

REVISÃO

<https://doi.org/10.22239/2317-269x.01076>

Perspectivas e desafios regulatórios no uso de células-tronco em métodos alternativos ao uso de animais

Perspectives and regulatory challenges for the application of stem cells in alternative methods to animal testing

Cintia Delai da Silva Horinouchi

Ana Paula Ressetti Abud

Ariane Caroline Paschoal

Crisciele Kuligosvisk

Thamile Luciane Reus

Bruno Dallagiovanna Muniz

Alessandra Melo de Aguiar*

RESUMO

Introdução: Utilizar células-tronco para avaliações toxicológicas parece ser uma estratégia promissora para permitir uma maior predição de efeitos em humanos. Entretanto, no Brasil, não existe legislação específica que regulamente o uso de células-tronco para fins não terapêuticos de desenvolvimento tecnológico, diagnóstico ou como método alternativo ao uso de animais. **Objetivo:** Revisar a literatura e fundamentar um panorama da situação atual do uso não terapêutico de células-tronco no Brasil e no mundo. **Método:** Realizado levantamento bibliográfico não sistemático reunindo artigos científicos e legislação. **Resultados:** Essa revisão traz a abordagem atual da literatura científica e da legislação brasileira e discorre brevemente sobre abordagens regulatórias internacionais no que concerne ao uso não terapêutico de células-tronco. Em contrapartida, a legislação brasileira é bastante abrangente e madura na regulamentação de sangue e hemoderivados e pode servir de modelo para o uso não terapêutico de células-tronco ou outros materiais de origem humana. **Conclusões:** O incentivo do debate pelos órgãos e entidades interessadas é o primeiro passo para iniciar o desenvolvimento de uma legislação específica que permita o desenvolvimento científico-tecnológico do Brasil de maneira a acompanhar os avanços biotecnológicos mundiais.

PALAVRAS-CHAVE: Células-tronco; Biotecnologia; Legislação Sanitária; Regulamentação; Métodos Alternativos

ABSTRACT

Introduction: The use of stem cells for toxicological evaluations seems to be a promising strategy since it allows a greater prediction of human effects. However, in Brazil, there is no specific legislation regulating the use of stem cells for non-therapeutic purposes, technological development, diagnosis or as an alternative method to animal testing. **Objective:** To review the literature and to provide an overview of the current situation of the non-therapeutic use of stem cells in Brazil and in the world. **Method:** A non-systematic bibliographic survey was carried out bringing together scientific articles and legislation. **Results:** This review brings the current approach of Brazilian legislation regarding the non-therapeutic use of human material and briefly discusses international regulatory approaches that allow the non-therapeutic use of stem cells. On the other hand, the Brazilian legislation for use of blood and blood products is quite broad and mature and could serve as a model for the non-therapeutic use of stem cells or other materials of human origin. **Conclusions:** The encouragement of the debate by the interested bodies and entities is the first step to initiate the development of specific legislation that could allow the scientific and technological development of Brazil in order to follow the world's biotechnological advances.

Laboratório de Biologia Básica de
Células-Tronco, Instituto Carlos
Chagas, Fiocruz-Paraná, Curitiba,
PR, Brasil

* E-mail: alessandra.aguiar@fiocruz.br

Recebido: 23 out 2017

Aprovado: 25 abr 2018

KEYWORDS: Stem Cells; Biotechnology; Health Legislation; Regulation; Alternative Methods



INTRODUÇÃO

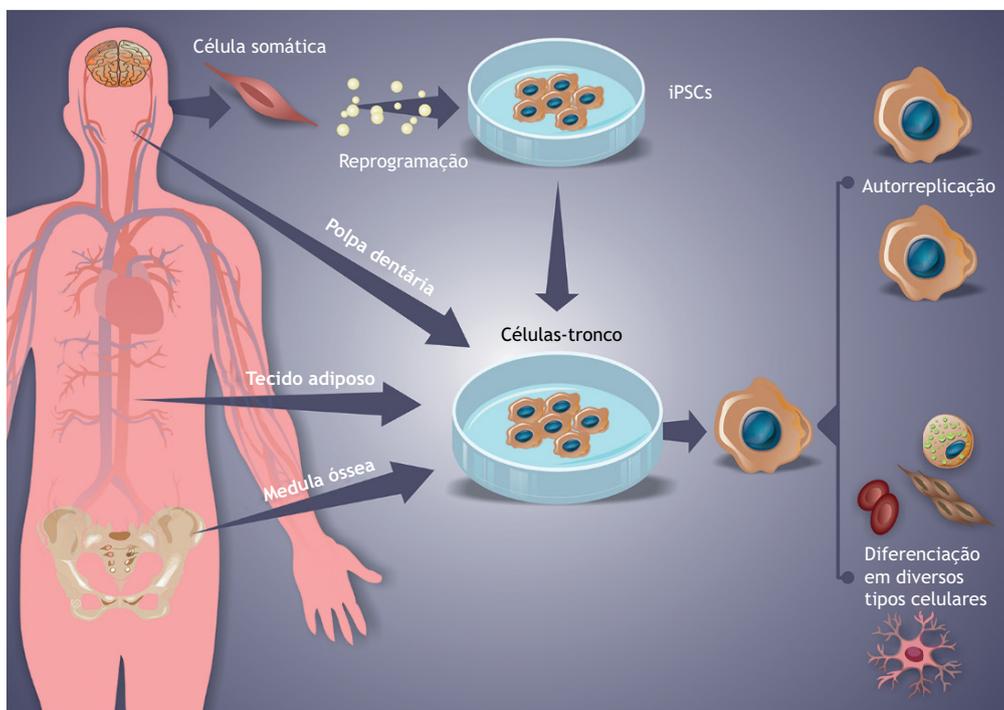
As células-tronco distinguem-se dos demais tipos celulares por duas principais características: o potencial de autorrenovação e o estado indiferenciado que permite a maturação em diversos tipos celulares (Figura 1). A capacidade de replicação das células-tronco faz com que estas células, não especializadas, possam se renovar por meio de divisão celular, mesmo após longos períodos de inatividade¹. Além disso, sob certas condições fisiológicas ou experimentais, essas células podem ser induzidas à diferenciação em células específicas de tecidos ou órgãos². Em alguns órgãos, as células-tronco residentes e tecido-específicas como no intestino, pele e a medula óssea, entre outros, dividem-se regularmente para manter o órgão ou tecidos em condições fisiológicas. Entretanto, em órgãos mais complexos, como o pâncreas e o coração, esses potenciais de autorreplicação e diferenciação celular são reduzidos e ocorrem apenas sob condições especiais³.

As células-tronco têm papel crucial na formação dos órgãos e tecidos durante o desenvolvimento e ao longo do crescimento humano, dividindo-se e diferenciando sempre que necessário para substituir células mortas, contribuindo para a homeostase tecidual⁴.

O potencial de diferenciação das células-tronco varia de acordo com sua fase de desenvolvimento e está diretamente relacionado com sua ontogenia. As células-tronco totipotentes aparecem nos primeiros estágios do desenvolvimento embrionário (na fase de

mórula) e são capazes de se diferenciar e formar todo o organismo, incluindo os anexos extraembrionários, como a placenta⁵. Já as células-tronco embrionárias são derivadas da massa interna do blastocisto e, por serem pluripotentes, possuem a capacidade de dar origem a tipos celulares dos três folhetos embrionários, exceto os anexos extraembrionários^{5,6}. Já as células-tronco somáticas derivadas de tecidos adultos são chamadas multipotentes, oligopotentes ou unipotentes e apresentam capacidade de diferenciação mais restrita, geralmente nos tipos celulares de seu órgão de origem⁷.

A pluripotência das células-tronco embrionárias é uma característica de grande interesse pela sua potencialidade de aplicação na busca de tratamentos para diversas doenças, além de representar um excelente modelo de estudo na investigação de novos fármacos⁵, estudos toxicológicos ou métodos alternativos ao uso de animais^{8,9}. Entretanto, estudos demonstram que o uso de células-tronco embrionárias pode estar relacionado à rejeição tecidual e ao risco de formação de tumores, devido a sua alta capacidade de diferenciação e proliferação¹⁰. Além disso, questões éticas associadas à sua forma de obtenção, que envolve o uso e a destruição de embriões humanos, são bastante relevantes. Não há consenso mundial e a legislação varia em cada país, conforme revisto¹¹. No Brasil, seu uso deve ser realizado de acordo com o que rege a Lei n° 11.105, de 25 de março de 2005, conhecida como Lei de Biossegurança¹².



Fonte: Elaborada pelos autores, a partir da revisão da literatura.

Figura 1. O que são células-tronco? Representação esquemática dos principais tecidos de onde podem ser extraídas células-tronco mesenquimais (CTM) como medula óssea, tecido adiposo e polpa dentária, não menosprezando outras fontes como cordão umbilical e sangue menstrual. Além disso, células somáticas podem ser reprogramadas a fim de obter células-tronco pluripotentes induzidas (iPSC). Uma vez obtidas, as células-tronco de ambas as fontes podem ser mantidas em cultivo através de sua característica de autorreplicação ou induzidas a se diferenciarem em diversos tipos celulares, de acordo com as potencialidades de cada tipo de célula-fonte e os indutores utilizados.



