recetores de eritropoetina, neurofilamento e sinaptofisina; - Ativação do crescimento dendrítico e axonal nos neurónios formados; - Redução da secreção de compostos apoptóticos e da ativação da caspase-3; - Diminuição de TNF e Il-6 e efeito anti-inflamatório, por inibição da ativação dos recetores <i>Toll-like 2</i> e 6; - Elevado grau de proliferação; - Capacidade de se diferenciar em qualquer tipo celular; - Redução do volume de enfarte; - Melhoria dos efeitos neurológicos funcionais, motores e cognitivos. 	<ul style="list-style-type: none"> - Risco de rejeição imunológica; - Problemas éticos; - Risco de tumorigenicidade; - Instabilidade genética associada.

CEMQ	CEMQ derivadas da medula óssea	Médula óssea Multipotentes	<ul style="list-style-type: none"> -Ampla secreção parácrina de fatores neurotróficos e citocinas anti-inflamatórias-IL-4 e IL-10 (principal mecanismo); - Liberação de TGF-β e Ang1; - Liberação de VEGF na zona de penumbra e núcleo isquémico e efeito angiogénico; - Produção de componentes da matriz extracelular (MEC), como a fibronectina; - Inibição da expressão de MMP; - Ativação de células Treg e inibição das células T CD4 e CD8 positivas; - Potenciação da neurogênese endógena e sinaptogênese; - Versatilidade na diferenciação, incluindo neurónios; - Inibição de processos anti-apoptóticos; - Regulação da integridade da BHE. - Diminuição da área de enfarte; - Facilidade na obtenção; - Baixa imunogenicidade e tumorigénese; - Facilidade de isolamento, expansão e conservação. 	<ul style="list-style-type: none"> - Microembolismo se injeção IA e IV; - Potenciação da arteriosclerose; - Diminuição da capacidade proliferativa com o tempo e da quantidade de CE viáveis; - Variabilidade dos efeitos entre as fontes; -Risco de tumorigenicidade, por liberação parácrina de compostos estimulantes de células cancerígenas; -Controlo rigoroso dos mecanismos de diferenciação.
	CETA	Tecido adiposo (gordura) Multipotentes	<ul style="list-style-type: none"> - Potenciação da expressão do sistema SDF-1, para potenciação da migração celular e regeneração do tecido cerebral; - Capacidades imunomoduladoras e anti-apoptóticas, através da redução dos níveis de IL-18, recetor <i>Toll-like-4</i> e inibidor do ativador de plasminogénio-1; - Regulação positiva da distribuição de proteínas como ZO-1 e claudina-5; - Potenciação da angiogénese, devido à elevada secreção parácrina de VEGF, HGF e Ang-1; - Diferenciação em vários tipos celulares e potenciação da sinaptogênese; - Baixo risco de rejeição imunológico; - Diminuição da área de enfarte; - Melhoria da função neurológica; - Manutenção da integridade da BHE; - Fácil obtenção e grande quantidade disponível. 	<ul style="list-style-type: none"> - Risco de tumorigenicidade por promoção parácrina da proliferação tumoral; - Variabilidade na qualidade das células; - Desafios na expansão <i>in vitro</i>; - Escassez de ensaios clínicos amplos para avaliar a segurança e eficácia da terapia.

Potencial terapêutico de células estaminais no AVC

	CEFD	Polpa dental, ligamento periodontal, papila apical Multipotentes	<ul style="list-style-type: none"> - Secreção de GDNF, NGF e BDNF; - Propriedades imunomoduladoras e efeitos anti-apoptóticos, através da redução dos níveis de citocinas pró-inflamatórias, como IL-2, IL-6, IL-12 e TNF-α; - Aumento das linhagens de células dentárias, ósseas e neuronais; - Estimulação da neurogênese endógena e regeneração tecidual; - Fácil acesso; 	<ul style="list-style-type: none"> - Capacidade de diferenciação e integração ainda não totalmente estabelecidas; - Variabilidade biológica entre doadores; - Custos elevados no cultivo; - Desafios no controlo e programação dos mecanismos moleculares de expansão.
CMNMO	CEH	Medula óssea, sangue periférico e sangue do cordão umbilical Multipotentes	<ul style="list-style-type: none"> - Diminuição dos processos apoptóticos (Bcl-2); - Secreção de VEGF, bFGF, BDNF e IGF-1; - Ativação das vias Notch e Wnt; - Produção de IL-10 e Treg; - Ação imunomoduladora através da redução das células T CD4 e CD8 positivas e macrófagos invasores; - Diminuição da área de enfarte; - Potenciação da angiogénese; - Capacidade de diferenciação em todas as linhagens do sangue. 	<ul style="list-style-type: none"> - Risco de tumorigenicidade; - Risco de rejeição imunológica; - Populações celulares muito heterogéneas; - Risco de tromboembolismo; - Capacidade limitada de diferenciação neuronal; - Acumulação em órgãos inflamados; - Migração celular para o local da lesão insuficiente.
	CPE	Armazenadas na medula óssea (passam a circular no sangue periférico após estímulo) Multipotentes	<ul style="list-style-type: none"> - Libertação de citocinas parácrinas (VEGF, HGF, Ang-1, SDF-1 e IGF-1); - Diminuição da ativação microglial pró-inflamatória, por inibição do recetor do complemento c3a da via complemento C3/recetor do complemento C3a; - Estimulação da atividade pinocítica e redução do edema perivascular; - Maior neovascularização e reconstrução vascular; - Potenciação da neurogénese; - Manutenção da integridade da BHE. 	<ul style="list-style-type: none"> - A sua administração pode exacerbar a formação de placas ateroscleróticas; - Falta de métodos para purificar estas populações celulares; - Dificuldade/limitação da obtenção de culturas puras com propriedades específicas para terapias vasculogénicas; - Redução da eficácia das CPE em doentes com DM e HTA.

