Centro Universitário Campos de Andrade

Ciências Biológicas

Lucas Miguel Micaloski

**RISCOS E AVANÇOS NA BIOTECNOLOGIA REFERENTE
À CÉLULAS-TRONCO**

Curitiba

2017

Lucas Miguel Micaloski

RISCOS E AVANÇOS NA BIOTECNOLO

**GIA REFERENTE
À CÉLULAS-TRONCO**

Pré-projeto da Disciplina Trabalho de Conclusão de Curso para Graduação em Ciências Biológicas, do Centro Universitário Campos de Andrade.

Orientador (a): Bruno Gavinho.

Curitiba

2017

RESUMO

A fusão do espermatozóide com o óvulo origina a primeira célula-tronco, chamada totipotente. Possui o potencial de se diferenciar em todos os tecidos do embrião. Os diferentes tipos de tecidos ocorrem através de estímulos das próprias células-tronco, ou de células já diferenciadas, em que o condicionamento do ambiente leva a interação de proteínas de superfícies, promovendo a ativação e desativação de genes, alterando a morfologia e comportamento. Após as totipotentes se diferenciarem em tecidos embrionários e extra-embrionários, elas perdem parte de seu potencial, se diferenciando em células-tronco pluripotentes, podendo apenas dar origem aos tecidos embrionários e a células-tronco de menor potencial. Após o nascimento do indivíduo, as pluripotentes apresentam-se de forma mais madura, tendo seu potencial reduzido, sendo chamado de células-troncos multipotentes. Devido às células-tronco terem esse potencial de diferenciação, podem ser empregadas na engenharia de tecidos, tratamentos regenerativos, alguns cânceres, pesquisas que visam obter maior domínio celular, com o objetivo de curar doenças neurodegenerativas. Por outro lado, o emprego de células-tronco embrionárias em pesquisas enfrenta dificuldades éticas e de cunho religioso. Ainda é necessário um entendimento mais amplo e satisfatório, mas acredita-se que tais células serão amplamente empregadas em processos biotecnológicos nas próximas décadas.

Palavras-chave: Células-Tronco. Embrião. Biotecnologia.

ABSTRACT

The fusion of the spermatozoid with the ovule originates the first stem cell, called totipotent. It has the potential to differentiate in all tissues of the embryo. The different types of tissues occur through stimuli of the stem cells themselves, or already differentiated cells, in which the conditioning of the environment leads to the interaction of surface proteins, promoting the activation and deactivation of genes, altering the morphology and behavior. After the totipotent differentiate into embryonic and extra-embryonic tissues, they lose part of their potential, differentiating into pluripotent stem cells, which can only give rise to embryonic tissues and stem cells of lower potential. After the birth of the individual, the pluripotent present in a more mature form, having its potential reduced, being called multipotent stem cells. Because stem cells have this differentiation potential can be employed in tissue engineering, regenerative treatments, some cancers, research aimed at obtaining a greater cellular domain, aiming to cure neurodegenerative diseases. On the other hand, the use of embryonic stem cells in research faces ethical and religious difficulties. A broader and more satisfactory understanding is still needed, but it is believed that such cells will be widely employed in biotechnological processes in the coming decades.

Keywords: Stem Cells. Embryo. Biotechnology.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-Cinética das Células-Troncos	9
Figura 2-Interação do Microambiente	13
Figura 3-Tabela de Fontes de Células-Troncos.	13
Figura 4-Bandeamento G	14
Figura 5-Enzima Telomerase	15
Figura 6-Clonagem Terapêutica.....	18
Figura 7-Impressora e Impressão de Osso e Orelha	19

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	7
2 JUSTIFICATIVA.....	8
3 OBJETIVOS	8
4 ORIGEM E DESENVOLVIMENTO DAS CÉLULAS-TRONCO.....	9
4.1 Células-Tronco Hematopoiéticas	10
4.2 Células-Tronco <i>Mesenquimais</i>	11
7 FONTES DE CÉLULAS-TRONCO	13
5 CONTROLES GENÉTICOS E APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS	14
5.1. Enzima <i>telômerase</i>	15
5.2 Células-tronco de câncer	16
6 APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS	16
6.1 Células-tronco pluripotente através de indução inversa	16
6.2 Clonagens para fins terapêuticos.....	17
6.3 Aplicações clínicas de células-tronco na engenharia tecidual	18
6.4 Aplicações regenerativas em tecidos cardiovasculares	19
6.5 Aplicações regenerativas em Tecidos neurológicos	19
6.6 Diabetes <i>mellitus</i> 2.....	20
8 POLEMICAS E LEIS REFERENTE MANIPULAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO	21
9 CONCLUSÃO.....	23
REFERENCIAS	26

1 INTRODUÇÃO

Esta revisão tem como finalidade abordar assuntos na biotecnologia referente às características, possíveis riscos, avanços e desafios em relação às células-troncos mencionando seu comportamento e seu papel indispensável na origem de um organismo e após sua origem (1,2).

Diversas aplicações onde possibilitara modernizar a medicina no futuro fornecendo soluções em transplante de órgãos com a produção em laboratório, cura degenerativa de várias doenças hoje sem solução (3,4).

Além de mencionar os possíveis avanços, serão também abordados vários problemas, entre eles qual a melhor fonte de células-tronco, e que potencial cada linhagem possui de melhor para diversas aplicações, levando em conta o melhor resultado e implicações na lei devidas, às polemicas na sua manipulação (5).

Foram analisadas as características genéticas destas células, abordando a necessidade de domínio e proteção através do estudo de genes e enzima *telomerase* (6,7).

O sentido do nome célula-tronco faz com que a partir do tronco se originem vários tipos de ramificações que seriam células diferenciadas ou especializadas em uma determinada função, podendo comparar as células troncos com a carta “coringa”, onde poderia substituir a função de qualquer carta de vários jogos, as células-tronco da mesma maneira, dependendo de seu potencial, poderiam assumir a morfologia de qualquer célula de um determinado organismo (2,8).

Essa indução de diferenciação das células-tronco ocorre de acordo com o estímulo que ela terá, ocasionando *ativações ou* desativações de genes, e assim provocando mudanças na morfologia celular. As mudanças ocorrem naturalmente em um organismo, ou em cultura *in vitro* (5).

Existem grandes desafios em relação às pesquisas relacionadas em células-tronco, dentre eles está uma imensa quantidade de informações ainda não descobertas: qual melhor tipo de célula tronco a serem usadas nas pesquisas e tratamento, formas de induzi-las e a se diferenciarem em tecidos, eliminar possíveis riscos e sendo possível a aplicação em tratamentos neurológicos, cardiovasculares, engenharia tecidual entre outras aplicações (6,9,10,11).

Além dos desafios referentes ao domínio, ocorrem também problemas na liberação das pesquisas por causa das polemicas bioéticas e de pensamentos religiosos em questão a destruição de embriões para obtenção de células-tronco embrionárias em que houve por oposição por entidades religiosas; também há a falta de informação, pois o mesmo embrião destruído para fins científicos já seriam destruídos por descarte (12).