Em busca de alternativas ao uso de células-tronco embrionárias, em 2006, os pesquisadores Kazutoshi Takahashi e Shinya Yamanaka apresentaram uma nova fonte de células-tronco pluripotentes humanas, com o desenvolvimento das células-tronco pluripotentes induzidas (*induced pluripotent stem cell* - iPSC) a partir de células adultas diferenciadas. Alterando os níveis de expressão de quatro fatores de transcrição (Oct3/4, Sox2, c-Myc e Klf-4), foi possível induzir a reprogramação de uma célula somática adulta de forma que ela retornasse ao seu estado indiferenciado¹⁰. Essa descoberta inovadora permite a obtenção de células-tronco pluripotentes geradas a partir de células adultas do próprio paciente com grande potencial de aplicação na terapia celular e medicina regenerativa, tendo como principais vantagens: a tolerância imunológica, uma vez que podem ser derivadas de células do próprio paciente, bem como a ausência de questões éticas associadas ao uso de embriões^{13,14}. Além disso, as iPSC derivadas de pacientes portadores de patologias ainda não totalmente elucidadas podem servir como um modelo eficaz na pesquisa da fisiopatologia dessas doenças e ainda como ferramenta biotecnológica na triagem de fármacos¹⁵. A descoberta e a possibilidade de reprogramação geraram tamanho impacto que, em 2012, os pesquisadores Shinya Yamanaka e John B. Gurdon compartilharam o Prêmio Nobel de Medicina¹⁶.

Entretanto, o processo de geração de iPSC envolve tecnologias que, até o momento, não parecem ser ideais para a aplicação terapêutica. Inicialmente foram utilizados retrovírus e/ou lentivírus para transduzir os genes de interesse, contudo essa abordagem permite a ocorrência de mutações de inserção e transformações potencialmente malignas no cromossomo do hospedeiro ou a indução de respostas imunológicas indesejadas^{17,18}. Novas metodologias envolvendo plasmídeos¹⁹, ácidos ribonucleicos (RNA) sintetizados²⁰ e proteínas²¹ têm sido desenvolvidas e testadas demonstrando resultados promissores. No entanto, os riscos de danos genéticos e de crescimento celular descontrolado ainda não podem ser totalmente descartados, assim como não se pode prever com certeza o destino dessas células quando aplicadas *in vivo*²².

As células-tronco adultas, embora não sejam pluripotentes, e sim multipotentes, oligopotentes ou unipotentes, são capazes de originar um número significativo de tipos celulares específicos, o que as tornam atrativas como ferramenta terapêutica e/ou tecnológica²³. Entre as células-tronco adultas, podemos destacar as células-tronco mesenquimais (CTM), que formam uma população heterogênea de células estromais que apresentam a vantagem de poderem ser isoladas de diversos tecidos adultos²⁴. Essas células são progenitoras, autorrenováveis e com potencial de diferenciação para células de origem mesodermal, como adipócitos, osteócitos e condrócitos⁶. Na maioria dos tecidos, a capacidade de autorrenovação das CTM está diretamente relacionada com a capacidade de regeneração tecidual¹. Acredita-se que, além da capacidade de diferenciação, essas células atuam na modulação das respostas de reparo tecidual de maneira parácrina ao liberar fatores de crescimento e outros mediadores interagindo com o nicho tecidual^{24,25,26}.

As CTM podem ser isoladas praticamente de qualquer tecido (Figura 1) e, embora sejam mais comumente isoladas da medula óssea²⁷, estudos demonstram o isolamento efetivo de CTM de outras fontes, como tecido adiposo²⁸, placenta²⁹, polpa dentária³⁰ e cordão umbilical^{31,32}.

Essas fontes apresentam a vantagem de configurarem material de fácil obtenção, que na maioria das vezes é descartado e normalmente não requer procedimentos invasivos adicionais para obtenção.

As CTM derivadas da medula óssea são as mais estudadas e utilizadas atualmente, entretanto, essas células são geralmente coletadas da crista ilíaca de doadores voluntários e, portanto, o processo de obtenção é considerado invasivo e de baixo rendimento³³. A polpa dentária é considerada uma fonte promissora de CTM para reconstruções ortopédicas e maxilofaciais, pois podem gerar tecido mineralizado, matriz extracelular e outros tecidos conjuntivos³⁴. As células derivadas da placenta e do cordão umbilical apresentam como vantagem uma maior capacidade de autorrenovação quando comparadas às CTM da medula óssea³⁵. O tecido adiposo, por sua vez, tem sido considerado uma das fontes mais abundantes e de fácil acesso para coleta de CTM, as quais apresentam as mesmas características multipotentes das CTM isoladas de outras fontes^{36,37}.

Considerando o uso de células-tronco humanas para finalidades não terapêuticas, no processo de seleção do tipo de célula-tronco a ser utilizado, devem ser avaliadas características como potencial de diferenciação celular (multipotência ou pluripotência) e também a conveniência de obtenção do tecido fonte dessas células, por exemplo, tecidos de descarte ou provenientes de procedimentos não invasivos tendem a ser mais interessantes.

Embora as células-tronco representem uma ferramenta biotecnológica bastante promissora, essa aplicação ainda não é uma realidade concreta em nosso país. Nesta revisão, fazemos uma breve descrição das potencialidades não terapêuticas das células-tronco no desenvolvimento de metodologias de avaliação de toxicidade e métodos alternativos ao uso de animais e descrevemos a situação regulatória atual no país para esse tipo de aplicação. Além disso, citamos modelos regulatórios internacionais para o uso de material humano e a legislação nacional que rege o uso de sangue e hemoderivados como exemplos que possam fundamentar a discussão e o desenvolvimento de regulamentação específica que respalde o uso não terapêutico de células-tronco no Brasil.

MÉTODO

O presente estudo foi desenvolvido em formato de revisão de literatura narrativa. Para tanto, o levantamento bibliográfico foi realizado de maneira não sistemática reunindo artigos científicos e documentos da legislação que pudessem fundamentar um panorama da situação atual do uso não terapêutico de células-tronco no Brasil e no mundo.

A busca pelas referências bibliográficas foi realizada por consulta às bases de dados PubMed e *Google Scholar* empregando palavras-chaves como: *stem cells* (células-tronco), *regulation* (regulamentação), *alternative methods* (métodos alternativos). A legislação brasileira foi consultada através das publicações no Diário Oficial da União e dos portais da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa). Além disso, sempre que necessário, algumas referências (publicações na mídia, artigos e revisões científicos) foram buscadas de maneira direcionada para complementar a discussão dos assuntos abordados.



RESULTADOS E DISCUSSÃO

Células-tronco em métodos alternativos ao uso de animais

O uso de células-tronco em terapias celulares tem sido considerado um grande marco no avanço e desenvolvimento da medicina humana e a regulamentação de seu uso no cenário nacional foi recentemente revista³⁸. Outra grande possibilidade de aplicação, ainda não tão explorada mas muito promissora, é o uso de células-tronco no desenvolvimento de métodos alternativos ao uso de animais, com o foco na aplicação do princípio dos 3Rs: redução, refinamento e substituição³⁹; e também no desenvolvimento de ensaios de avaliação e predição de toxicidade com maior relevância para humanos⁸.

Apenas na Europa estima-se que mais de 12 milhões de animais foram utilizados em experimentação animal em 2005⁴⁰ e estima-se que entre 50 e 100 milhões de animais são utilizados em experimentação animal mundialmente a cada ano⁴¹. Existe uma demanda mundial urgente pela redução e refinamento do uso de animais nas atividades de pesquisa e desenvolvimento. No Brasil, essa realidade tornou-se mais notória após a criação da Rede Nacional de Métodos Alternativos (RENAMA) em 2012 e do Centro Brasileiro de Validação de Métodos Alternativos (BraCVAM) em 2013. Além disso, com a publicação da Resolução Normativa (RN) nº 17, de 3 de julho de 2014, pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (Concea), que dispunha sobre o reconhecimento de métodos alternativos ao uso de animais em pesquisa no Brasil⁴², e no mesmo ano, com a publicação da RN nº 18, de 24 de setembro de 2014, 17 métodos alternativos ao uso de animais em pesquisa foram reconhecidos e deverão obrigatoriamente ser aplicados em substituição aos métodos originais em até 5 anos⁴³. Em 2016, uma nova resolução, a RN nº 31, de 18 de agosto de 2016, adicionou outros sete métodos alternativos reconhecidos à lista original⁴⁴.

Uma das áreas de maior demanda para a introdução de métodos alternativos ao uso de animais é a toxicologia, uma vez que análises do potencial toxicológico são cruciais tanto na fase de desenvolvimento quanto durante os processos regulatório e de validação de novos produtos. Além das questões éticas envolvendo o uso de animais de experimentação, existe um grande apelo econômico para o desenvolvimento de novos testes que tenham maior previsibilidade, uma vez que estudos demonstram que substâncias aparentemente não tóxicas em modelos não humanos podem apresentar alta toxicidade quando aplicadas em humanos, durante testes clínicos⁴⁵. Um exemplo clássico é o caso da talidomida, que durante anos de pesquisa não apresentou qualquer toxicidade reprodutiva em camundongos, mas, ao ser administrada em humanos, promoveu efeitos teratogênicos devastadores na década de 1950^{46,47}. Essa disparidade dos efeitos de uma substância entre humanos e animais ocorre devido à grande diversidade genética, metabólica e fisiológica presente entre espécies, mesmo que possuam proximidade evolutiva⁴⁸.