Potencial terapêutico de células estaminais no AVC

CECU	Sangue e tecido do cordão umbilical Multipotentes (sangue) / Pluripotentes (tecido)	<ul style="list-style-type: none"> - Regulação positiva de proteínas como a tirosina quinase, ocludina e Ang-1; - Produção de BDNF e VEGF; - Ligação da lectina à microglia e macrófagos; - Redução da proliferação de células T e diminuição dos níveis de fatores pró-inflamatórios, como o IFN-γ e a IL-10; - Manutenção da BHE pela promoção da expressão de proteínas de junção, como ZO-1, ocludina e desmina; - Potencia a neurogênese e angiogênese; - Efeito neuroprotetor e imunomodulador; - Baixo risco de rejeição; - Fonte não invasiva. 	<ul style="list-style-type: none"> - Células do sangue do cordão têm menor capacidade de diferenciação comparadas às células do tecido; - Janela temporal de colheita reduzida (limitada à data do parto); - Expansão <i>in vitro</i> difícil; - Custos elevados.
CEPI	Células somáticas reprogramadas Pluripotentes	<ul style="list-style-type: none"> - Secreção de BDNF, IGF-1, VEGF e bFGF; - Potenciação da neurogênese e formação de outras células (astrócitos e microglia e células imunoreguladoras); - Capacidade neuroprotetora e imunomoduladora através da libertação de IL-10 e TGF-β; - Ativação de células endoteliais e pericitos com potenciação da angiogênese; - Redução do volume de enfarte; - Plasticidade sináptica; - Baixo risco de imunorrejeição (sem necessidade de terapêutica imunossupressora após transplante); - Ausência de preocupações éticas; - Obtenção fácil e acessível de células autólogas para transplante. 	<ul style="list-style-type: none"> - Risco de tumorigênese; - Complexidade no processo de reprogramação; - Possibilidade de variações entre linhas celulares; - Senescência e perda de propriedades pluripotentes em células de pacientes idosos; - Escassez de estudos clínicos amplos e seguros.

Ang, angiotensina; Bcl-2, linfoma de células B2; BDNF, fator neurotrófico derivado do cérebro; bFGF, fator de crescimento fibroblástico básico; BHE, barreira hematoencefálica; CE, células estaminais; CECU, Células estaminais derivadas do cordão umbilical; CEE, células estaminais embrionárias; CEH, células estaminais hematopoéticas; CEMQ: células estaminais mesenquimais; CMNMO, células CEPI, células estaminais pluripotentes induzidas; CETA, células derivadas do tecido adiposo; CETD, células estaminais derivadas do tecido dentário; CXCR, recetor de quimiocina; DM, diabetes *mellitus*; EPO, eritropoetina; GDNF, fator neurotrófico derivado da linhagem das células gliais; HGF, fator de crescimento de hepatócitos; HTA, hipertensão arterial; IA, intra-arterial; IFN- γ , interferão-gama; IGF-1, fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1; IL, interleucina; IV, intravenosa; MEC, matriz extracelular; MMP, metaloproteinase da matriz; NGF, fator de crescimento nervoso; SDF-1, Fator derivado do estroma; TGF- β , fator de crescimento transformador β 1; TNF- α , fator de necrose tumoral; TNF- α , fator de necrose tumoral alfa; Treg, células T reguladoras; VEGF, fator de crescimento endotelial vascular; ZO-1, proteína de zona de oclusão; ZSG, zona subgranular; ZSV, zona subventricular

6. Conclusão

Na atualidade, o AVC é uma prioridade para a saúde pública. A sua prevalência tem aumentado continuamente até taxas alarmantes, a nível mundial, e representa um enorme desafio para os sistemas de saúde. Cada vez são mais frequentes fatores de risco modificáveis, como a HTA, a DM, a obesidade e o tabagismo, e não modificáveis, como o envelhecimento, assumirem-se como partes integrantes da vida quotidiana dos atuais seres humanos. Este facto associado à curta janela de ação, à recuperação parcial da função neurológica e à perda permanente da qualidade de vida dos tratamentos de revascularização, criou a necessidade de procurar no uso de CE um novo paradigma do tratamento de AVC.

Os avanços científicos realizados até o momento baseiam-se principalmente em estudos realizados em modelos animais e humanos, os quais demonstram os potenciais benefícios e a segurança das CE na regeneração cerebral. No entanto, as CE têm características e funções distintas, que as tornam mais ou menos aptas para diferentes mecanismos regenerativos e reparadores. As CEE e as CEPI são mais eficazes em promover a diferenciação celular para neurónios, oligodendrócitos e astrócitos, enquanto as CEH, CPE, CECU e CEMQ intensificam mecanismos imunomoduladores, anti-inflamatórios e secretores de fatores tróficos, que exercem por ação parácrina neuroproteção e otimização da angiogénese.

Contudo, apesar do potencial promissor das CE, várias limitações técnicas e fisiológicas persistem, dificultando sua aplicação terapêutica em larga escala. A versatilidade limitada de células como as CEH e CECU, que são mais especializadas em funções hematopoiéticas e imunológicas do que diferenciação em neurónios, restringe o seu uso na regeneração neuronal. Além disso, o envelhecimento e a redução do número e tropismo de algumas CE pela área lesionada após um AVC (essencialmente as CEPI e CEMQ), tornam a disponibilidade destas células em amostras autólogas escassas, o que limita a eficácia dos tratamentos, principalmente em populações mais idosas. Concomitantemente, as CETD, CEPI, CECU, CETA e CPE apresentam uma difícil expansão *in vitro*, o que condiciona a obtenção de quantidades celulares suficientes para se alcançar uma eficácia terapêutica considerável. Adicionalmente, as CE associam-se a efeitos adversos como a imunorrejeição e a tumorigénese, destacando-se o facto das CEMQ derivadas da medula óssea, CETA, CEPI e CECU serem imuno privilegiadas, enquanto as CEPI e CEE se associam a um grande

potencial para a indução de teratomas e/ou teratocarcinomas, devido ao seu elevado grau de diferenciação.