2 JUSTIFICATIVA

As células-tronco possuem grande influência no desenvolvimento animal até sua fase adulta. Mais trabalhos retirando os princípios fundamentais das células-tronco são necessários, assim como elencar seus riscos e uso indevido, para divulgar cientificamente seu potencial (8,13).

Mostrar possíveis aplicações clinica terapêutico e de engenharia de tecidos, que trarão uma possível revolução medica no futuro. Nos próximos anos, é possível que alcancemos a cura de doenças como *Alzheimer*, *Parkinson*, diabetes e várias outras doenças degenerativas. Além destes tratamentos terapêuticos, a célula-tronco tem um possível potencial para produção de órgãos em laboratório, o que contribuirá muito em transplante feitos com o próprio material genético do paciente reduzindo rejeições (3,5,10).

3OBJETIVOS

- Revisão bibliográfica referente as célula-tronco, utilizando portais eletrônicos científicos para levantamento de publicações.
- Descrever avanços na aplicação, obtenção e controle das células-tronco, e seus possíveis usos clínicos.
- Descrever a interação do microambiente celular na alteração do comportamento e morfologia das células-tronco.

4 ORIGEM E DESENVOLVIMENTO DAS CÉLULAS-TRONCO

Sua origem ocorre através da fusão entre o espermatozóide e o óvulo fertilizado, esta é a primeira célula deste possível indivíduo, sendo chamada de célula-tronco totipotente. Ela se replicara várias vezes, resultando num aglomerado de células totipotentes chamado de mórula, tendo o potencial de cada célula deste aglomerado originar um novo indivíduo (1,2).

Estas células não possuem uma especialização ou diferenciação, mas com uma indução específica tem a capacidade de se especializar em qualquer linhagem celular, originando os folhetos embrionários mesoderma, endoderma, ectoderma, germinativas, trofoblasto, dentre eles o blastocisto que origina as células-tronco pluripotentes ocorrendo redução de seu potencial de diferenciação. Pode se diferenciar apenas nos tecidos embrionários (14,15).

Após a formação do feto, essas células ficam mais maduras, tornando-se multipotentes, subdividindo-se em hematopoiética e mesenquimal. Elas têm o potencial de se diferenciar de acordo com o local onde estão condicionadas, com a função de construção e regeneração de tecidos. Ambas as células-tronco possuem poder de renovação, podendo uma célula-tronco dar origem a duas células-tronco de mesma potência (divisão simétrica) ou de potência diferente ou às células especializadas formando tecidos ou ainda podendo uma das células filha está com mesmo potencial da célula mãe e outra não (divisão assimétrica) (2,5,14,15).

FIGURA 1-CINÉTICA DAS CÉLULAS-TRONCOS. FONTE: MICALOSKI, LUCAS MIGUEL

O comportamento das células-tronco vai depender de seu microambiente, onde ocorreram através de secreções da própria célula-tronco de mesma potência, potências diferentes ou ainda de células já diferenciadas formando interações em forma de estímulos que levaram a célula apenas a se replicarem ou a se induzir em outros tipos de células, através de moléculas sinalizadoras chamadas citocinas (grupos de moléculas constituídas por proteína e outras moléculas ligadas a ela, tendo como função a sinalização). Que expressas por células diversas, funcionam como um comunicante se ligando em receptores de superfície, podendo promover certo comando que fará a célula-tronco se replicar ou na ativação ou desativação de genes levando a célula-tronco a se especializar em um determinado tecido (5,13,14,15).

Desde a origem do embrião, vem ocorrendo uma série de diferenciação de células-tronco em outras células, mas para que ocorra essa alteração da célula é necessário algo que faça essa indução que pode ser de várias formas; na gravidez esse processo é conhecido como embriogênese, da forma em que a membrana celular estimula a ligação de mediadores a seus receptores o citoplasma estimulado pela membrana transmite até o núcleo ativando fatores de transcrição, onde serão expressos genes para a produção de proteínas que irá determinar o comportamento da célula (13).

4.1 Células-Tronco Hematopoiéticas

Progenitora das multipotentes tem sua origem desde o embrião, produzindo vários tecidos e sendo mantidas após o nascimento do feto onde atuaram na regeneração de alguns tecidos e na produção de células de vida curta. As células-tronco hematopoiéticas estão em pouca concentração nos organismos dos mamíferos após o nascimento, apenas encontradas na medula óssea aproximadamente 0,01% a 0,05% e no sangue periférico menos de 0,001% (5).

São conhecidos três tipos: as LT-CTH que possuem capacidade de auto renovação a longo termo, e indefinidamente responsáveis por produzir células para todo o sistema hematopoiético, as CT-CTH, com capacidade de auto renovação a curto-termo, e as PM, que são incapazes de se renovar. Possuem poder de

diferenciação limitada em células do tecido sanguíneo e de sistema imune, tendo as células-tronco hematopoiéticas que se diferenciam em células comuns mielóide (eritrócitos, plaquetas, dendríticas, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos) e linfóide (linfócitos B e T, dendríticas e células NK) (15,16,17,18).

Na *hematopoiese*, a regulação ocorre através do microambiente, por interação entre outros tipos de células que secretam substâncias como as citocinas. Estes comunicadores celulares possuem afinidade por receptores de superfície das hematopoiéticas promovendo regulação de várias funções, como *quiescência*, auto-renovação, diferenciação, apoptose, e mobilidade. Ao se exporem a estímulos IL-3, IL-6 (*interleucinas*), SCF, TPO, FLT-3 (moléculas protéicas sinalizadoras), as hematopoiéticas são estimuladas a diferentes funções (5).

Muitos genes influenciam a cinética das células-tronco hematopoiéticas, os mais importantes são os genes que codificam fatores de transcrição (*hoxb4*), genes que codificam moléculas de sinalização (citocinas hematopoiéticas, proteínas da família WNT, receptores da família *notch*), e os genes que regulamenta o ciclo celular. Os *hoxb4* possuem a capacidade de aumentar a auto-renovação das hematopoiéticas, já o sinalizador WNT (molécula que se liga a receptores *Frizzled* estimulando proliferação celular), estando ausente a *b-catenina* Intracitoplasmática sofre degradação pelo *proteossomo*, após os ligantes WNT sinalizarem é inibido a degradação *b-catenina* (complexo protéico *beta-catenina*) e seu acúmulo transloca para o núcleo com o fator de transcrição TCF (família de proteínas ligantes ao DNA), regulando vários genes. Várias proteínas WNT e frizzled são expressas indicando efeitos paracrinós e autocrinós dos ligantes como *WNT5A*, *WNT2B*, *WNT10B*. Por outro lado, *P16/ARF* (inibidor de cinase 2A dependente de ciclina, múltiplo supressor de tumor 1) inibem a proliferação das hematopoiéticas induzindo sua *apoptose*, sendo revertido pela expressão de *Bmi1* que é repressor de *P16/ARF* (5).