Portanto, estudos envolvendo células e tecidos humanos se fazem fundamentais na tentativa de suprir essa demanda. Dentro deste contexto, em 2012, Meganathan et al. realizaram um estudo avaliando o efeito da talidomida em células-tronco

embrionárias humanas (hESC). A talidomida apresentou efeitos tóxicos nestas células durante a indução da diferenciação. Desta forma, os autores propuseram este modelo como uma alternativa para a detecção de efeitos teratogênicos de drogas⁴⁹. Esta mesma abordagem foi proposta por outros autores através da avaliação da teratogenicidade da talidomida e de substâncias como o etanol, cafeína, ácido retinoico e lítio⁵⁰.

Já em 1959, Russell e Burch indicavam como alternativa aos testes com animais, modelos celulares para a avaliação de toxicidade. Desde então, muitos ensaios *in vitro* foram desenvolvidos e testados, e atualmente existem vários modelos celulares utilizados em toxicologia. Esses modelos utilizam tanto células primárias quanto células transformadas, sendo que ambas apresentam algum tipo de limitação como baixa taxa proliferativa e acúmulo de mutações gênicas, respectivamente⁴⁸.

As células-tronco são consideradas alvos para o desenvolvimento de modelos com alto potencial de aplicação em ensaios toxicológicos devido as suas características de autorrenovação e de diferenciação⁵¹. Devido a sua capacidade de diferenciação, apresentam potencial para originar uma grande variedade de tecidos o que poderia substituir ou complementar modelos animais, evitando diferenças interespecie. Dessa maneira, essas células têm sido extensivamente avaliadas quanto a sua empregabilidade no desenvolvimento de modelos de toxicidade. Para esse fim, as células-tronco podem ser utilizadas tanto em seu estado indiferenciado, quanto diferenciado e, por isso, apresentam um leque maior de aplicação, o que confere diversas vantagens quando comparadas a outros tipos celulares⁵².

Ensaio toxicológicos baseados em células-tronco são classificados em três categorias: avaliação da toxicidade aguda através da determinação da viabilidade/sobrevivência celular (citotoxicidade); avaliação do efeito inibitório sobre a diferenciação celular (ensaio toxicológicos de desenvolvimento); e avaliação de efeitos inibitórios/estimulatórios sobre funções celulares específicas (ensaio funcionais). Dessa maneira, muitos modelos para avaliação toxicológica podem ser desenvolvidos através da aplicação de células-tronco em cultura⁵³.

Células-tronco pluripotentes induzidas e ensaios de predição da toxicidade *in vitro*

Atualmente existe um único ensaio de toxicidade validado com células-tronco, o *Embryonic Stem Cell Test* (EST). Esse ensaio utiliza células-tronco embrionárias murinas como substrato e avalia tanto a viabilidade celular em comparação com células da linhagem BALB/c 3T3 quanto o processo de diferenciação a cardiomiócitos após exposição a substâncias testes (ECVAM nº 113)⁵⁴. Entretanto, as células utilizadas são provenientes de camundongos e esse método contempla apenas o processo de diferenciação cardiomiogênica. Dessa maneira, faz-se essencial o desenvolvimento e a validação de novos métodos utilizando células-tronco como substrato⁵⁴. Após a publicação do EST, alguns grupos desenvolveram aprimoramentos desse protocolo, visando maior acurácia na avaliação toxicológica. Esses aprimoramentos são bastante promissores para uma melhor avaliação preditiva



de toxicidade, pois possibilitam a análise da expressão de moléculas envolvidas no processo de diferenciação celular^{54,55,56}.

O potencial de diferenciação das células-tronco pluripotentes permite a avaliação toxicológica em diversas linhagens celulares, possibilitando a avaliação de funções celulares específicas como secreção de albumina e armazenamento de glicogênio, bem como capacidade de metabolização de substâncias durante a diferenciação em hepatócitos, causas moleculares das arritmias durante a diferenciação cardíaca e disfunções durante a diferenciação neurogênica^{53,57}. A pluripotencialidade é uma grande vantagem, mas não se deve deixar de considerar que a padronização de processos de diferenciação em diferentes linhagens celulares ainda é objeto de estudo de muitos grupos. Linhagens de células pluripotentes podem apresentar maior ou menor grau de facilidade para a diferenciação. As iPSC possuem como característica manter marcas epigenéticas da célula de origem, o que poderá facilitar ou dificultar o processo de diferenciação em determinada linhagem^{58,59}. Devido a esses desafios, muitos pesquisadores nacionais e internacionais concentram esforços para desvendar e melhor compreender os mecanismos que levam ao processo de diferenciação celular^{60,61,62,63,64}. As células pluripotentes podem se manter em cultura durante longos períodos, o que permite a sua utilização para estudos toxicológicos de doses repetidas *in vitro*, aproximando-se do que é testado no modelo *in vivo* e caracterizando um grande avanço em testes não animais⁶⁵. A desvantagem dessa célula é o valor investido na cultura celular. Os preços dos meios utilizados ainda são altos, o que resulta em uma cultura bastante dispendiosa quando se compara à das células-tronco adultas. Devido a isso, algumas empresas já desenvolveram meios de cultura mais acessíveis e que apresentam a mesma eficiência dos meios tradicionais. Apesar das desvantagens mostradas, o uso das células-tronco pluripotentes, em particular as iPSC^{10,66}, representa um grande avanço para o desenvolvimento de ensaios toxicológicos, podendo servir como modelos para a avaliação de patologias de cunho genético, sem as questões éticas associadas à derivação e uso de hESC mas propiciando a possibilidade da toxicologia e farmacologia personalizadas^{47,57}.

Em 2014, Pistollato et al. realizaram um estudo comparativo utilizando células-tronco embrionárias e iPSC para a avaliação de neurotoxicidade. O estudo demonstrou resultados semelhantes entre os dois tipos celulares, comprovando que as células reprogramadas também representam um modelo promissor na avaliação de toxicidade⁶⁷.

As iPSC podem ser originadas de vários indivíduos, os quais apresentam *backgrounds* genéticos distintos, devido sua origem e seu estilo de vida. Dessa maneira, abre portas para a visualização de uma ação toxicológica mais abrangente, pois uma célula derivada de um único indivíduo não poderá capturar essa grande diversidade genética e epigenética que ocorre na dinâmica das populações. Essas células também podem permitir uma análise toxicológica personalizada, uma vez que podem ser originadas tanto de pessoas saudáveis, quanto de portadores de patologias. Em 2013, Liang et al. avaliaram a cardiotoxicidade em células reprogramadas de pacientes com distúrbios cardíacos hereditários, comparando com indivíduos saudáveis. Através deste estudo, foi possível

observar que células derivadas dos dois grupos de indivíduos exibiram susceptibilidades diferentes a drogas cardiotoxícas, indicando a possibilidade da medicina e toxicologia personalizadas⁶⁸. Atualmente já existem bancos de iPSC que podem ser utilizados para a verificação do perfil genético das populações e também para testes toxicológicos, indicando como a substância atuaria na população como um todo^{69,70}. As iPSC consistem, portanto, em um modelo muito promissor para a toxicologia.

Células-tronco mesenquimais e métodos alternativos ao uso de animais

Além das células-tronco pluripotentes, as células-tronco adultas também representam uma importante fonte de células a serem aplicadas na toxicologia. Scanu et al. avaliaram células-tronco derivadas de medula óssea como substrato para o Método OECD TG 129, ensaio que avalia a viabilidade celular através da captação do corante vermelho neutro pelas células viáveis, e que é recomendado pelo *Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods* (ICCVAM)^{71,72}. Esse mesmo grupo investigou a ação citotóxica de nanopartículas de cobre sobre esse mesmo tipo celular⁷³. Recentemente nosso grupo demonstrou que células-tronco adultas derivadas de tecido adiposo, submetidas ao ensaio de citotoxicidade preconizado pela *Organisation for Economic Co-operation and Development* (OECD), OECD TG 129, representam um tipo celular adequado para a avaliação do potencial citotóxico do painel de substâncias referenciadas pelo ICCVAM⁷¹. Nesse trabalho, as células-tronco adultas demonstraram padrão de resposta semelhante ao apresentado pela célula de referência BALB/c 3T3⁷⁴, mas com a vantagem de serem de origem humana o que aumenta a previsibilidade da toxicidade dessas substâncias em humanos. Em outro estudo do nosso grupo que corrobora o dado acima citado, foi realizada a avaliação comparativa de células-tronco adultas derivadas de diferentes fontes como substrato para avaliação toxicológica. Os resultados mostraram que as células se comportam de maneira semelhante⁷⁵. Além disso, outra vantagem apontada é que os tecidos utilizados como fontes dessas células correspondem a material de descarte, que poderiam ser aproveitados em ensaios toxicológicos. Contudo um dos grandes desafios para aplicação regulatória de células-tronco adultas é a falta de marco legal que verse sobre o uso não terapêutico de células-tronco no Brasil.