Os desafios técnicos não se restringem apenas às características das células, mas também a aspectos práticos relacionados com a dose, número de injeções, momento do transplante e via de administração. Nos estudos analisados, houve preferência pela escolha das vias IA, IT e IC, nas fases subagudas e crônicas do AVC, que foi crucial para maximizar os benefícios das CE, já que estas vias permitem uma injeção direta na zona afetada. Enquanto a via IV, apesar de mais simples e menos arriscada, não garante a retenção adequada nas áreas lesionadas, obrigando simultaneamente à utilização de maiores quantidades de CE na injeção, como observada na análise dos estudos apresentados, a fim de contornar o sequestro de algumas destas em órgãos periféricos. Além disso, o microambiente do tecido cerebral, a escolha do local do transplante e o controle da cicatrização glial são fatores determinantes para o sucesso do transplante. As características individuais do recetor de CE devem ser consideradas na personalização da terapia celular, nomeadamente as suas comorbilidades, já que estas também afetam a eficácia do tratamento do AVC com CE, especialmente o uso de CPE.

Entre os principais obstáculos económicos e metodológicos do uso de CE no tratamento do AVC estão os altos custos de cada fase dos ensaios pré-clínicos e clínicos, o tempo necessário para concluir cada etapa, que varia entre 3 a 4 anos, e a complexidade do processamento e obtenção das CE. A dificuldade no recrutamento de pacientes, especialmente em casos de AVC agudos, onde o tempo de tratamento é limitado a menos de 24 horas, e as elevadas taxas de desistência nos acompanhamentos a longo prazo, são outros desafios. Além disso, a falta de padronização nas tecnologias de bio processamento e escalas de avaliação de resultados usadas nos estudos em modelos animais e humanos, limita a comparação e posterior aplicabilidade em contexto clínico. Concomitantemente, os regulamentos estritos e as barreiras administrativas também complicam o desenho e a conceção dos ensaios clínicos, já que as variações entre órgãos reguladores dificultam a conformidade com as regulamentações que priorizam o bem-estar do paciente. Adicionalmente, as discrepâncias entre as características intrínsecas dos modelos animais e dos pacientes humanos, impõe complexidade à validação de novas terapias.

Apesar de os estudos realizados até agora fornecerem informações valiosas sobre o uso das células estaminais no tratamento do AVC, existem ainda várias lacunas que precisam ser investigadas. A segurança continua a ser uma das maiores preocupações na aplicação das CE para o tratamento do AVC, com a maioria dos estudos priorizando a avaliação de segurança em detrimento da eficácia terapêutica.

Considera-se assim fundamental e necessário incentivar pesquisas futuras que priorizem estudos em humanos, amostras de maior tamanho e também modelos experimentais submetidos a AVCH e não só AVCI. A ênfase na otimização do tempo, métodos de entrega e mecanismos de amplificação/potenciação das CE no tratamento pós-AVC, bem como a monitorização dos efeitos a longo prazo, são essenciais para garantir a segurança e eficácia do tratamento. Aprofundar a compreensão dos mecanismos pelos quais as CE facilitam a recuperação neurológica, apostando na pesquisa de novas técnicas de imagem e tecnologias de avaliação contínua, é crucial. Por fim, abordar questões éticas e regulatórias, especialmente no que diz respeito às CEE e CEPI, e educar os profissionais de saúde e o público são essenciais para o avanço e valorização da terapia com CE como um tratamento viável e com bom prognóstico para o AVCI e AVCH.

Por fim, apesar deste assunto não ter sido incluído na versão final desta tese devido a limitações de espaço, é extremamente importante referir que se tem tentado potenciar a ação das CE através da adoção do cotransplante e do pré-condicionamento. Este mecanismo pressupõe sujeitar as CE a condições hostis, semelhantes às apresentadas no ambiente das células cerebrais danificadas pelo AVC, de modo a torná-las mais robustas e capazes de sobreviver em ambientes pouco favoráveis. A aplicação destes métodos tem demonstrado eficácia na melhoria da recuperação funcional, sendo uma área em que a pesquisa futura pode contribuir significativamente.

7. Referências bibliográficas

1. Feigin VL, Brainin M, Norrving B, Martins S, Sacco RL, Hacke W, et al. World Stroke Organization (WSO): Global Stroke Fact Sheet 2022. Vol. 17, International Journal of Stroke. SAGE Publications Inc.; 2022. p. 18–29.
2. WHO. Stroke, Cerebrovascular accident. 2024 [cited 2024 Jul 17]. WHO EMRO | Stroke, Cerebrovascular accident | Health topics. Available from: <https://www.emro.who.int/health-topics/stroke-cerebrovascular-accident/index.html>
3. Tsao CW, Aday AW, Almarzooq ZI, Alonso A, Beaton AZ, Bittencourt MS, et al. Heart Disease and Stroke Statistics-2022 Update: A Report from the American Heart Association. Vol. 145, Circulation. Lippincott Williams and Wilkins; 2022. p. E153–639.
4. J. Larry Jameson, Dennis L. Kasper, Dan L. Longo, Anthony S. Fauci, Stephen L. Hauser, Joseph Loscalzo. Harrison’s Principles of Internal Medicine. 20^a. J. Larry Jameson, Dennis L. Kasper, Dan L. Longo, Anthony S. Fauci, Stephen L. Hauser, Joseph Loscalzo, editors. Vol. I. 2018. 3025–3292 p.
5. SPAVC | Sociedade Portuguesa do Acidente Vascular Cerebral. Aprenda o fundamental . 2022 [cited 2024 Jul 18]. Aprenda o fundamental . Available from: <https://spavc.org/informacoes/aprenda-o-fundamental/>
6. Mosconi MG, Paciaroni M. Treatments in Ischemic Stroke: Current and Future. Vol. 85, European Neurology. S. Karger AG; 2022. p. 349–66.
7. Kim JH, Kim SY, Kim B, Lee SR, Cha SH, Lee DS, et al. Prospects of therapeutic target and directions for ischemic stroke. Pharmaceuticals. 2021 Apr 1;14(4).
8. Luísa Fonseca. O AVC é a principal causa de morte e incapacidade em Portugal | SPMI. 2021 [cited 2024 Jul 17]. p. 1–1 SPMI- Sociedade Portuguesa de Medicina Interna. Available from: <https://www.spmi.pt/acidente-vascular-cerebral-como-podemos-melhorar/>
9. Coutts SB. Diagnosis and Management of Transient Ischemic Attack.
10. Knight-Greenfield A, Nario JJQ, Gupta A. Causes of Acute Stroke: A Patterned Approach. Vol. 57, Radiologic Clinics of North America. W.B. Saunders; 2019. p. 1093–108.
11. Adams HP, Bendixen BH, Kappelle ; L Jaap, Biller J, Love BB, David ;, et al. Classification of Subtype of Acute Ischemic Stroke Definitions for Use in a Multicenter Clinical Trial [Internet]. Available from: <http://ahajournals.org>
12. Kalladka D, Muir KW. Brain repair: Cell therapy in stroke. Vol. 7, Stem Cells and Cloning: Advances and Applications. 2014. p. 31–44.
13. Kumar A, Dogra S. Pathophysiology and therapeutic strategies in the management of stroke: An update. Vol. 44, Drugs of Today. 2008. p. 757–66.
14. Reis C, Wilkinson M, Reis H, Akyol O, Gospodarev V, Araujo C, et al. A look into stem cell therapy: Exploring the options for treatment of ischemic stroke. Vol. 2017, Stem Cells International. Hindawi Limited; 2017.