4.2 Células-Tronco *Mesenquimais*

São progenitoras das multipotentes, estão na maioria dos tecidos adultos e possuem capacidade de auto renovação e de especialização em todas as células de origem mesodérmica entrecartilagosos, ósseos, e adipócitos, dão suporte em diferentes tecidos como medula óssea, tecidos adiposos. São células que possuem grande afinidade por inflamações, podendo até haver migração para tecidos lesados, fazem secreção de *citocinas* com propriedades antibióticas, antiinflamatórias e de fatores de crescimento por moléculas bioativas (2).

Possuem ação regenerativa em uso clínico humano para tratamento de queimadura de pele, úlceras de membros inferiores, lesões oftálmicas. Devido às células-tronco mesenquimais apresentarem capacidades imunossupressoras, auto-renovação e diferenciação em células de vários tecidos há uma grande variedade de uso em terapias em que se implantam células exógenas em tecidos e sistemas lesados, tratando doenças como diabetes, isquemia, doenças neurológicas, e muitas outras (8,14,20).

As células-tronco *mesenquimais* podem liberar ou receber secreções em resposta a estímulos pró-inflamatórios, *hipoxicos*, exposições a fatores de *apoptose*, diretamente ou indiretamente nos tecidos lesionados, atuando na formação de novos vasos sanguíneos, sistemas nervosos, regulamentando ambiente promovendo processos de proteção e reparo. Entre as secreções esta as *citosinas*, *antioxidantes*, proteína da matriz extracelular, hormônios. Observou-se que hormônios secretados por células-tronco *mesenquimais* atuam condicionando o meio e protegendo mesmo a certa distancia neurônios, ocorrendo um efeito neuroprotetivo através de fatores neurotróficos (20,21).

As *mesenquimais* podem se especializam em condrócitos através de fatores TGF sendo o mais potente, IGF-1, BFGF, EGF, PDGF, Wnt (moléculas de sinalização). Na produção de cartilagem é estimulada a produção de proteína de matrix celular e colágeno II através de vias de sinalização intracelular *MAPK* e *Smads* que ativam fatores de transcrição, *SOX9*, *SOX5*, *SOX6* (moléculas ligantes a genes). A indução das células osteogênico ou neural ocorre com o estímulo das BFGF e Wnt endotelial é formado através da estimulação das *VEGF* (factor de crescimento *endothelial* Vascular) (13).

Em cultura *em vitro* de células-tronco *mesenquimais* se diferenciando em *osteoblásticas*, obteve-se o seguinte resultado: usando DEX (*dexametasona*) e ácido ascórbico, as *mesenquimal* começam a se desenvolver obtendo uma morfologia osteoblástica, observou-se a produção de *fosfatase alcalina* e expressões de mRNA de proteína matriz óssea e acúmulo de *hidroxiaapatita* mineralizada, após 16 de cultivo nestas condições, aparece um acúmulo de matriz calcificada na superfície da placa, confirmada por coloração *von kossa*. Essa indução ocorre através DEX e com um cofator que é o ácido ascórbico que faz a *hidrolização* de resíduos de *prolina* e *lisina* no colágeno aumentando a produção de matrizes de proteínas do osso não-colagenoso (14,16). Aplicação nas doenças neurodegenerativas obteve resultados

eficazes, onde além de regular a inflamação ocasiona os benefícios além do objetivo, como aumento neuronal, redução de radicais livres e *apoptose* (22,23).

Estudos apontam que as *mesenquimais* possuem a capacidade de migrar para locais lesionados através de mecanismos que envolvem a expressão de receptores específicos que facilitam a chegada em tecidos afetados, a forma que a células-tronco *mesenquimal* chega ao tecido lesado chama-se “*homing*”, uma forma de aplicação é de forma intravenosa, a eficiência do tratamento vai depender do maior número possível de células-tronco *mesenquimais* alcançadas no sítio-alvo (22).

FIGURA 2-INTERAÇÃO DO MICROAMBIENTE. FONTE: BLOOD ADVERTISEMENT

7 FONTES DE CÉLULAS-TRONCO

Fonte de células-troncos:	Tipo de célula-tronco				Banco de células
	Totipotente	Pluripotente	Multipotente		
			Hematopoiéticas	Mesenquimal	
Polpa de leite		X		X	X
Liqui/ amniótico				X	
Cordão umbilical			X		X
Sangue periférico			X	X	X
Embrião		X			X
Adiposo				X	
Clonagem terapêutica	X	X			
Indução inversa		X			

FIGURA 3-TABELA DE FONTES DE CÉLULAS-TRONCOS. FONTE: (49,50,51,52,53,54,55,56,57,58)

5 CONTROLES GENÉTICOS E APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS

O cultivo de células-tronco necessita de critérios com qualidade, confiabilidade, e rastreabilidade, para que não haja diferenciação indesejada ou perda de função, como induzir a cânceres. As células-tronco embrionárias são mais raras, já as *mesenquimais* são de mais fácil acesso, mas por serem adultas apresentam dificuldades em cultura por algumas vezes pode haver a perda da enzima responsável pela imortalização, a enzima *telômerase*.

In vitro, podem ocorrer dois aspectos: redução do tempo de vida das células-tronco que entram *senescência* e após *apoptose* e a fase de crise e transformação neoplástica, a senescência está associada ao encurtamento dos *telômeros* e após seu interrompimento de ciclo celular podendo mais tarde ocorrer *apoptose*. Na neoplástica poderão ocorrer mudanças estruturais nos cromossomos, como deleções, translocações e inversões, ocorrendo expressões anormais de vários genes, perdendo a especialidade celular e desenvolvendo um possível câncer. Para o monitoramento destas células é necessário através de cultivo e congelamento da primeira até a vigésima passagem a aplicação de bandeamento G, SKY. O bandeamento G seria para detectar alterações numéricas e estruturais nos cromossomos obtidos na passagem de culturas. Já a técnica SKY tem a função de caracterizar ganhos ou perda de material cromossômico de alta resolução, de ordem de 1MB (24,25,26,6).

FIGURA 4-BANDEAMENTO G. FONTE: TEXT & IMAGE.

5.1. Enzima *telômerase*

Na extremidade linear do DNA dos vertebrados, estão os *telômeros*, que são várias repetições de bases nitrogenadas tendo sua principal função de proteção do cromossomo, impedindo que ele seja danificado. A cada mitose, o *telômero* fica menor, devido a perdas de bases. Em uma célula somática, após 54 mitoses, ocorre o fim do *telômero*, fazendo que essa célula entre em *senescência* e talvez *apoptose*, ocorrendo à degeneração de tecidos funcionando como um relógio biológico (12,26).