Recentemente, Xu et al. realizaram um estudo avaliando a citotoxicidade de nanopartículas de dióxido de titânio utilizando células-tronco adultas derivadas de tecido adiposo e as induzindo à diferenciação adipogênica. Os resultados demonstraram que baixas concentrações destas nanopartículas foram capazes de promover alterações na diferenciação celular. Desta forma, concluíram que ensaios de citotoxicidade baseados em funções celulares especializadas, como por exemplo, a diferenciação celular, proporcionam maior sensibilidade e revelam efeitos indetectáveis por técnicas de avaliação tradicionais, como quantificação de espécies reativas de oxigênio e proliferação celular⁷⁶.

As células-tronco também são uma excelente ferramenta na identificação de substâncias que causem alterações epigenéticas como, mudanças nos níveis de metilação do DNA ou acetilação



de histonas, variantes durante o processamento do mRNA ou modificações pós-traducionais indesejadas, que poderiam transformar as células, fazendo com que perdessem o controle dos seus processos fundamentais como, proliferação, diferenciação, apoptose e senescência^{68,77}. Esse tipo de teste, que avalia alterações funcionais ou da expressão gênica, teria o poder de indicar efeitos ainda mais prejudiciais do que os observados em células diferenciadas, destacando-se a importância do modelo como uma ferramenta mais sensível na avaliação toxicológica.

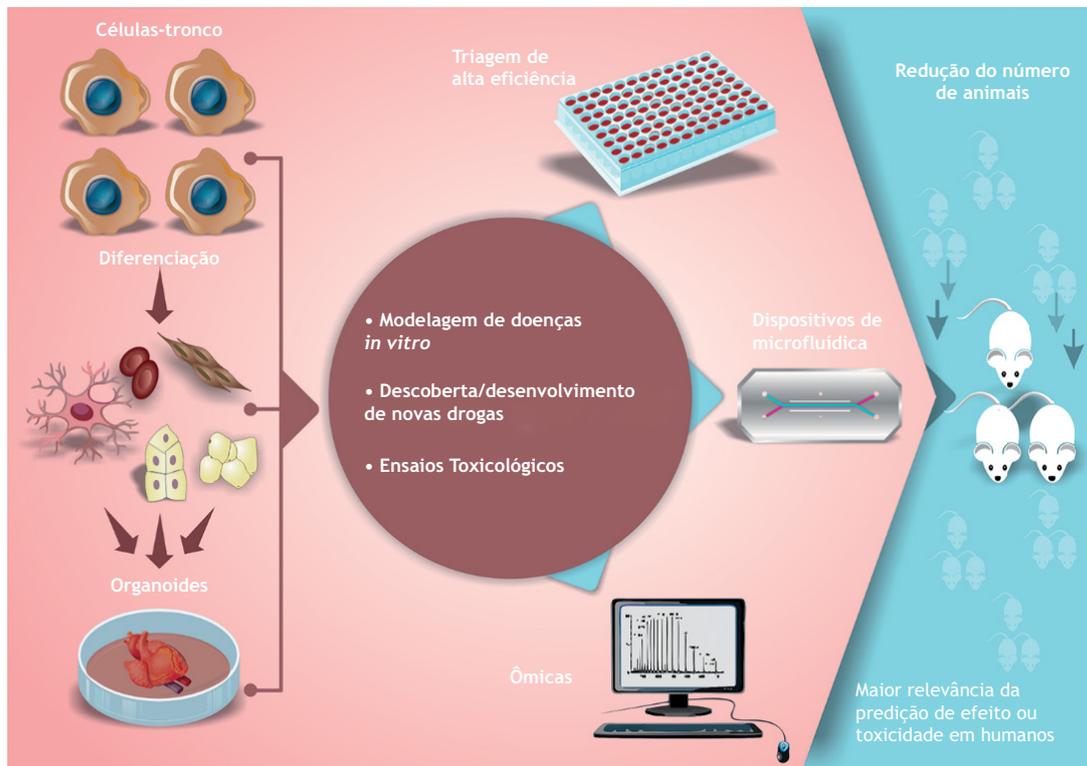
Desenvolvimento de métodos alternativos com maior relevância fisiológica

Apesar das vantagens apresentadas, modelos que utilizam a cultura celular bidimensional tradicional são limitados e criticados, pois não apresentam capacidade de mimetizar as condições reais de um organismo vivo. Embora seja possível observar vários processos celulares que ocorrem nos tecidos humanos, as interações entre as células, matriz, tecidos e órgãos não são consideradas. Procurando suprir essa lacuna, nos últimos anos foram desenvolvidos sistemas que integram vários tipos celulares *in vitro*, utilizando técnicas de perfusão através da microfluídica. Esses sistemas permitem o cultivo tridimensional de miniórgãos, além do cocultivo de diferentes células e estruturas, proporcionando a melhor

simulação das condições fisiológicas em comparação ao modelo tradicional⁷⁸. O cultivo em sistema de microfluídica em plataformas do tipo *organ-on-a-chip*, na qual diferentes sistemas fisiológicos estão interconectados, possibilita a verificação da ação de uma substância em diferentes órgãos simultaneamente⁷⁹. Por possibilitar a utilização de células humanas, esses sistemas deverão prever melhor os resultados que ocorreriam em testes clínicos.

As iPSC são sistemas celulares vantajosos para serem aplicados nas plataformas de microfluídica, pois propiciam o desenvolvimento de órgãos e sistemas paciente-específicos, tornando possível a avaliação toxicológica personalizada⁸⁰. Além disso, permitem a análise toxicológica sobre doenças raras, para as quais não existem modelos de estudo adequados, possibilitando triagem e testes de substâncias em modelos de doenças de difícil tratamento, possibilitando a seleção de substâncias eficazes específicas e a determinação de doses não tóxicas de maneira personalizada^{80,81}.

Considerando os avanços observados no uso de células-tronco como substrato em testes de avaliação toxicológica (Figura 2), as vantagens da utilização dessas células são inúmeras. A toxicologia que utiliza células-tronco como substrato permite a determinação de diferentes formas de toxicidade como: aguda, embrionária, de desenvolvimento, reprodutiva e funcional. Os testes



Fonte: Elaborada pelos autores, a partir da revisão da literatura.

Figura 2. Uso não terapêutico de células-tronco como método alternativo ao uso de animais. Células-tronco humanas, com base em suas características de autorreplicação ou diferenciação celular, ou mesmo a formação de organoides derivados de células-tronco, podem ser utilizadas em diferentes abordagens não terapêuticas para modelagem de doenças, estudo de novas drogas e também ensaios toxicológicos. Diversas abordagens podem ser utilizadas para a avaliação dos dados, entre elas ensaios de triagem em larga escala, abordagens com a utilização de dispositivos de microfluídica ou análises de expressão gênica, de proteínas ou metabólitos, como análises de transcriptoma, proteoma e metabolômica, entre outras. Os principais resultados esperados com o emprego de células-tronco em abordagens não terapêuticas são a redução do uso de animais de laboratório e geração de dados com maior relevância para a predição do efeito ou da toxicidade em humanos.



realizados com células-tronco podem, portanto, ser bastante abrangentes e responder não apenas uma, mas diversas perguntas no processo de desenvolvimento ou regulação de uma nova substância, através por exemplo de abordagens em larga escala que envolvem as “ômicas”, como transcriptoma ou mesmo a toxicogenômica⁸, contribuindo para a melhoria da saúde humana ao mesmo tempo que reduz a utilização do modelo animal⁴⁷. Apesar de promissor, os sistemas de microfluídica são onerosos e em sua maioria experimentais ou em desenvolvimento, não existindo ainda dispositivos validados, embora estudos de validação dos dispositivos já estejam em andamento⁸².

Não há regulamentação brasileira para o uso não terapêutico de células-tronco ou de seus bioprodutos

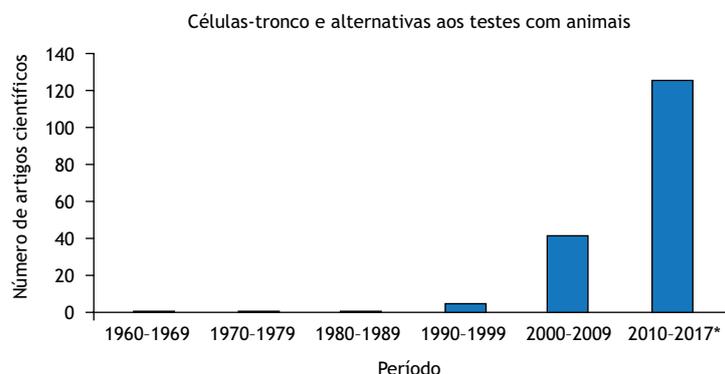
Atualmente é de comum senso que o potencial uso de células-tronco vai muito além de aplicações terapêuticas. As últimas décadas foram marcadas por um desenvolvimento acelerado de técnicas de biotecnologia que trouxeram junto a elas um maior entendimento da fisiologia das células-tronco, tornando possível o emprego cada vez mais efetivo dessas células em terapias celulares e abrindo novas possibilidades de aplicações biotecnológicas. A crescente compreensão de como modular a atividade e manter essas células em condições ideais tem beneficiado áreas biotecnológicas de desenvolvimento de novas drogas, pesquisas fisiopatológicas e diagnósticas, nas quais as células-tronco têm se mostrado ferramentas promissoras com diversas potencialidades para o desenvolvimento técnico-científico⁸³. Esse novo olhar para as células-tronco segue uma tendência mundial em que materiais de origem humana como fluidos, tecidos e células são cada vez mais considerados fontes valiosas de recursos para a pesquisa e desenvolvimento de metodologias diagnósticas e terapêuticas⁸⁴.