15. Zhou G, Wang Y, Gao S, Fu X, Cao Y, Peng Y, et al. Potential Mechanisms and Perspectives in Ischemic Stroke Treatment Using Stem Cell Therapies. Vol. 9, *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. Frontiers Media S.A.; 2021.
16. Zhou G, Wang Y, Gao S, Fu X, Cao Y, Peng Y, et al. Potential Mechanisms and Perspectives in Ischemic Stroke Treatment Using Stem Cell Therapies. Vol. 9, *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. Frontiers Media S.A.; 2021.
17. Ya J, Pellumbaj J, Hashmat A, Bayraktutan U. The Role of Stem Cells as Therapeutics for Ischaemic Stroke. Vol. 13, *Cells*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI); 2024.
18. Choi YH, Laaker C, Hsu M, Cismaru P, Sandor M, Fabry Z. Molecular mechanisms of neuroimmune crosstalk in the pathogenesis of stroke. Vol. 22, *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI; 2021.
19. Detante O, Legris L, Moisan A, Rome C. Cell Therapy and Functional Recovery of Stroke. *Neuroscience*. 2024 Jul 9;550:79–88.
20. Hatakeyama M, Ninomiya I, Otsu Y, Omae K, Kimura Y, Onodera O, et al. Cell therapies under clinical trials and polarized cell therapies in pre-clinical studies to treat ischemic stroke and neurological diseases: A literature review. Vol. 21, *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI AG; 2020. p. 1–15.
21. Berlet R, Anthony S, Brooks B, Wang ZJ, Sadanandan N, Shear A, et al. Combination of stem cells and rehabilitation therapies for ischemic stroke. Vol. 11, *Biomolecules*. MDPI; 2021.
22. Detante O, Legris L, Moisan A, Rome C. Cell Therapy and Functional Recovery of Stroke. *Neuroscience*. 2024 Jul 9;550:79–88.
23. Anthony S, Cabantan D, Monsour M, Borlongan C V. Neuroinflammation, Stem Cells, and Stroke. Vol. 53, *Stroke*. Lippincott Williams and Wilkins; 2022. p. 1460–72.
24. Herpich F, Rincon F. Management of Acute Ischemic Stroke. Vol. 48, *Critical Care Medicine*. Lippincott Williams and Wilkins; 2020. p. 1654–63.
25. Greenberg SM, Ziai WC, Cordonnier C, Dowlathshahi D, Francis B, Goldstein JN, et al. 2022 Guideline for the Management of Patients With Spontaneous Intracerebral Hemorrhage: A Guideline From the American Heart Association/American Stroke Association. Vol. 53, *Stroke*. Lippincott Williams and Wilkins; 2022. p. E282–361.
26. Krause M, Phan TG, Ma H, Sobey CG, Lim R. Cell-based therapies for stroke: Are we there yet? Vol. 10, *Frontiers in Neurology*. Frontiers Media S.A.; 2019.
27. Bersano A, Ballabio E, Lanfranconi S, Boncoraglio GB, Corti S, Locatelli F, et al. Clinical Studies in Stem Cells Transplantation for Stroke: A Review. Vol. 8, *Current Vascular Pharmacology*. 2010.
28. Watanabe TK. A Review of Stem Cell Therapy for Acquired Brain Injuries and Neurodegenerative Central Nervous System Diseases. Vol. 10, *PM and R*. Elsevier Inc.; 2018. p. S151–6.
29. Alessandrini M, Preynat-Seauve O, De Bruin K, Pepper MS. Stem cell therapy for neurological disorders. *South African Medical Journal*. 2019;109(8 b):S71–8.
30. Kolios G, Moodley Y. Introduction to stem cells and regenerative medicine. Vol. 85, *Respiration*. S. Karger AG; 2013. p. 3–10.