Algumas células como as tronco, germinativas e de tumores, apresentam uma proteção dos *telômeros* em que uma enzima chamada telômerase onde recupera as sequências perdidas do telômero. Nas células-tronco, a atuação destas enzimas telômerases são mais fortes nas totipotentes e vão enfraquecendo até se tornarem multipotentes, em especial as hematopoiéticas estão bem suscetíveis a perda dos telômeros por baixa atuação da telômerase(26,6,28).

FIGURA 5-ENZIMA TELOMERASE. FONTE: BOX, JESSICA A; BUNCH, JEREMY; ET AL.

5.2 Células-tronco de câncer

Evidências apontam à existência de células-tronco cancerígenas, em várias características as duas se parecem como na capacidade de auto-renovação, possibilidade de se diferenciar, grande expressão de *telomerase*, evasão do *apoptose*, aumento do transporte de substâncias através da membrana, capacidade de migração. Há três hipóteses da origem desta célula-tronco cancerígena, em que as células-tronco multipotentes sofrem mutações se tornando células-tronco cancerígenas, outra hipótese seria que célula já diferenciada sofreria uma indução inversa proporcionando a elas uma pluripotência, e a última hipótese seria uma fusão rara entre células multipotentes e outras células (8).

Ao contrário das células-tronco multipotentes, essas células-tronco cancerígenas possuem poder de divisões ilimitadas, além de serem resistentes a quimioterapias e radioterapias, mesmo após uma cirurgia de retirada de um suposto tumor, é provável que haja metástases e ocorram mais outros tumores em outros lugares (8,30,31).

6 APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS

Com o intuito de obtenção fácil de fontes de células-tronco com o potencial das embrionárias foram desenvolvidas células-tronco com indução reversa através de células somáticas; além dessa forma está sendo usada clonagem terapêutica onde é possível a obtenção das totipotentes, possuindo a possibilidade de ter células quantitativas e qualitativas (32,33).

6.1 Células-tronco pluripotente através de indução inversa

Pesquisa feita através de identificação de fatores *Oct4*, *Sox2*, *c-Myc*, e *Klf4*, em que desenvolvem um mecanismo de des-diferenciação em que faz uma célula somática de uma pessoa podendo já estar adulta a se induzir de forma inversa se transformando em uma célula pluripotente, tornando uma célula já diferenciada em uma célula pluripotente não especializada tendo poderes imortais e de se replicar indefinidamente, gerando inúmeras células pluripotentes (divisão simétrica) ou

gerando células pluripotentes especializadas (divisão assimétrica). No início da pesquisa se obteve a pluripotência induzida através de um carregador viral, integrando genoma viral no DNA das células receptadora. Infelizmente, devido à junção do DNA viral, ocorreu o desenvolvimento de tumores e expressões residuais de fatores exógenos.

Outros métodos foram desenvolvidos, deixando de ser usado um vetor viral, usaram-se outras substâncias como facilitadores de entrada na célula alvo, através de cauda de arginina (peptídeo penetrante da célula), sendo sobre expressas na linha celular HEK293, sendo possível a indução inversa para pluripotência através de proteínas penetrantes juntos fatores de transcrição induzindo a ativação genes que promovem pluripotência e desativando genes da diferenciação (32,34).

6.2 Clonagens para fins terapêuticos

A clonagem acontece naturalmente nas bactérias que consiste em originar células-filhas idênticas. Em métodos sintéticos o primeiro clone depois de várias tentativas foi utilizando material de uma ovelha, o famoso caso Dolly. O experimento de clonagem consiste em duas formas: a clonagem reprodutiva e a clonagem terapêutica (33,35).

A clonagem reprodutiva consiste em descartar o núcleo de um óvulo e encetar no lugar dele um núcleo de outra célula somática podendo ser até de outro indivíduo, após esse óvulo com núcleo injetado é introduzido em um útero de aluguel, podendo gerar um embrião e após um feto que nascera idêntico ao indivíduo do núcleo da célula somática (35).

Já a de clonagem terapêutica consiste em retirada do núcleo de uma determinada célula somática do paciente que necessita de um determinado tratamento regenerativo, após é colocado no lugar do núcleo do óvulo que foi retirado, ocorre várias divisões destas células, assumindo um comportamento totipotentes e após são usados para meios terapêuticos (25,35).

São várias as vantagens deste método, sendo que não há rejeição, pois foi usado o material do próprio paciente, em questão quantitativa, poderá ser replicada a quantidade necessária já em questão qualitativa a célula totipotentes tem o comportamento igual ao natural, tendo boa replicação e diferenciação, mas não se sabe em questão a seus *telômeros* tendo como exemplo a clonagem da ovelha Dolly

que teve seus *telômeros* gastos antes do tempo. Já relevante a leis, esse método nem sempre é permitido, pois algumas vezes está associada em polemicas, onde ocorre já a proibição em vários países (31,33,36).

FIGURA 6-CLONAGEM TERAPÊUTICA. FONTE: MICALOSKI, LUCAS MIGUEL.

6.3 Aplicações clínicas de células-tronco na engenharia tecidual

Com objetivo de produção de tecidos e órgão *in vitro*, estão em desenvolvimento vários tipos de biomateriais poliméricos com função de sustentação e formato de um órgão em que se faz a cultura de células entre esses polímeros, em que são temporários, sendo biodegradáveis ao ponto que as células do tecido vão se especializando e formando o tecido esses polímeros se degradam em macromoléculas sendo um material bioabsorvível, são eliminados por via metabólica sem deixar resíduos colaterais, ou bioreabsorvível quando suas macromoléculas são excretadas, em ambas são baixas taxas de incompatibilidade. Podem também interagir provocando uma resposta fisiológica como crescimento e diferenciação no sitio de implantação (3,9,37).

Entre os polímeros bioreabsorvíveis mais usados estão os derivados de *α-hidróxi*, *poli* (D-ácido lático), o *poli*(DL-ácido lático), o *poli*(ácido glicólico) e a *policaprolactona*, sendo degradados de forma balanceados por hidrolise (9,37,38).

Foi elaborado um experimento em que se sintetiza um tecido cutâneo sustentado e estruturado por arcabouços de polímeros, em que se usou com estímulos citoquímicos para ocorrer diferenciação de células *mesenquimais* retiradas tecido adiposo do abdômen de uma paciente, após elas foram cultivadas em duas estruturas bi laminar composto por PVA/colágeno-AH com concentração de 5×10^4 células/ml; após 14 dias a membrana PVA teve como resultado uma superfície lisa

mimetização da pele sendo utilizada como análogo para a epiderme enquanto que o arcabouço de colágeno/AH ficou poroso podendo haver interação entre as células. Em questão as características mecânicas do tecido obtido, resultou em PVA elasticidade $2 \times 10.5 \text{ N/m}^2$, semelhante com a da pele humana (3).

FIGURA 7-IMPRESSORA E IMPRESSÃO DE OSSO E ORELHA. FONTE: FERRIRA, NICOLAU.