Embora os benefícios em se utilizar material humano no desenvolvimento da ciência médica sejam notórios, não se pode negar que esse tipo de atividade traz preocupações éticas, legais e técnicas, uma vez que o Brasil não possui legislação específica que regula a coleta, o armazenamento e o uso de material humano para

fins de desenvolvimento tecnológico, diagnóstico ou mesmo para o uso como método alternativo ao uso de animais⁸⁴. A legislação brasileira parece não ter acompanhado o desenvolvimento científico-tecnológico com a mesma velocidade em que este ocorre. Parece haver uma lacuna entre o marco regulatório e o desenvolvimento científico-tecnológico nesta área e não há legislação brasileira relacionada às práticas que envolvem a aplicação de material de origem humana, como as células-tronco em diagnóstico, desenvolvimento de drogas e ensaios toxicológicos. Na época da promulgação da Constituição Federal de 1988⁸⁵, por exemplo, a aplicação de células-tronco em métodos alternativos ao uso de animais nem era relatada na literatura, entretanto o interesse acerca dessa abordagem foi crescente ao longo do tempo. Nos últimos sete anos, o número de publicações sofreu um aumento de pelo menos três vezes em relação à década anterior, indicando o crescente desenvolvimento científico no uso de células-tronco em métodos alternativos ao uso de animais (Figura 3). Desta forma, é inegável que a evolução do conhecimento científico deva ser considerada para fins regulatórios.

Adicionalmente, a falta de clareza e a ausência de regulamentação específica criam barreiras para a aplicação não terapêutica das células-tronco e sua aceitação para fins regulatórios. Essa questão tem ganhado cada vez mais importância e visibilidade, sendo pauta de discussão entre a comunidade científica, acadêmica, indústria, e órgãos regulamentadores e legisladores⁸⁶. Uma regulamentação consistente que permita a evolução da medicina, da ciência e da tecnologia ao mesmo tempo em que proteja a integridade humana é de interesse da comunidade, de profissionais da saúde, acadêmicos, legisladores, pesquisadores, empresas de biotecnologia, ciências da saúde e outras organizações, uma vez que traz benefícios imensuráveis⁸⁷.

Atualmente, a legislação brasileira regulamenta de maneira satisfatória, dentro do que hoje é tecnologicamente possível e disponível, o uso de células-tronco hematopoieticas humanas para transplantes e terapias celulares. Conforme revisado por Narahashi et al., a legislação ampara através de uma série de resoluções e



Fonte: Elaborada pelos autores, a partir da revisão da literatura.

Figura 3. Evolução temporal do número de artigos científicos disponíveis na base de dados PubMed relacionando os termos células-tronco (*stem-cells*) e métodos alternativos ao uso de animais (*alternative methods to animal testing*). Foi considerado o número de artigos científicos publicados a cada década, desde 1960 até 30 de setembro de 2017. Observou-se que até 1989 não havia publicação na área. Entretanto, nos últimos sete anos, o número de publicações sofreu um aumento de pelo menos três vezes em relação à década anterior, indicando o crescente desenvolvimento científico no uso de células-tronco em métodos alternativos ao uso de animais.



normas técnicas a utilização de células-tronco hematopoiéticas para transplantes e tratamento de uma série de doenças do sangue e pesquisas clínicas, garantindo a segurança do paciente, ao regulamentar a coleta, processamento, acondicionamento, armazenamento, testes de controle de qualidade, descarte e liberação para uso e transporte dessas células. Entretanto, essas normas não contemplam CTM e muito menos o uso de células-tronco para o desenvolvimento tecnológico e fins diagnósticos³⁸.

Ao buscar informações sobre o uso regulatório de células-tronco humanas para fins não terapêuticos na legislação brasileira, o que se encontra é bastante restrito em relação às células-tronco embrionárias, conforme regulamenta a Lei de Biossegurança. Nela estão descritos os limites e as condições para o uso de células-tronco embrionárias na pesquisa básica. Nada é descrito, entretanto, a respeito de células-tronco adultas¹², ou mesmo para a aplicação biotecnológica de células-tronco.

Na ausência de regulamentação específica para CTM, podemos considerar essas células como material biológico de origem humana de maneira geral, e verificar o que diz a legislação em relação ao uso não terapêutico desse tipo de material. Embora a Resolução nº 441, de 12 de maio de 2011⁸⁸, regulamente o estabelecimento e funcionamento de biobancos, ela prevê apenas o uso do material de origem humana para fins terapêuticos e pesquisas básicas acerca da fisiopatologia de doenças ainda não bem compreendidas. Não há, entretanto, regulamentação que considere o uso desse material no desenvolvimento tecnológico ou para fins diagnóstico, onde esse material não irá gerar conhecimento, mas sim, será uma ferramenta metodológica utilizada na rotina médico-hospitalar ou na descoberta ou desenvolvimento de novos fármacos ou produtos⁸⁴.

A Resolução nº 466, de 12 de dezembro de 2012, do Ministério da Saúde⁸⁹, que discorre sobre pesquisa envolvendo seres humanos, sustentada na Resolução nº 441/2011⁸⁸, que estabelece regras para a criação de biobancos, biorrepositórios e uso de material biológico proveniente desses bancos, regulamenta a utilização de biomateriais de origem humana. De acordo com essas normas, o uso deve ser restrito ao que for previamente aprovado em projeto de pesquisa específico e sempre após consentimento do doador do material. Assim, doador e Comissão Nacional de Ética em Pesquisa/Comitê de Ética em Pesquisa (Conep/CEP) necessitam ser notificados e aprovar qualquer utilização distinta da previamente estabelecida e aprovada no projeto inicial^{88,89}. Infelizmente, tais normas não versam sobre o uso desse material como ferramenta tecnológica em kits diagnósticos, ensaios de toxicidade ou demais tecnologias envolvidas na triagem de novas drogas para fins regulatórios. A legislação ainda não acompanha a necessidade regulatória das novas intervenções tecnológicas e científicas trazendo diversos desafios regulatórios para o uso de materiais de origem humana na pesquisa⁸³.

Ao considerar as limitações regulatórias que envolvem células-tronco, os equívocos podem estar já vinculados ao termo “célula-tronco” que atualmente é considerado bastante genérico e gera confusão. O termo é geralmente primordialmente vinculado às células-tronco embrionárias e a tudo que essas trazem de questões éticas e legais, conforme revisto por Diniz e Avelino¹¹.

Entretanto, devemos considerar outras células-tronco como as iPSC, que parecem não envolver tantas questões éticas, e as células-tronco adultas, como as células-tronco hematopoiéticas por exemplo, que há muito tempo têm sido utilizadas na terapia celular⁹⁰ ou para obtenção de hemoderivados seguindo legislação própria, Lei nº 10.205, de 21 de março de 2001⁹¹. Uma vez que se trata de células diferentes com características e principalmente aplicações distintas, os meios de regulamentação do uso dessas células também precisam ser distintos e específicos.

Exemplos internacionais de abordagens regulatórias para o uso não terapêutico de células-tronco

Embora a legislação internacional esteja vários passos à frente da brasileira no quesito “uso de material de origem humana”, refletindo um distanciamento menor entre o estado da técnica e o marco regulatório, a pesquisa com células-tronco e sua aplicação na modelagem de doenças ou na descoberta de drogas, ainda gera discussões éticas e legais no mundo todo. As questões que ainda não estão claras envolvem, por exemplo, as iPSC e células-tronco adultas que podem ter aplicações que vão muito além da pesquisa e terapia celular, fato que parece ser negligenciado nas legislações vigentes⁹⁰. As questões éticas e legais envolvendo a pesquisa com células-tronco não se restringem a destruição ou não do embrião⁹², que parece ser a principal preocupação da população e talvez por isso seja um dos principais pontos contemplados nas legislações atuais. Por exemplo, as iPSC são derivadas de células somáticas adultas que podem ser doadas legalmente para pesquisa e não envolvem o uso de embriões. Entretanto, uma vez transformadas em linhagens celulares que serão armazenadas em bibliotecas e possivelmente utilizadas como biomateriais para fins não terapêuticos, questões relacionadas a privacidade do doador, consentimento e propriedade vão se tornando mais complexas e sem precedentes^{90,93}.

Embora a comercialização de órgãos e tecidos humanos seja proibida na maior parte do mundo, vários países já permitem a comercialização de material de origem humana para fins não terapêuticos, como fruto da atualização da legislação em resposta ao desenvolvimento biotecnológico⁸⁴. Na Europa, o uso de células-tronco para fins não terapêuticos é permitido e sustentado pela Agência Europeia de Medicamentos (*European Medicines Agency - EMA*) que entende que esses produtos se classificam como Medicamentos de Terapia Avançada para uso humano, categoria que inclui produtos de terapia gênica, engenharia tecidual e terapia com células somáticas³⁸. Mesmo assim, ainda existem questões obscuras na regulamentação desse tipo de aplicação. As principais incertezas são acerca do montante e da importância da propriedade intelectual adicionado a um material humano necessários para que esse material se torne um bem comercializável. Alguns países europeus entendem que o dispêndio associado à coleta, processamento e estocagem do material configura propriedade intelectual substancial que justifica o tratamento do material como produto. Isso não quer dizer que não haja ainda preocupação com o sigilo, privacidade e consentimento dos doadores. Esses itens são seriamente considerados e regulamentados pelos códigos de ética que buscam a proteção e integridade do voluntário⁹⁵.