31. Kawabori M, Shichinohe H, Kuroda S, Houkin K. Clinical trials of stem cell therapy for cerebral ischemic stroke. Vol. 21, *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI AG; 2020. p. 1–21.
32. Gervois P, Wolfs E, Ratajczak J, Dillen Y, Vangansewinkel T, Hilkens P, et al. Stem Cell-Based Therapies for Ischemic Stroke: Preclinical Results and the Potential of Imaging-Assisted Evaluation of Donor Cell Fate and Mechanisms of Brain Regeneration. Vol. 36, *Medicinal Research Reviews*. John Wiley and Sons Inc.; 2016. p. 1080–126.
33. Liu H, Reiter S, Zhou X, Chen H, Ou Y, Lenahan C, et al. Insight Into the Mechanisms and the Challenges on Stem Cell-Based Therapies for Cerebral Ischemic Stroke. Vol. 15, *Frontiers in Cellular Neuroscience*. Frontiers Media S.A.; 2021.
34. Yasuhara T, Kawauchi S, Kin K, Morimoto J, Kameda M, Sasaki T, et al. Cell therapy for central nervous system disorders: Current obstacles to progress. Vol. 26, *CNS Neuroscience and Therapeutics*. Blackwell Publishing Ltd; 2020. p. 595–602.
35. Xu W, Zheng J, Gao L, Li T, Zhang J, Shao A. Neuroprotective Effects of Stem Cells in Ischemic Stroke. Vol. 2017, *Stem Cells International*. Hindawi Limited; 2017.
36. Rodríguez-Frutos B, Otero-Ortega L, Gutiérrez-Fernández M, Fuentes B, Ramos-Cejudo J, Díez-Tejedor E. Stem Cell Therapy and Administration Routes After Stroke. *Transl Stroke Res*. 2016 Oct 1;7(5):378–87.
37. Mangin G, Kubis N. Cell Therapy for Ischemic Stroke: How to Turn a Promising Preclinical Research into a Successful Clinical Story. Vol. 15, *Stem Cell Reviews and Reports*. Humana Press Inc.; 2019. p. 176–93.
38. Savitz SI, Dinsmore JH, Wechsler LR, Rosenbaum DM, Caplan LR. *Cell Therapy for Stroke*.
39. Sarmah D, Kaur H, Saraf J, Pravalika K, Goswami A, Kalia K, et al. Getting Closer to an Effective Intervention of Ischemic Stroke: The Big Promise of Stem Cell. Vol. 9, *Translational Stroke Research*. Springer US; 2018. p. 356–74.
40. Shinozuka K, Dailey T, Tajiri N, Ishikawa H, Kaneko Y, Borlongan C V. Stem cell transplantation for neuroprotection in stroke. Vol. 3, *Brain Sciences*. MDPI AG; 2013. p. 239–61.
41. Panos LD, Bargiotas P, Arnold M, Hadjigeorgiou G, Panos GD. Revolutionizing Stroke Recovery: Unveiling the Promise of Stem Cell Therapy. Vol. 18, *Drug Design, Development and Therapy*. Dove Medical Press Ltd; 2024. p. 991–1006.
42. Stone LL, Grande A, Low WC. Neural repair and neuroprotection with stem cells in ischemic stroke. Vol. 3, *Brain Sciences*. MDPI AG; 2013. p. 599–614.
43. Dailey T, Metcalf C, Mosley YI, Sullivan R, Shinozuka K, Tajiri N, et al. An update on translating stem cell therapy for stroke from bench to bedside. Vol. 2, *Journal of Clinical Medicine*. MDPI; 2013. p. 220–41.
44. Xie C, Wang K, Peng J, Jiang X, Pan S, Wang L, et al. Efficacy and safety of human-derived neural stem cell in patients with ischaemic stroke: study protocol for a randomised controlled trial. *BMJ Open*. 2022 Nov 8;12(11).
45. Bühnemann C, Scholz A, Bernreuther C, Malik CY, Braun H, Schachner M, et al. Neuronal differentiation of transplanted embryonic stem cell-derived precursors in stroke lesions of adult rats. *Brain*. 2006 Dec;129(12):3238–48.
46. Yanagisawa D, Qi M, Kim D hoon, Kitamura Y, Inden M, Tsuchiya D, et al. Improvement of focal ischemia-induced rat dopaminergic dysfunction by striatal

- transplantation of mouse embryonic stem cells. *Neurosci Lett*. 2006 Oct 16;407(1):74–9.
47. Transplantation of mouse embryonic stem cell after middle cerebral artery occlusion 1.
 48. Hayashi J, Takagi Y, Fukuda H, Imazato T, Nishimura M, Fujimoto M, et al. Primate embryonic stem cell-derived neuronal progenitors transplanted into ischemic brain. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 2006 Jun 19;26(7):906–14.
 49. Drury-Stewart D, Song M, Mohamad O, Guo Y, Gu X, Chen D, et al. Highly efficient differentiation of neural precursors from human embryonic stem cells and benefits of transplantation after ischemic stroke in mice [Internet]. 2013. Available from: <http://stemcellres.com/content/4/4/93>
 50. Patkar S, Tate R, Modo M, Plevin R, Carswell HVO. Conditionally immortalised neural stem cells promote functional recovery and brain plasticity after transient focal cerebral ischaemia in mice. *Stem Cell Res*. 2012 Jan;8(1):14–25.
 51. Lu S, Li K, Yang Y, Wang Q, Yu Y, Wang Z, et al. Optimization of an Intranasal Route for the Delivery of Human Neural Stem Cells to Treat a Neonatal Hypoxic-Ischemic Brain Injury Rat Model. *Neuropsychiatr Dis Treat*. 2022;18:413–26.
 52. Huang L, Wong S, Snyder EY, Hamblin MH, Lee JP. Human neural stem cells rapidly ameliorate symptomatic inflammation in early-stage ischemic-reperfusion cerebral injury. *Stem Cell Res Ther*. 2014;5(6).
 53. Andres RH, Horie N, Slikker W, Keren-Gill H, Zhan K, Sun G, et al. Human neural stem cells enhance structural plasticity and axonal transport in the ischaemic brain. *Brain*. 2011;134(6):1777–89.
 54. Mine Y, Tatarishvili J, Oki K, Monni E, Kokaia Z, Lindvall O. Grafted human neural stem cells enhance several steps of endogenous neurogenesis and improve behavioral recovery after middle cerebral artery occlusion in rats. *Neurobiol Dis*. 2013 Apr;52:191–203.
 55. Kalladka D, Sinden J, Pollock K, Haig C, McLean J, Smith W, et al. Human neural stem cells in patients with chronic ischaemic stroke (PISCES): a phase 1, first-in-man study. *The Lancet*. 2016 Aug 20;388(10046):787–96.
 56. Muir KW, Bulters D, Willmot M, Sprigg N, Dixit A, Ward N, et al. Intracerebral implantation of human neural stem cells and motor recovery after stroke: multicentre prospective single-arm study (PISCES-2). *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2020 Feb 10;91(4):396–401.
 57. Ryu S, Lee SH, Kim SU, Yoon BW. Human neural stem cells promote proliferation of endogenous neural stem cells and enhance angiogenesis in ischemic rat brain. *Neural Regen Res*. 2016 Feb 1;11(2):298–304.
 58. Naji A, Eitoku M, Favier B, Deschaseaux F, Rouas-Freiss N, Suganuma N. Biological functions of mesenchymal stem cells and clinical implications. Vol. 76, *Cellular and Molecular Life Sciences*. Birkhauser Verlag AG; 2019. p. 3323–48.
 59. Gao L, Song Z, Mi J, Hou P, Xie C, Shi J, et al. The Effects and Underlying Mechanisms of Cell Therapy on Blood-Brain Barrier Integrity After Ischemic Stroke. *Curr Neuropharmacol*. 2020 Sep 15;18(12):1213–26.
 60. Toyoshima A, Yasuhara T, Kameda M, Morimoto J, Takeuchi H, Wang F, et al. Intra-arterial transplantation of allogeneic mesenchymal stem cells mounts neuroprotective effects in a transient ischemic stroke model in rats: Analyses of therapeutic time window and its mechanisms. *PLoS One*. 2015 Jun 15;10(6).