6.4 Aplicações regenerativas em tecidos cardiovasculares

Em um relato de caso, através de um tratamento experimental, feito nos hospitais Pró-cardíaco e hospital Miguel Couto, 24 pacientes com infartos foram submetidos a retiradas de células da própria medula óssea; após foi colocado cateter guia até a artéria coronária relacionada ao infarto, onde foram injetadas células-tronco durante certo período de tempo aparentando um resultado viável e seguro tendo boa regeneração do tecido danificado, mas havendo necessidade mais estudos sobre a aplicação (24,25). Apenas duas fontes de células-tronco foram utilizadas em pacientes até o momento, as de musculatura esquelética (origem de mioblastos) e de medula óssea, promovendo grandes chances de terapias, mas ainda pouco se sabe na melhor via para transplante, concentração injetada, não se sabe se certo tratamento e cultura destas células com supostos ativadores no do tecido desejável (40,41).

6.5 Aplicações regenerativas em Tecidos neurológicos

Em experimento feito em ratos *Wistar* submetidos à lesão da coluna vertebral, alguns não havendo tratamento algum e outros sendo tratados com células-tronco

de cordão umbilical humano, possuindo concentrações de células-tronco hematopoiéticas e *mesenquimais*. Em alguns ratos cinco dias após a lesão espinhal, foram injetadas via administração intravenosa, ocorreram melhoras nos déficits comportamentais, onde foi observada a diferenciação de algumas células do cordão umbilical em células neuronais melhorando a regeneração *axonal* e função motora.

Em outra forma, notou-se que ratos que foram submetidos à injeção de células-tronco logo após a lesão tiveram resultados menores aos que foi submetido à injeção de células-tronco após nove dias, em hipótese, esse resultado após nove dias foi obtido devido processos inflamatórios que favorece a sobrevivência das células-tronco transplantadas. Em comparação, com os ratos que receberam tratamento, todos tiveram que tiveram recuperação funcional significativa muito acima dos que não tiveram tratamento com células-tronco (10).

Entre outras patologias neurológicas estão as de *Alzheimer* e *Parkinson* que são doenças incuráveis ocorrendo em ambas à degeneração de tecidos neuronais, sendo a terapia com células-tronco a maior esperança de tratamento. No mal de *Parkinson* tem como característica tremedeira e mau funcionamento motor, esses sintomas estão ocasionados devido a *apoptose* de neurônios *nigra* que é responsável pela produção de dopamina substancia essencial nas sinapses dos movimentos, sendo que a falta acarreta em mal de *Parkinson*. Já na de *Alzheimer* ocorre de forma irregular um acúmulo de proteínas b-meloide formando placas e inflação ocasionando em degeneração neuronal ocasionando em perda da memória gradativamente (39,42,43,44,45).

6.6 Diabetes *mellitus* 2

Podendo atuar sobre dois mecanismos patogênicos, sendo a resistência para a ação da insulina e a disfunção secretora das células b-pancricas ocorrendo através de forma genética ou por fatores ambientais como a obesidade. Através de estresse oxidativo, deposito amilóide, glicotoxicidade, lipotoxicidade, inflamação, estresse do reticulo endoplasmático rugoso ocorre a apoptose das células b-pancreaticas reduzindo sua massa e a secreção de insulina.

Através de uso de células-tronco pluripotentes e multipotentes, foram desenvolvidas pesquisas com o intuito de se aumentar a quantidade e funcionalidade das células b-pancreáticas em ratos com diabetes mellitus 2, em que foi demonstrado por Soria e colaboradores, células pluripotentes implantadas no baço de ratos se diferenciaram em células secretoras de insulina sendo capazes de produzir normoglicemia.

Kojima e colaboradores, observação células produtoras de insulina extra pancreáticas em ratos hiperglicêmicos tratados com células-tronco multipotentes derivadas da medula óssea.

Ende e colaboradores obtiveram redução na glicemia, maior sobrevida e atenuação de lesões renais em ratos obesos através de tratamento com células-tronco derivadas do cordão umbilical humano. Foi obtido um bom resultados em vários experimentos em ratos, mas em humanos em questão de experimentos relata poucos casos sendo talvez por não for viável por algumas dificuldades existentes como sincronizar as células induzidas na produção de insulina com a necessidade do metabolismo, além de que atualmente há pouco conhecimento em relação ao mecanismo de diferenciação, proliferação, regeneração, e plasticidade das células b-pancreáticas, também não se sabe se há alguma célula-tronco progenitora de b-pancreática ou se elas são auto-renováveis(46,47,48).

8 POLEMICAS E LEIS REFERENTE MANIPULAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO

Por um sentimento religioso e pensamentos supostamente éticos, talvez por falta de informação, há momentos que as pesquisas com células-tronco geram polêmicas em relação a sua manipulação; por serem as mais viáveis em pesquisas e usos terapêuticos para obtenção é necessário a destruição do embrião, esta é a razão em que se discute o direito à vida do suposto embrião considerando ele um humano. Segundo a Lei nº 10.406 de 10 de Janeiro de 2002 art. 2¹:

A personalidade civil da pessoa começa após nascimento com vida; mas a lei põe a salvo, desde a concepção, os direitos do nascituro.

¹Código Civil - Lei 10406/02. Disponível em < <https://www.jusbrasil.com.br/topicos/10731286/lei-n-10406-de-10-de-janeiro-de-2002> > Acesso em 30.nov.2017.

A partir do nascimento adquire os direitos e deveres, mas a lei também resguarda os direitos do nascituro que é considerado como ser humano cujo nascimento se espera como certo e do desenvolvimento de um útero. Várias leis de biossegurança foram desenvolvidas com os avanços das ciências, em que na fertilização *in vitro*, em que são formados embriões em laboratório com o intuito de selecionar os melhores para uma possível gestação na paciente, os que sobram são congelados e após três anos são descartados; no caso desta manipulação de fertilização *in vitro* a lei diz que o embrião resultante sem ter havido a transferência para o útero materno não é nem pessoa nem nascituro. O intuito das pesquisas e aplicações clínicas é de utilizar embriões inviáveis que possuem riscos de aborto ou malformação cromossômica e uso de embriões congelados a partir de três anos, todos doados pelos genitores (12,59).

No Brasil mesmo após muito debate e tentativas de proibição do uso das células embrionárias a lei brasileira² impõe que:

Lei n.11.105, promulgada em 24 de março de 2005, sobre biossegurança, dispõe no artigo 5, que é permitido para fins de pesquisa e terapia, a utilização de células-tronco embrionárias obtidas de embriões humanos produzidos por fertilização *in vitro* e não utilizados no respectivo procedimento.

Os embriões devem ser inviáveis ou congelados a mais de três anos, obtendo também a doação dos genitores do embrião (12,58).