Inicialmente, a regulamentação europeia era mais restritiva, permitindo apenas biobancos conectados a hospitais, o que significava o uso de materiais de origem humana apenas para fins terapêuticos. Entretanto, o crescente desenvolvimento biotecnológico e a pressão da indústria impulsionaram os órgãos legisladores a promoverem alterações nas leis. Em 2008, uma nova regulamentação (EC nº 1.394/2007, de 13 de novembro de 2007)⁹⁶ entrou em vigor para facilitar a comercialização de produtos de engenharia tecidual de origem humana. Uma das principais mudanças que essa nova regulamentação trouxe foi a discriminação entre órgãos e tecidos humanos, ao estabelecer que tecidos humanos, ao contrário dos órgãos, seriam bens comercializáveis. Essa legislação deixa, entretanto, a cargo de cada país-membro da união europeia a regulamentação das questões éticas e legais envolvidas na utilização de material humano para fins não terapêuticos. Assim, cada país tem estabelecido suas próprias regras, e embora a venda de material humano seja proibida de maneira geral, isso não impede que materiais que tenham sido isolados, purificados e minimamente alterados sejam patenteados e comercializados⁹⁴.

Os Estados Unidos (EUA), embora em moldes distintos dos da Europa, também possuem uma legislação que acompanha o desenvolvimento industrial e tecnológico e permite a comercialização de produtos terapêuticos e biotecnológicos provenientes de bioengenharia de tecidos e células humanas⁹⁷. O Ato de Serviço de Saúde Pública (*Public Health Service Act* - PHSA) distingue o uso de células-tronco de acordo com duas classificações: as células que são largamente manipuladas são consideradas produtos biológicos, drogas e dispositivos médicos e reguladas como tais; enquanto que as não manipuladas são consideradas “produtos minimamente manipulados” e tidas como tecnologias de menor risco não exigindo nem aprovação para comercialização³⁸. Além disso, nos EUA, os bancos de tecidos podem retribuir monetariamente pelo recrutamento de doadores (incluindo cadáveres), pela coleta, processamento e armazenamento de materiais de origem humana, incluindo também sangue e gametas. Conforme destacado por Pirnay et al., embora os materiais sejam sempre produtos de doação, hoje se discute a legitimidade de um processo que torna doações voluntárias em um negócio rentável⁹⁴.

Embora a legislação norte-americana possa parecer muito aberta e permissiva, enquanto a europeia ainda não seja homogênea e necessite ajustes, as medidas internacionais, mesmo que imperfeitas, garantem que cidadãos europeus e norte-americanos tenham acesso a terapias inovadoras com maior agilidade⁹⁷ ou, em última análise, não impõem tantas barreiras para o uso biotecnológico de material humano ou desenvolvimento de métodos alternativos ao uso de animais.

Exemplo da regulamentação de sangue e hemoderivados - uma perspectiva para uso de células-tronco para fins não terapêuticos no Brasil?

A doação de sangue é uma prática bastante difundida no Brasil. Além do uso terapêutico direto, o sangue, um material humano proveniente de doadores voluntários, é utilizado inclusive para a obtenção de hemoderivados⁹⁸. Talvez uma análise cuidadosa e a compreensão de como esse material é, muitas vezes, entendido

como um insumo, possam nortear as discussões e trazer perspectivas para o uso não terapêutico de células-tronco, principalmente daquelas células que possam ser obtidas de material de descarte ou através de métodos não invasivos como, por exemplo, através da coleta de urina.

Em um olhar mais detalhado na legislação, a Constituição Federal Brasileira de 1988⁸⁵ é a base norteadora de toda a legislação do país, e na Seção II - Saúde, em seu Art. 199 § 4º, diz:

A lei disporá sobre as condições e os requisitos que facilitem a remoção de órgãos, tecidos e substâncias humanas para fins de transplante, pesquisa e tratamento, bem como a coleta, processamento e transfusão de sangue e seus derivados, sendo vedado todo tipo de comercialização.

A regulamentação desse item da Constituição Federal no que diz respeito ao sangue e hemoderivados foi posteriormente efetivada pela instauração da Lei nº 10.205/2001. Entre outras questões, o artigo 14 do capítulo II que versa sobre Princípios e Diretrizes aborda a doação voluntária de sangue, o veto a comercialização, a permissão da remuneração de custos de insumos, reagentes, materiais descartáveis, entre outros, utilizados no processamento das amostras, além de questões relativas tanto a segurança dos doadores quanto a qualidade das amostras⁹¹. Talvez as diretrizes nacionais relativas ao sangue e hemoderivados possam ser analisadas pelo menos em parte como exemplos, de maneira a servir como ponto de partida para a criação de uma legislação e regulamentação do uso não terapêutico de células-tronco, como por exemplo, no desenvolvimento de métodos alternativos ao uso de animais. Essa abordagem também já foi sugerida por Carias et al., quando os autores fizeram uma revisão da legislação brasileira à época relativa à regulamentação do artigo 199, parágrafo 4º, da Constituição Federal, entre outras, e propuseram que se discutisse um modelo legal semelhante ao gerenciamento de excedente de sangue e hemoderivados para materiais biológicos de origem humana, citando além da aplicação em pesquisa ou em terapia, também seu uso em ensaios toxicológicos⁹⁸.

A determinação dos tipos de material humano que podem ser considerados para o uso biotecnológico das células-tronco também é um ponto favorável à sua utilização. No que se refere às CTM adultas, estas podem ser obtidas de materiais de descarte, que normalmente são resíduos de serviços de saúde. Geralmente, esses resíduos têm como destinação final a destruição e descarte. Entre esses materiais podemos citar tecido adiposo²⁸ proveniente de lipoaspiração ou dermolipectomia, polpa dentária⁹⁹, cordão umbilical^{31,32}, para os quais nenhum outro procedimento invasivo para a obtenção das células é realizado no doador a não ser o que ele inicialmente se dispôs. Ao invés de serem destinados à destruição e eliminação, esses materiais de descarte poderiam ser doados e destinados a laboratórios onde as células-tronco podem ser isoladas. O fácil acesso também é uma vantagem dos tecidos que podem dar origem às células pluripotentes, como é o caso do sangue¹⁰⁰ e até mesmo da urina¹⁰¹. Esses tecidos ou fluidos humanos excedentes, sem valor terapêutico, devem ser considerados de maneira diferenciada, considerando sua fonte e forma de obtenção com a finalidade de serem destinados ao isolamento ou indução de células-tronco pluripotentes.



As informações acima levantadas podem servir como base norteadora aos legisladores quanto aos avanços da ciência e a necessidade de evolução da regulamentação. É fundamental que a ciência e a legislação andem no mesmo passo, a fim de que os progressos da ciência e do desenvolvimento tecnológico possam beneficiar a sociedade com seus avanços. Contudo, não existe uma regulamentação nacional sobre o uso de células-tronco, ou bioprodutos de origem humana para fins de diagnóstico, processos biotecnológicos ou mesmo para substituição do uso de animais, embora, a legislação seja bastante abrangente e madura no tema relativo ao uso de sangue e hemoderivados⁹⁸, e pode, portanto, servir de modelo para as questões ainda não contempladas.

Nos últimos anos, as pesquisas científicas com foco em métodos alternativos ao uso de animais têm buscado não apenas fomentar um uso mais racional de modelos animais, mas também fornecer dados de maior relevância para a saúde humana⁸. As células-tronco de origem humana são apontadas como ferramentas promissoras para atender a essas duas questões principais. Muitos modelos *in vitro* utilizando células-tronco vêm sendo desenvolvidos e apresentam relevância científica⁸, sendo, portanto, necessária e urgente a discussão sobre a possível aplicação e regulamentação do uso desses modelos no cenário nacional, sob o ônus de não acompanhar os esforços mundiais na redução do uso de animais e a oferta de métodos com maior potencial de predição de toxicidade para humanos.