61. Jaillard A, Hommel M, Moisan A, Zeffiro TA, Favre-Wiki IM, Barbieux-Guillot M, et al. Autologous Mesenchymal Stem Cells Improve Motor Recovery in Subacute Ischemic Stroke: a Randomized Clinical Trial. *Transl Stroke Res.* 2020 Oct 1;11(5):910–23.
62. Calió ML, Marinho DS, Ko GM, Ribeiro RR, Carbonel AF, Oyama LM, et al. Transplantation of bone marrow mesenchymal stem cells decreases oxidative stress, apoptosis, and hippocampal damage in brain of a spontaneous stroke model. *Free Radic Biol Med.* 2014;70:141–54.
63. Acosta SA, Tajiri N, Hoover J, Kaneko Y, Borlongan C V. Intravenous Bone Marrow Stem Cell Grafts Preferentially Migrate to Spleen and Abrogate Chronic Inflammation in Stroke. *Stroke.* 2015 Sep 28;46(9):2616–27.
64. Shichinohe H, Ishihara T, Takahashi K, Tanaka Y, Miyamoto M, Yamauchi T, et al. Bone marrow stromal cells rescue ischemic brain by trophic effects and phenotypic change toward neural cells. *Neurorehabil Neural Repair.* 2015 Jan 19;29(1):80–9.
65. Miyamoto M, Kuroda S, Zhao S, Magota K, Shichinohe H, Houkin K, et al. Bone marrow stromal cell transplantation enhances recovery of local glucose metabolism after cerebral infarction in rats: A serial 18F-FDG PET study. *Journal of Nuclear Medicine.* 2013 Jan;54(1):145–50.
66. Zhang C, Li Y, Chen J, Gao Q, Zacharek A, Kapke A, et al. Bone marrow stromal cells upregulate expression of bone morphogenetic proteins 2 and 4, gap junction protein connexin-43 and synaptophysin after stroke in rats. *Neuroscience.* 2006;141(2):687–95.
67. Vahidy FS, Haque ME, Rahbar MH, Zhu H, Rowan P, Aisiku IP, et al. Intravenous Bone Marrow Mononuclear Cells for Acute Ischemic Stroke: Safety, Feasibility, and Effect Size from a Phase I Clinical Trial. *Stem Cells.* 2019 Nov 1;37(11):1481–91.
68. Levy ML, Crawford JR, Dib N, Verkh L, Tankovich N, Cramer SC. Phase I/II study of safety and preliminary efficacy of intravenous allogeneic mesenchymal stem cells in chronic stroke. *Stroke.* 2019 Oct 1;50(10):2835–41.
69. Hess DC, Wechsler LR, Clark WM, Savitz SI, Ford GA, Chiu D, et al. Safety and efficacy of multipotent adult progenitor cells in acute ischaemic stroke (MASTERS): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2 trial. *Lancet Neurol.* 2017 May 1;16(5):360–8.
70. Steinberg GK, Kondziolka D, Wechsler LR, Dade Lunsford L, Coburn ML, Billigen JB, et al. Clinical Outcomes of Transplanted Modified Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells in Stroke: A Phase 1/2a Study. Available from: <https://www.clinicaltrials.gov>.
71. Moniche F, Cabezas-Rodriguez JA, Valverde R, Escudero-Martinez I, Lebrato-Hernandez L, Pardo-Galiana B, et al. Safety and efficacy of intra-arterial bone marrow mononuclear cell transplantation in patients with acute ischaemic stroke in Spain (IBIS trial): a phase 2, randomised, open-label, standard-of-care controlled, multicentre trial. *Lancet Neurol.* 2023 Feb 1;22(2):137–46.
72. Walker PA, Harting MT, Jimenez F, Shah SK, Pati S, Dash PK, et al. Direct intrathecal implantation of mesenchymal stromal cells leads to enhanced neuroprotection via an NFκB-mediated increase in interleukin-6 production. *Stem Cells Dev.* 2010 Jun 1;19(6):867–76.
73. Zhou F, Gao S, Wang L, Sun C, Chen L, Yuan P, et al. Human adipose-derived stem cells partially rescue the stroke syndromes by promoting spatial learning and