A bioética lançada pelo 'Van Rensselaer Potter' entende que os excedentes dos embriões permitidos pela lei de biossegurança, a liberação para terapias e pesquisas dos embriões devem ser feitas pelos genitores, onde cabem a eles as convicções morais e religiosas (12). Nas legislações internacionais, Estados Unidos e Reino Unido são liberadas pesquisas com células-tronco embrionárias e a clonagem terapêuticas. França, Holanda, Espanha, Portugal, Suíça e Austrália permitem a terapia com células-tronco embrionárias, mas não permitem a clonagem terapêutica.

Na Itália devida as altas pressões da igreja católica, não são liberadas as pesquisas em células-tronco embrionárias. Já na Alemanha são permitidas somente com células-tronco importadas. Em todos os países são proibidos a clonagem humana (12).

² BRASIL, Lei n.11.105. Disponível em <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/ato2004-2006/2005/lei/111105.htm> Acesso em: 30.nov.2017

No Brasil a Lei n 11.105 de 24 de março de 2005, estabelece que é liberado para fins de pesquisa e terapêutico, o uso de embriões de descarte e de congelamento após três anos sem intuito de uso, também com a devida liberação dos genitores; a clonagem terapêutica é também liberada pela mesma lei, ficando proibida a clonagem reprodutiva (48,60,61,62).

9 CONCLUSÃO

Entre vários aspectos são necessário o melhor entendimento do tipo de célula-tronco e sua aplicação sendo notável que: *a)* embrionárias obtêm resultados mais eficazes com menos riscos sendo de mais fácil manipulação, podendo ser usadas a longo tempo e com inúmeras replicações; *b)* multipotentes ao contrário das embrionárias são mais limitadas e de menor controle, subdividindo em *mesenquimais* que são difíceis de controlar por longo tempo podendo ter diferenciação indesejada e as hematopoiéticas que são mais limitadas à formação de células sanguíneas e sistema imune e possuindo seus *telômeros* já reduzidos.

O uso das *a)*, são mais eficazes e de mais fácil manipulação, mas nem sempre é possível seu uso devido a necessidade de destruir os descartes de embrião, resta outras duas formas de obtenção de células pluripotentes, sendo as de clonagem terapêutica que também acaba havendo envolvimento em polemicas da mesma forma dos embriões, restando apenas a obtenção de pluripotentes através de indução reversa de células somáticas, em ambas a rejeição é desprezível por se tratar de material do próprio paciente mas ainda sendo necessário estudos mais aprofundados.

Por outro lado, as *b)* são de mais fácil acesso possuindo várias fonte em um organismo adulto, podendo ser retirado por várias vezes, tendo a possibilidade de haver bancos de células. São vários os relatos de sucesso em diversos tipos de manipulação destas células, mas vale mencionar os riscos que podem ocorrer como *quimerismo*, célula tumoral, *senescência* celular, apoptose celular, encurtamento de *telômeros* obtendo resultado abaixo do esperado ou efeitos colaterais, sendo necessário um domínio maior destas células através da preservação genética através da enzima *telomerase*, o entendimento dos microambientes e sua interação de substancias que ajudariam no controle gênico. No Brasil é liberado uso de

células-tronco de embriões congelados com critérios de descarte e doados pelos progenitores e sem permissão de comercialização, as clonagens terapêuticas também são liberadas, mas sem a intenção de implantação em útero.

Agradecimentos

Agradeço a minha família que me deram apoio e incentivo nas horas difíceis em especial meu pai Pedro Micaloski e meu irmão Luis Micaloski. Sou grato à universidade Campos de Andrade, por proporcionar um ambiente criativo e amigável para estudos. Sou grato a cada membro docente em especial a coordenadora e

professora Daniela Cristina Imig que tanto nos ajudou. Agradeço ao professor e orientador Bruno Gavinho pelo grande ensinamento e dedicação que nos transmitiu. Agradeço aos professores Tiago Burda, Alessandra, Marise Cit, Camila F. Melo, Adriano Gorlat, Flavia Vallent, João Bento, Francine, Dalton, Alan, Ramires, Letícia Mazepa e Karinpela ótima formação que tive. Sou grato aos meus amigos em especial Vitor Ramos, Adriano Rocha, Luiz Garret e Carlos Miller, Damaris Felix, Paula e Vanessa pela grande ajuda e companheirismo que me prestaram.

REFERENCIAS

1. Villamarín, Diego Germán Pérez. Evolução, desenvolvimento embrionário e psiquismo. **Revista Latinoamericana de Bioética**. Rev.latioam.bioet. vol.9 no.2 Bogotá July/Dec.2009.
2. Bydlowski, Sergio P.; debes, Adriana A.; Et Al. Células-tronco do líquido amniótico. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**. Rev.Bras. Hematol. Hemoter. Vol.31 supl.1 São Paulo may 2009 EpubJune 05,2009.
3. Domingues, J.A; Hausen.M; Et Al.Dispositivo Híbrido De Pva/Colágeno/Ácido Hialurônico Cultivado Com Células-Tronco Mesenquimais Para Regeneração Dérmica. **Laboratório de Biomateriais, Faculdade de Ciências Médicas e da Saúde**.PUC/SP, Rua JoubertWey, 290, Sorocaba, São Paulo, Brasil, CEP18030-070.
4. TorrãoI, Andréa S.; MendesI, Cecilia C. Café; Et A; . Diferentes abordagens, um alvo: compreender os mecanismos celulares das doenças de Parkinson e Alzheimer. Departamento de fisiologia e biofísica, Instituto de ciências Biomédicas. Universidade de São Paulo. USP.
5. Abdelhay, Eliana W.F.S., BRAGA, Flávio H. Paraguaçu; ET AL. Célula-tronco de origem hematopoética: expansão e perspectivas de uso terapêutico. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**. Rev. Bras. Hematol. Hemoter. Vol.31 supl.1 São Paulo May 2009 Epub May 08, 2009
6. Gómez, Diego L. Mengual; Armando, Romina G.; Et Al; .Telomerase e telômero: sua estrutura e dinâmica em saúde e doença. Medicina (B.Aires) vol.74 no.1 Cidade Autônoma de Buenos Aires Jan./Feb.2014.
7. Souza, Cristiano Freitas; Napoli, Priscila; Et Al. Células-tronco mesenquimais: células ideais para a regeneração cardíaca? **Rev. Bras. Cadiol**. Invasiva vol.18 no.3 São Paulo 2010.
8. Kabayashi, Natália C. Cristina; NORONHA, Samuel M. Ribeiro;Células-tronco de câncer: um nova abordagem do desenvolvimento tumoral.**Revista da Associação Médica Brasileira**.Rev. Assoc. Med. Bras. vol.61 no. 1 São Paulo Jan./Feb. 2015.
9. Barbanti, Samuel.H; Zavaglia, Cecilia.A.C; ET AL.PolímerosBioreabsorvíveis na Engenharia de Tecidos.**Polímeros:Ciência e Tecnologia**, vol.15,n1,p.13-21,2005.
- 10.RODRIGUES, L.P; INGLESIAS, D.; ET AL. Mononucleares do sangue do cordão umbilical humano promove recuperação funcional após lesão traumática na medula espinhal em ratos Wistar. **Braz. J MedBiol Res**, janeiro 2012, volume 45(1) 49-57.
- 11.Barreto, Madson A. Maximiano; MARINHO, Adriana Alves; ET AL; . As conseqüências da diminuição de dopamina produzida na substância nigra: uma breve reflexão. **Interfaces Científicas-Saúde e ambiente**. Aracatu. V.4. N.1. p.83-90. Out.2015
- 12.Miranda, Maribel Mata; Zapién, Gustavo J. Vazquez; Et Al. Generalidades y aplicaciones de lãs células madre. **Perinatol. Reprod. Hum**. Vol.27 no.3 México ene.2013.
- 13.PINHO, Mauro de Sousa Leite;Células tronco tumoral: novo conceito em carcinogênese colorretal. Revista Brasileira de Coloproctologia. **Ver Brás. Colo-proctol**. Vol.29 no.1 Rio de Janeiro Jan./Mar.2009.