REFERÊNCIAS

1. Fuchs E, Chen T. A matter of life and death: self-renewal in stem cells. *EMBO Rep.* 2013;14(1):39-48. <https://doi.org/10.1038/embor.2012.197>
2. Weissman IL. Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. *Cell.* 2000;100(1):157-68. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81692-X](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81692-X)
3. EuroStemCell. Types of stem cells and their uses. [S.l.]: EuroStemCell; 2017[acesso 10 nov 2017]. Disponível em: <http://www.eurostemcell.org/types-stem-cells-and-their-uses>
4. National Institutes of Health - NIH. Stem cell information. Bethesda: National Institutes of Health; 2016[acesso 10 nov 2017]. Disponível em: <https://stemcells.nih.gov/info/basics/6.htm>
5. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science.* 1998;282(5391):1145-7. <https://doi.org/10.1126/science.282.5391.1145>
6. Fuchs E, Segre JA. Stem cells: a new lease on life. *Cell.* 2000;100(1):143-55. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81691-8](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81691-8)
7. Eckfeldt CE, Mendenhall EM, Verfaillie CM. The molecular repertoire of the 'almighty' stem cell. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2005;6(9):726-37. <https://doi.org/10.1038/nrm1713>
8. Eskes CW, Whelan M, editores. Validation of alternative methods for toxicity testing. New York, NY: Springer; 2016.
9. Picanço-Castro V, Moreira LF, Kashima S, Covas DT. Can pluripotent stem cells be used in cell-based therapy? *Cell Reprogram.* 2014;16(2):98-107. <https://doi.org/10.1089/cell.2013.0072>
10. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell.* 2006;126(4):663-76. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.07.024>
11. Diniz D, Avelino D. International perspective on embryonic stem cell research. *Rev Saude Publica.* 2009;43(3):541-7. <https://doi.org/10.1590/S0034-89102009000300019>
12. Brasil. Lei nº 11.105, de 24 de março de 2005. Regulamenta os incisos II, IV e V do § 1º do art. 225 da Constituição Federal, estabelece normas de segurança e mecanismos de fiscalização de atividades que envolvam organismos geneticamente modificados - OGM e seus derivados, cria o Conselho Nacional de Biossegurança - CNBS, reestrutura a Comissão Técnica Nacional de Biossegurança - CTNBio, dispõe sobre a Política Nacional de Biossegurança - PNB, revoga a Lei nº 8.974, de 5 de janeiro de 1995, e a Medida Provisória nº 2.191-9, de 23 de agosto de 2001, e os arts. 5º, 6º, 7º, 8º, 9º, 10 e 16 da Lei nº 10.814, de 15 de dezembro de 2003, e dá outras providências. *Diário Oficial União.* 28 mar 2005.
13. Yamanaka S. A fresh look at iPS cells. *Cell.* 2009;137(1):13-7. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.03.034>



14. Bhartiya DN, Sriraman K, Shaikh A. An overview of pluripotent stem cells. In: Bhartiya D, editor. Pluripotent stem cells. London: InTechOpen; 2013.
15. Lazaro I, Yilmazer A, Kostarelos K. Induced pluripotent stem (iPS) cells: a new source for cell-based therapeutics? J Control Release. 2014;185:37-44. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.04.011>
16. Nobel de Medicina premia cientistas por trabalhos com células-tronco. G1 9 out 2012[acesso 19 out 2017]. Disponível em: <http://g1.globo.com/bemestar/noticia/2012/10/nobel-de-medicina-premia-cientistas-por-trabalho-com-celulas-tronco.html>
17. Okita K, Ichisaka T, Yamanaka S. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. Nature. 2007;448(7151):313-7. <https://doi.org/10.1038/nature05934>
18. Zhao T, Zhang ZN, Rong Z, Xu Y. Immunogenicity of induced pluripotent stem cells. Nature. 2011;474(7350):212-5. <https://doi.org/10.1038/nature10135>
19. Okita K, Nakagawa M, Hyenjong H, Ichisaka T, Yamanaka S. Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors. Science. 2008;322(5903):949-53. <https://doi.org/10.1126/science.1164270>
20. Warren L, Manos PD, Ahfeldt T, Loh YH, Li H, Lau F et al. Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells with synthetic modified mRNA. Cell Stem Cell. 2010;7(5):618-30. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2010.08.012>
21. Kim D, Kim CH, Moon JI, Chung YG, Chang MY, Han BS et al. Generation of human induced pluripotent stem cells by direct delivery of reprogramming proteins. Cell Stem Cell. 2009;4(6):472-6. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2009.05.005>
22. Hirschi KK, Li S, Roy K. Induced pluripotent stem cells for regenerative medicine. Annu Rev Biomed Eng. 2014;16(1):277-94. <https://doi.org/10.1146/annurev-bioeng-071813-105108>
23. Liras A. Future research and therapeutic applications of human stem cells: general, regulatory, and bioethical aspects. J Transl Med. 2010;8(1):131. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-8-131>
24. Uccelli A, Moretta L, Pistoia V. Mesenchymal stem cells in health and disease. Nat Rev Immunol. 2008;8(9):726-36. <https://doi.org/10.1038/nri2395>
25. Aggarwal S, Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. Blood. 2005;105(4):1815-22. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-04-1559>
26. Baglio SR, Pegtel DM, Baldini N. Mesenchymal stem cell secreted vesicles provide novel opportunities in (stem) cell-free therapy. Front Physiol. 2012;3:359. <https://doi.org/10.3389/fphys.2012.00359>
27. Gneocchi M, Melo LG. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells: isolation, expansion, characterization, viral transduction, and production of conditioned medium. Methods Mol Biol. 2009;482:281-94. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-060-7_18
28. Gruber HE, Deepe R, Hoelscher GL, Ingram JA, Norton HJ, Scannell B et al. Human adipose-derived mesenchymal stem cells: direction to a phenotype sharing similarities with the disc, gene expression profiling, and coculture with human annulus cells. Tissue Eng Part A. 2010;16(9):2843-60. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2009.0709>
29. In 't Anker PS, Scherjon SA, Kleijburg-van der Keur C, Groot-Swings GM, Claas FH, Fibbe WE et al. Isolation of mesenchymal stem cells of fetal or maternal origin from human placenta. Stem Cells. 2004;22(7):1338-45. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2004-0058>
30. Ponnaiyan D, Bhat KM, Bhat GS. Comparison of immuno-phenotypes of stem cells from human dental pulp and periodontal ligament. Int J Immunopathol Pharmacol. 2012;25(1):127-34. <https://doi.org/10.1177/039463201202500115>
31. Bieback K, Klüter H. Mesenchymal stromal cells from umbilical cord blood. Curr Stem Cell Res Ther. 2007;2(4):310-23. <https://doi.org/10.2174/157488807782793763>
32. McElreavey KD, Irvine AI, Ennis KT, McLean WH. Isolation, culture and characterisation of fibroblast-like cells derived from the Wharton's jelly portion of human umbilical cord. Biochem Soc Trans. 1991;19(1):295. <https://doi.org/10.1042/bst019029s>
33. Soleimani M, Nadri S. A protocol for isolation and culture of mesenchymal stem cells from mouse bone marrow. Nat Protoc. 2009;4(1):102-6. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.221>
34. Ledesma-Martínez E, Mendoza-Núñez VM, Santiago-Osorio E. Mesenchymal stem cells derived from dental pulp: a review. Stem Cells Int. 2016;2016:4709572. <https://doi.org/10.1155/2016/4709572>
35. Jeon YJ, Kim J, Cho JH, Chung HM, Chae JI. Comparative analysis of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow, placenta, and adipose tissue as sources of cell therapy. J Cell Biochem. 2016;117(5):1112-25. <https://doi.org/10.1002/jcb.25395>
36. Rebelatto CK, Aguiar AM, Moretão MP, Senegaglia AC, Hansen P, Barchiki F et al. Dissimilar differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, and adipose tissue. Exp Biol Med (Maywood). 2008;233(7):901-13. <https://doi.org/10.3181/0712-RM-356>
37. Tremolada C, Colombo V, Ventura C. Adipose tissue and mesenchymal stem cells: state of the art and Lipogems® technology development. Curr Stem Cell Rep. 2016;2(3):304-12. <https://doi.org/10.1007/s40778-016-0053-5>
38. Narahashi LDC ACC, De Araújo HP. Regulamentação das terapias celulares no Brasil. Vigil Sanit Debate. 2015;3(3):19-24. <https://doi.org/10.3395/2317-269x.00274>
39. Russell WMS, Burhel RL. The principles of humane experimental technique. London: Methuen; 1959.
40. Liebsch M, Grune B, Seiler A, Butzke D, Oelgeschläger M, Pirow R et al. Alternatives to animal testing: current status and future perspectives. Arch Toxicol. 2011;85(8):841-58. <https://doi.org/10.1007/s00204-011-0718-x>