- memory in mouse middle cerebral artery occlusion model. *Stem Cell Res Ther.* 2015 May 9;6(1).
74. de Celis-Ruiz E, Fuentes B, Alonso de Leciana M, Gutiérrez-Fernández M, Borobia AM, Gutiérrez-Zúñiga R, et al. Final Results of Allogeneic Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells in Acute Ischemic Stroke (AMASCIS): A Phase II, Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Single-Center, Pilot Clinical Trial. *Cell Transplant.* 2022 Mar 1;31.
 75. Jiang W, Liang G, Li X, Li Z, Gao X, Feng S, et al. Intracarotid transplantation of autologous adipose-derived mesenchymal stem cells significantly improves neurological deficits in rats after MCAo. *J Mater Sci Mater Med.* 2014 May 1;25(5):1357–66.
 76. Díez-Tejedor E, Gutiérrez-Fernández M, Martínez-Sánchez P, Rodríguez-Frutos B, Ruiz-Ares G, Lara ML, et al. Reparative therapy for acute ischemic stroke with allogeneic mesenchymal stem cells from adipose tissue: A safety assessment: A phase II randomized, double-blind, placebo-controlled, single-center, pilot clinical trial. *Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases.* 2014;23(10):2694–700.
 77. Leu S, Lin YC, Yuen CM, Yen CH, Kao YH, Sun CK, et al. Open Access RESEARCH Adipose-derived mesenchymal stem cells markedly attenuate brain infarct size and improve neurological function in rats [Internet]. Vol. 8, *Journal of Translational Medicine.* 2010. Available from: <http://www.translational-medicine.com/content/8/1/63>
 78. Leong WK, Henshall TL, Arthur A, Kremer KL, Lewis MD, Helps SC, et al. Human Adult Dental Pulp Stem Cells Enhance Poststroke Functional Recovery Through Non-Neural Replacement Mechanisms. *Stem Cells Transl Med.* 2012 Mar 1;1(3):177–87.
 79. Gong P, Tian Q, He Y, He P, Wang J, Guo Y, et al. Dental pulp stem cell transplantation facilitates neuronal neuroprotection following cerebral ischemic stroke. *Biomedicine and Pharmacotherapy.* 2022 Aug 1;152.
 80. Zhang X, Zhou Y, Li H, Wang R, Yang D, Li B, et al. Transplanted Dental Pulp Stem Cells Migrate to Injured Area and Express Neural Markers in a Rat Model of Cerebral Ischemia. *Cellular Physiology and Biochemistry.* 2018 Feb 1;45(1):258–66.
 81. Liu X, Ye R, Yan T, Yu SP, Wei L, Xu G, et al. Cell based therapies for ischemic stroke: From basic science to bedside. Vol. 115, *Progress in Neurobiology.* Elsevier Ltd; 2014. p. 92–115.
 82. Stonesifer C, Corey S, Ghanekar S, Diamandis Z, Acosta SA, Borlongan C V. Stem cell therapy for abrogating stroke-induced neuroinflammation and relevant secondary cell death mechanisms. Vol. 158, *Progress in Neurobiology.* Elsevier Ltd; 2017. p. 94–131.
 83. Wang L, Ji H, Li M, Zhou J, Bai W, Zhong Z, et al. Intrathecal Administration of Autologous CD34 Positive Cells in Patients with Past Cerebral Infarction: A Safety Study. *ISRN Neurol.* 2013 Sep 25;2013:1–6.
 84. Taguchi A, Soma T, Tanaka H, Kanda T, Nishimura H, Yoshikawa H, et al. Administration of CD34+ cells after stroke enhances neurogenesis via angiogenesis in a mouse model. *Journal of Clinical Investigation.* 2004 Aug;114(3):330–8.
 85. Schwarting S, Litwak S, Hao W, Bähr M, Weise J, Neumann H. Hematopoietic stem cells reduce postischemic inflammation and ameliorate ischemic brain injury. *Stroke.* 2008 Oct 1;39(10):2867–75.