14. Bydlowski, Sergio P; Debes Adriana A.; Et Al. Características biológicas das células-tronco mesenquimais. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**. Rev.Bras. Hematol. Hemoter. Vol.31 supl.1 São Paulo may 2009 EpubJune 05,2009.
15. Junior, Francisco C. da Silva; Odongo, Fatuma C.A.; Et Al. Células-tronco hematopoéticas: utilidades e perspectivas. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**. Rev.Bras.Hematol. Hemoter. Vol.31 supl.1 São Paulo may 2009 Epub May 22, 2009.
16. Payão, Spencer L.M; SEGATO, Rosimeire; Et Al. Controle genético das células-tronco humanas cultivadas. **Ver. Brás. Hematol. Hemoter**. Vol.31 supl.1 São Paulo May 2009 Epub May 08,2009.
17. Vigorito, Afonso C.; Souza, Carmino A. Transplante de células-tronco hematopoéticas e a regeneração da hematopoese. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**. Rev.Bras. Hematol. Hemoter. Vol.31 supl.1 São Paulo July/aug 2009 Epub July 17,2009.
18. Visentainer, Jeane E. Lagula; Sell, Ana Maria; Et Al. Importância de polimorfismos de genes reguladores de citocinas em transplante de células progenitoras hematopoéticas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. Ver. Brás. Cienc. Farm. Vol.44 no. 4 São Paulo Oct./Dec. 2008.
19. MURANSKI, Pawel; RESTIFO, Nicholas P.; Essentials of Th17 cell commitment and plasticity. **Blood Advertisement**. Blood 2013 121:2402-2414; doi.
20. Colpo, Gabriela D.; Ascoli, Bruna M; Et Al. Células-tronco mesenquimais para o tratamento de doenças neurodegenerativas e psiquiátricas. **Canais da Academia Brasileira de Ciências**. An.Acad.Bras.Ciênc. V.87 n.2 supl.0 Rio de Janeiro Aug.2015 Epub Aug 04, 2015.
21. Monteiro, Betânia Souza; Neto, Napoleão M. Argolo; Et Al. Células-tronco mesenquimais. **Ciência Rural**. Cienc.rural vol.40 no.1 Santa Maria Jan./Fev.2010.
22. Lima, Sílvia A.F; Wodewotzky, Thaila I.; Et Al. Diferenciação *in vitro* de células-tronco mesenquimais da medula óssea de cães em precursores osteogênicos. **Pesquisa Veterinária Brasileira. Pesq. Vet. Bras.** (online). 2012, vol.32, n.5, pp.463-469. ISSN 0100-736X.
23. SILLA, Lucia M. R.; DULLEY, Frederico; ET AL. Transplante de células-tronco hematopoéticas e leucemia aguda: diretrizes brasileiras. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**. Rev. Brás. Hematol. Hemoter.vol.32 supl.1 São Paulo may 2010 epub Apr 23,2010.
24. Alves, Endrigo P.; Serakides, Rogéria; Et Al. Isolamento e cultivo de células tronco mesenquimais extraídas do tecido adiposo e da medula óssea de cães. **Ciência Animal Brasileira**. Ciênc. Anim. Bras.vol18 Goiânia 2017 Epub Aug 21,2017.
25. Varella, Dráuzio;. Clonagem humana. **Estudos Avançados**. Estud. Av. vol.18 no.51 São Paulo May/Aug.2004.
26. Perini, Silvana; Silla, Lúcia M.R.; Et Al. A telomerase em células-tronco hematopoéticas. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**. Rev. Bras. Hematol. Hemoter. Vol.30 no.1 São José do Rio Preto Jan./Feb.2008 .
27. CAR, Steven M.; Fluorescent In-situ Hybridization (fish) identification of Human chromosomes-“chromosome Painting”. **Text & image**. 2008 by
28. Sanmartín, Sánchez L.; Perea, Muñoz J.M; Et Al. Avaliação do comprimento de telômeros em cavalos, utilizando a reação cadeia da polimerase quantitativa. **Saúde militar**. Versão impressa ISSN 1887-8571. Sanid mil.vol.70 no.2 Madrid abr./jun.2014.

- 29.Box, Jessica A.; Bunch, Jeremy T; Et Al. Spliceosomal cleavage generates the 3' end of telomerase RNA. **Nature**.456.910-914, 18 december 2008, doi:10.1038/nature07584.
- 30.Magalhães, Geórgia M; Terra, Erica. M; Et Al;. Avaliação da imunomarcacão de células-tronco tumorais em carcinossarcomas mamários e carcinomas em tumores mistos em cadelas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. Pesq.vet.bras. vol.34 no.5 Rio de Janeiro May 2014.
- 31.Waltero, Edgar M. Mongollón; Mello, Marco R. Bourg; Et Al. Clonagem de embriões bovinos a partir de células somáticas. **ORINOQUIA**.on-line version ISSN 0121-3709. Orinoquia vol.18 no.1 Meta Jan./June 2014.
- 32.Chaparro, Orlando; Beltrán, Orietta;. Reprogramação nuclear e células pluripotentes induzidas. **Med Magazine**. Rev. Fac.med.vol.17 no.2 Bogotá julho/dezembro.2009
- 33.Radji, Mohammed A. Mostajo; Ferreira, Leonardo. M.R;CambiandolaIdentidad celular para crear una verdadera medicina personalizada.**GacMed Bol**. v.35 n.2 Cochabamba dic. 2012.
- 34.Gomes, Kátia M.Sanpaio; Costa, Ismael Cabral; Et Al. Células-tronco de pluripotência induzida: papel da epigenética na reprogramação e sua aplicabilidade clínica. **Revista da Associação Médica Brasileira**. Ver. Assoc. Med. Bras. Vol.63 no.2 São Paulo Feb. 2017.
- 35.Zatz, Mayara;. Clonagem e células-tronco. **Estudos Avançados**. Estud. Av. vol.18 no.51 São Paulo May/Aug.2004.
- 36.Ramos, Mauricio de Carvalho.Clonagem humanae ética: o caso clonaid-Raelianos. **HumanClonigandEthics**.
- 37.Solomão, Zenaide; Dias, Carmem, G.B.T.; ET AL.Avaliação de um biotecido de pcl e β -tcp.**Anais do 11º Congresso Brasileiro de Polímeros** – Campos do Jordão, SP – 16 a 20 de outubro de 2011.
- 38.Cardoso, Guinea B. Camargo; Arruda, Antonio C. Fonceca. O papel das células tronco na engenharia tecidual. **Ciências e Cognição**. Ciênc. Cogn. V.14 n.3 Rio de Janeiro Nov.2009.
- 39.Perini, Silvana; Silla, Lúcia M.R.; Et Al. A telomerase em células-tronco hematopoéticas. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter**. Vol.30 no.1 São José do Rio Preto Jan./Feb.2008 .
- 40.Carvalho, Antonio C.C.C; Goldenberg, Regina C.S.; Et Al.Bases da terapias celular em cardiovascular. **Ver. Brás .Hematol. Hemoter**. Vol.31 supl.1 São Paulo May 2009 Epub May 15, 2009.
- 41.Moreira, Rodrigo C; Haddad, Andréa F.; Et Al;.Injeçãointracoronariana de células tronco após infarto do miocárdio. **Subestudo da microcirculação**. Arq. Brás. Cardiol. Vol.97 no.5 São Paulo Nov.2011 Epuboct 07,2011.
- 42.Bettencourt, Rosane; fogliato, Laura; Et Al. Transplante de células -tronco hematopoéticas em linfoma Hodgkin .**Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**. Rev.Bras.Hematol. Hemoter. Vol.31 supl.1 São Paulo July/2009 EpubJuly 22, 2009.
- 43.Pereira, Lygia da Veiga. A importância do uso das células tronco para a saúde pública. **Ciênc. Saúde coletiva**. vol.13 n.1 Rio de Janeiro Jan./Feb.2008.
- 44.Muotri, Alysson Renato;.Células-troncopluripotentes e doenças neurológicas.**Estud av**. vol.24 no.70 São Paulo 2010. Acesso:24\09\2017.
- 45.Sebben, Alessandra Deise; Lichtenfels, Martina; Et Al. Regeneração de nervos periféricos: terapia celular e fatores neurotróficos. **Revista brasileira de Ortopedia**. Ver. Brás. Ortop. Vol.46 no.6 São Paulo 2011.

46. Cristante, Alexandre Fogaça; Narazaki, Douglas Kenji. Avanços no uso de células-tronco em ortopedia. **Ver. Brás. Ortop.** Vol.46 no.4 São Paulo 2011.
47. Leal, Angela M.O; Voltarelli, Júlio César; Perspectivas da terapia com células-tronco para o *diabetes mellitus* tipo 2. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.** vol.32 no.4 São Paulo 2010 Epub Aug 06, 2010.
48. Gimeno, María Laura; Hyon, Sung Ho; Et Al. Terapia celular para o tratamento do diabetes: além das células estaminais. **Medicina (B.Aires).** vol.71 no.3 Cidade Autônoma de Buenos Aires jun.2011
49. Mazzarella, Rosane; GARNICA, Taismara K.; Et Al. Células-tronco derivadas do epitélio olfatório: perspectivas terapêuticas na medicina veterinária. **Pesq. Vet. Bras.** Vol.36 no.8 Rio de Janeiro Aug.2016.
50. Waltero, Edgar M. Mongollón; Mello, Marco R. Bourg; Et Al. Clonagem de embriões bovinos a partir de células somáticas. **Orinoquia.** vol.18 no.1 Meta Jan./June 2014.
51. Pranke, Patricia;. A importância de discutir o uso de células-tronco embrionárias para fins terapêuticos. **Clonagem artigos** .vol.22 n.2 . Braz. Dente .J . Ribeirão Preto.
52. Souza, Verônica F.; Lima, Leonardo M.C.; Et Al. Células-tronco: uma breve revisão. **R.Ci. Méd. biol.** Salvador, v .2, n.2, p.251-256, jul.dez.2003
53. Zutton, Marília S.Rizzo; Wesceslau, Cristiane Valverde; Et Al. Células-tronco de tecido adiposo e a importância da padronização de um modelo animal para experimentação pré-clínica. **Rev. BrasCardiol Invasiva.** 2013;21(3)281-7.
54. Yarak, Samira; Okamoto, Oswando, Keith;. Células-tronco derivadas de tecido adiposo humano: desafios atuais e perspectivas clínicas. Na. **Bras. Dermatol.** Vol.85 no.5 Rio de Janeiro Sept./Oct.2010.
55. Campos, Lorena L.; Alvarenga, Fernanda L.C; Et Al. Isolamento, cultura, caracterização e criopreservação de células tronco derivadas de camada amniótica mesenquimal e de tecido do cordão umbilical de fetuses bovinos. **Pesq. vet.bras.** vol.37 no. 3 Rio de Janeiro mar.2017.
56. Fata, Thalita; SILVA, Verônica N.; Et Al. Membrana amniótica: fonte alternativa de células-tronco mesenquimais em diversas espécies animais. **Pesq. Vet. Bras.** Vol.36 no.6 Rio de Janeiro June 2016.
57. Oliveira, P.G.G; Alves, A.M; Et Al. Uso de células mononucleares da medula óssea no tratamento de tendinites induzidas experimentalmente em equinos. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia. Arq. **Bras. Med. Vet. Zootec.** Vol.63 no.6 Belo Horizonte Dec.2011.
58. Junior, Alfredo. Mendrone. Sangue periférico como fonte de células para terapia celular. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.** vol.31 supl.1 São Paulo May 2009. Epub May 15, 2009.
59. Barroso, Luís Roberto;. Gestaçã de Fetus Anencefálicos e Pesquisas com Células-tronco: Dois Temas Acerca da Vida e da Dignidade da Constituição. **Psnóptica.** Ano 1, n. 7, mar.-abr.2007
60. Aragão, Maria A. Do Carmo; Bezerra, Francisco T. Gomes;. Brasil e as pesquisas com células-tronco: visão geral. **Revista da biologia.** (2012) 9(1):12-15. Publicado 27 dez 12. alзира.carmo@hotmail.com
61. Pranke, Patrícia. A importância de discutir o uso de células-tronco embrionárias para fins terapêuticos. **Clonagem artigos.**
62. Brasil. Lei federal n.11.105, de 24 de março de 2005. Estabelece normas de segurança e mecanismos de fiscalização de atividades que envolvam organismos geneticamente modificados. Presidência da república. 24 de março 2005.
63. Ferreira, Nicolau;. Por favor imprima-me uma orelha. **Público PT.** 16 de fev 2016.