86. Shyu WC, Lin SZ, Chiang MF, Su CY, Li H. Intracerebral peripheral blood stem cell (CD34+) implantation induces neuroplasticity by enhancing β 1 integrin-mediated angiogenesis in chronic stroke rats. *Journal of Neuroscience*. 2006 Mar 29;26(13):3444–53.
87. Felfly H, Muotri A, Yao H, Haddad GG. Hematopoietic stem cell transplantation protects mice from lethal stroke. *Exp Neurol*. 2010 Oct;225(2):284–93.
88. Banerjee S, Bentley P, Hamady M, Marley S, Davis J, Shlebak A, et al. Intra-Arterial Immunoselected CD34+ Stem Cells for Acute Ischemic Stroke. *Stem Cells Transl Med*. 2014 Nov 1;3(11):1322–30.
89. Moubarik C, Guillet B, Youssef B, Codaccioni JL, Piercecchi MD, Sabatier F, et al. Transplanted Late Outgrowth Endothelial Progenitor Cells as Cell Therapy Product for Stroke. *Stem Cell Rev Rep*. 2011 Mar 1;7(1):208–20.
90. Hecht N, Schneider UC, Czabanka M, Vinci M, Hatzopoulos AK, Vajkoczy P, et al. Endothelial progenitor cells augment collateralization and hemodynamic rescue in a model of chronic cerebral ischemia. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 2014;34(8):1297–305.
91. Fang J, Guo Y, Tan S, Li Z, Xie H, Chen P, et al. Autologous Endothelial Progenitor Cells Transplantation for Acute Ischemic Stroke: A 4-Year Follow-Up Study. *Stem Cells Transl Med*. 2019 Jan 1;8(1):14–21.
92. Fan Y, Shen F, Frenzel T, Zhu W, Ye J, Liu J, et al. Endothelial progenitor cell transplantation improves long-term stroke outcome in mice. *Ann Neurol*. 2010 Apr;67(4):488–97.
93. Rosell A, Morancho A, Navarro-Sobrino M, Martínez-Saez E, Hernández-Guillamon M, Lope-Piedrafita S, et al. Factors Secreted by Endothelial Progenitor Cells Enhance Neurorepair Responses after Cerebral Ischemia in Mice. *PLoS One*. 2013 Sep 4;8(9).
94. Garbuzova-Davis S, Haller E, Lin R, Borlongan C V. Intravenously Transplanted Human Bone Marrow Endothelial Progenitor Cells Engraft Within Brain Capillaries, Preserve Mitochondrial Morphology, and Display Pinocytotic Activity Toward Blood-Brain Barrier Repair in Ischemic Stroke Rats. *Stem Cells*. 2017 May 1;35(5):1246–58.
95. Liu X, Jia X. Neuroprotection of Stem Cells Against Ischemic Brain Injury: From Bench to Clinic. Vol. 15, *Translational Stroke Research*. Springer; 2024. p. 691–713.
96. Liao W, Xie J, Zhong J, Liu Y, Du L, Zhou B, et al. Therapeutic effect of human umbilical cord multipotent mesenchymal stromal cells in a rat model of stroke. *Transplantation*. 2009 Feb 15;87(3):350–9.
97. Cheng Q, Zhang Z, Zhang S, Yang H, Zhang X, Pan J, et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cells protect against ischemic brain injury in mouse by regulating peripheral immunoinflammation. *Brain Res*. 2015 Jan 12;1594:293–304.
98. Laskowitz DT, Bennett ER, Durham RJ, Volpi JJ, Wiese JR, Frankel M, et al. Allogeneic umbilical cord blood infusion for adults with ischemic stroke: Clinical outcomes from a phase I safety study. *Stem Cells Transl Med*. 2018;7(7):521–9.
99. Kim K, Park HW, Moon HE, Kim JW, Bae S, Chang JW, et al. The Effect of Human Umbilical Cord Blood-Derived Mesenchymal Stem Cells in a Collagenase-Induced Intracerebral Hemorrhage Rat Model. *Exp Neurobiol*. 2015 Jun 30;24(2):146–55.
100. Li Y, Huang J, Wang J, Xia S, Ran H, Gao L, et al. Human umbilical cord-derived mesenchymal stem cell transplantation supplemented with curcumin improves the outcomes of ischemic stroke via AKT/GSK-3 β / β -TrCP/Nrf2 axis. *J Neuroinflammation*. 2023 Dec 1;20(1).

101. Lin W, Hsuan YCY, Lin MT, Kuo TW, Lin CH, Su YC, et al. Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells Preserve Adult Newborn Neurons and Reduce Neurological Injury after Cerebral Ischemia by Reducing the Number of Hypertrophic Microglia/Macrophages. *Cell Transplant*. 2017 Nov 1;26(11):1798–810.
102. Liu G, David BT, Trawczynski M, Fessler RG. Advances in Pluripotent Stem Cells: History, Mechanisms, Technologies, and Applications. Vol. 16, *Stem Cell Reviews and Reports*. Springer; 2020. p. 3–32.
103. Sanjurjo-Rodríguez C, Castro-Viñuelas R, Piñeiro-Ramil M, Rodríguez-Fernández S, Boquete IF, Blanco FJ, et al. Versatility of induced pluripotent stem cells (Ipscs) for improving the knowledge on musculoskeletal diseases. Vol. 21, *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI AG; 2020. p. 1–28.
104. Jiang M, Lv L, Ji H, Yang X, Zhu W, Cai L, et al. Induction of pluripotent stem cells transplantation therapy for ischemic stroke. *Mol Cell Biochem*. 2011 Aug;354(1–2):67–75.
105. Lau VW, Platt SR, Grace HE, Baker EW, West FD. Human iNPC therapy leads to improvement in functional neurologic outcomes in a pig ischemic stroke model. *Brain Behav*. 2018 May 1;8(5).
106. Polentes J, Jendelova P, Cailleret M, Braun H, Romanyuk N, Tropel P, et al. Human induced pluripotent stem cells improve stroke outcome and reduce secondary degeneration in the recipient brain. *Cell Transplant*. 2012;21(12):2587–602.
107. Yuan T, Liao W, Feng NH, Lou YL, Niu X, Zhang AJ, et al. Human induced pluripotent stem cell-derived neural stem cells survive, migrate, differentiate, and improve neurologic function in a rat model of middle cerebral artery occlusion. *Stem Cell Res Ther*. 2013;4(3).
108. Oki K, Tatarishvili J, Wood J, Koch P, Wattananit S, Mine Y, et al. Human-induced pluripotent stem cells form functional neurons and improve recovery after grafting in stroke-damaged brain. *Stem Cells*. 2012 Jun;30(6):1120–33.
109. Eckert A, Huang L, Gonzalez R, Kim HS, Hamblin MH, Lee JP. Bystander Effect Fuels Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Neural Stem Cells to Quickly Attenuate Early Stage Neurological Deficits After Stroke. *Stem Cells Transl Med*. 2015 Jul 1;4(7):841–51.
110. Baker EW, Platt SR, Lau VW, Grace HE, Holmes SP, Wang L, et al. Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Neural Stem Cell Therapy Enhances Recovery in an Ischemic Stroke Pig Model. *Sci Rep*. 2017 Dec 1;7(1).
111. Singh M, Pandey PK, Bhasin A, Padma M V., Mohanty S. Application of Stem Cells in Stroke: A Multifactorial Approach. Vol. 14, *Frontiers in Neuroscience*. Frontiers Media S.A.; 2020.
112. Nito C, Suda S, Nitahara-Kasahara Y, Okada T, Kimura K. Dental-Pulp Stem Cells as a Therapeutic Strategy for Ischemic Stroke. Vol. 10, *Biomedicines*. MDPI; 2022.
113. Wei L, Wei ZZ, Jiang MQ, Mohamad O, Yu SP. Stem cell transplantation therapy for multifaceted therapeutic benefits after stroke. Vol. 157, *Progress in Neurobiology*. Elsevier Ltd; 2017. p. 49–78.