41. Badyal DK, Desai C. Animal use in pharmacology education and research: the changing scenario. *Indian J Pharmacol.* 2014;46(3):257-65. <https://doi.org/10.4103/0253-7613.132153>
42. Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA. Resolução Normativa Nº 17, de 3 de julho de 2014. Dispõe sobre o reconhecimento de métodos alternativos ao uso de animais em atividades de pesquisa no Brasil e dá outras providências. *Diário Oficial da União.* 4 jul 2014.
43. Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA. Resolução Normativa Nº 18, de 24 de setembro de 2014. Reconhece métodos alternativos ao uso de animais em atividades de pesquisa no Brasil, nos termos da Resolução Normativa nº 17, de 3 de julho de 2014, e dá outras providências. *Diário Oficial da União.* 25 set 2014.
44. Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA. Resolução Normativa Nº 31, de 18 de agosto de 2016. Reconhece métodos alternativos ao uso de animais em atividades de pesquisa no Brasil. *Diário Oficial União.* 19 ago 2016.
45. Knight A. Systematic reviews of animal experiments demonstrate poor contributions toward human healthcare. *Rev Recent Clin Trials.* 2008;3(2):89-96. <https://doi.org/10.2174/157488708784223844>
46. Ordi-Ros J, Cosiglio FJ. [Current therapeutic indications of thalidomide and lenalidomide]. *Med Clin (Barc).* 2014;142(8):360-4. Spanish. <https://doi.org/10.1016/j.medcli.2013.04.038>
47. Faiola F, Yin N, Yao X, Jiang G. The rise of stem cell toxicology. *Environ Sci Technol.* 2015;49(10):5847-8. <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b01549>
48. Jennings P. "The future of in vitro toxicology". *Toxicol in Vitro.* 2015;29(6):1217-21. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2014.08.011>
49. Meganathan K, Jagtap S, Wagh V, Winkler J, Gaspar JA, Hildebrand D et al. Identification of thalidomide-specific transcriptomics and proteomics signatures during differentiation of human embryonic stem cells. *PLoS One.* 2012;7(8):e44228. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0044228>
50. Mayshar Y, Yanuka O, Benvenisty N. Teratogen screening using transcriptome profiling of differentiating human embryonic stem cells. *J Cell Mol Med.* 2011;15(6):1393-401. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2010.01105.x>
51. Nadig RR. Stem cell therapy: hype or hope? A review. *J Conserv Dent.* 2009;12(4):131-8. <https://doi.org/10.4103/0972-0707.58329>
52. Liu W, Deng Y, Liu Y, Gong W, Deng W. Stem cell models for drug discovery and toxicology studies. *J Biochem Mol Toxicol.* 2013;27(1):17-27. <https://doi.org/10.1002/jbt.21470>
53. Mori H, Hara M. Cultured stem cells as tools for toxicological assays. *J Biosci Bioeng.* 2013;116(6):647-52. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2013.05.028>
54. Seiler AE, Spielmann H. The validated embryonic stem cell test to predict embryotoxicity in vitro. *Nat Protoc.* 2011;6(7):961-78. <https://doi.org/10.1038/nprot.2011.348>
55. Seiler A, Visan A, Buesen R, Genschow E, Spielmann H. Improvement of an in vitro stem cell assay for developmental toxicity: the use of molecular endpoints in the embryonic stem cell test. *Reprod Toxicol.* 2004;18(2):231-40. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2003.10.015>
56. Buesen R, Genschow E, Slawik B, Visan A, Spielmann H, Luch A et al. Embryonic stem cell test remastered: comparison between the validated EST and the new molecular FACS-EST for assessing developmental toxicity in vitro. *Toxicol Sci.* 2009;108(2):389-400. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfp012>
57. Bellin M, Marchetto MC, Gage FH, Mummery CL. Induced pluripotent stem cells: the new patient? *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2012;13(11):713-26. <https://doi.org/10.1038/nrm3448>
58. Seiler K, Tsuneto M, Melchers F. Experimental limitations using reprogrammed cells for hematopoietic differentiation. *J Biomed Biotechnol.* 2011;2011:895086. <https://doi.org/10.1155/2011/895086>
59. Nishizawa M, Chonabayashi K, Nomura M, Tanaka A, Nakamura M, Inagaki A et al. Epigenetic variation between human induced pluripotent stem cell lines is an indicator of differentiation capacity. *Cell Stem Cell.* 2016;19(3):341-54. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2016.06.019>
60. Yamamoto T, Takenaka C, Yoda Y, Oshima Y, Kagawa K, Miyajima H et al. Differentiation potential of pluripotent stem cells correlates to the level of CHD7. *Sci Rep.* 2018;8(1):241. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-18439-y>
61. Ikuno T, Masumoto H, Yamamizu K, Yoshioka M, Minakata K, Ikeda T et al. Correction: efficient and robust differentiation of endothelial cells from human induced pluripotent stem cells via lineage control with VEGF and cyclic AMP. *PLoS One.* 2017;12(4):e0176238. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176238>
62. Ikuno T, Masumoto H, Yamamizu K, Yoshioka M, Minakata K, Ikeda T et al. Efficient and robust differentiation of endothelial cells from human induced pluripotent stem cells via lineage control with VEGF and cyclic AMP. *PLoS One.* 2017;12(3):e0173271. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0173271>
63. Higuchi A, Suresh Kumar S, Ling QD, Alarfaj AA, Munusamy MA, Murugan K et al. Polymeric design of cell culture materials that guide the differentiation of human pluripotent stem cells. *Prog Polym Sci.* 2017;65:83-126. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2016.09.002>
64. Alisson-Silva F, Rodrigues DC, Vairo L, Asensi KD, Vasconcelos-dos-Santos A, Mantuano NR et al. Evidences for the involvement of cell surface glycans in stem cell pluripotency and differentiation. *Glycobiology.* 2014;24(5):458-68. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwu012>
65. Suter-Dick L, Alves PM, Blaauboer BJ, Bremm KD, Brito C, Coecke S et al. Stem cell-derived systems in toxicology assessment. *Stem Cells Dev.* 2015;24(11):1284-96. <https://doi.org/10.1089/scd.2014.0540>



66. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*. 2007;131(5):861-72. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.11.019>
67. Pistollato F, Louisse J, Scelfo B, Mennecozzi M, Accordi B, Basso G et al. Development of a pluripotent stem cell derived neuronal model to identify chemically induced pathway perturbations in relation to neurotoxicity: effects of CREB pathway inhibition. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2014;280(2):378-88. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2014.08.007>
68. Liang P, Lan F, Lee AS, Gong T, Sanchez-Freire V, Wang Y et al. Drug screening using a library of human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes reveals disease-specific patterns of cardiotoxicity. *Circulation*. 2013;127(16):1677-91. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.113.001883>
69. Tofoli FA, Dasso M, Morato-Marques M, Nunes K, Pereira LA, Silva GS et al. Increasing the genetic admixture of available lines of human pluripotent stem cells. *Sci Rep*. 2016;6(1):34699. <https://doi.org/10.1038/srep34699>
70. Wheeler HE, Wing C, Delaney SM, Komatsu M, Dolan ME. Modeling chemotherapeutic neurotoxicity with human induced pluripotent stem cell-derived neuronal cells. *PLoS One*. 2015;10(2):e0118020. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0118020>
71. U.S. Department of Health and Human Services. National Toxicology Program. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods - ICCVAM. Recommended test method protocol: BALB/c 3T3 NRU cytotoxicity test method. [S.l.]: Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods; 2006[acesso 03 out 2017]. Disponível em: http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/acutetox/inv_nru_tmter.htm
72. Scanu M, Mancuso L, Cao G. Evaluation of the use of human Mesenchymal Stem Cells for acute toxicity tests. *Toxicol in Vitro*. 2011;25(8):1989-95. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2011.07.006>
73. Mancuso L, Scanu M, Pisu M, Concas A, Cao G. Experimental analysis and modelling of in vitro HUVECs proliferation in the presence of various types of drugs. *Cell Prolif*. 2010;43(6):617-28. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2184.2010.00711.x>
74. Abud AP, Zych J, Reus TL, Kuligovski C, Moraes E, Dallagiovanna B et al. The use of human adipose-derived stem cells based cytotoxicity assay for acute toxicity test. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2015;73(3):992-8. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2015.09.015>
75. Corrêa NCR, Kuligovski C, Paschoal ACC, Abud APR, Rebelatto CLK, Leite LMB et al. Human adipose-derived stem cells (ADSC) and human periodontal ligament stem cells (PDLSC) as cellular substrates of a toxicity prediction assay. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2018;92:75-82. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2017.11.004>
76. Xu Y, Hadjiargyrou M, Rafailovich M, Mironava T. Cell-based cytotoxicity assays for engineered nanomaterials safety screening: exposure of adipose derived stromal cells to titanium dioxide nanoparticles. *J Nanobiotechnology*. 2017;15(1):50. <https://doi.org/10.1186/s12951-017-0285-2>
77. Davila JC, Cezar GG, Thiede M, Strom S, Miki T, Trosko J. Use and application of stem cells in toxicology. *Toxicol Sci*. 2004;79(2):214-23. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfh100>
78. Busek M, Gruenzner S, Steege T, Schmieder F, Klotzbach U, Sonntag F. Design, characterization, and modeling of microcirculation systems with integrated oxygenators. *J Sens Sens Syst*. 2016;5(1):221-8. <https://doi.org/10.5194/jsss-5-221-2016>
79. Huh D, Hamilton GA, Ingber DE. From 3D cell culture to organs-on-chips. *Trends Cell Biol*. 2011;21(12):745-54. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2011.09.005>
80. Singh VK, Kalsan M, Kumar N, Saini A, Chandra R. Induced pluripotent stem cells: applications in regenerative medicine, disease modeling, and drug discovery. *Front Cell Dev Biol*. 2015;3:2. <https://doi.org/10.3389/fcell.2015.00002>
81. Low LA, Tagle DA. Microphysiological systems (“organs-on-chips”) for drug efficacy and toxicity testing. *Clin Transl Sci*. 2017;10(4):237-9. <https://doi.org/10.1111/cts.12444>
82. Zhang B, Radisic M. Organ-on-a-chip devices advance to market. *Lab Chip*. 2017;17(14):2395-420. <https://doi.org/10.1039/C6LC01554A>
83. Penido H. Células-tronco: limitações éticas e jurídicas à pesquisa e manipulação. *Âmbito Jurídico*. com.br; 2006[acesso 10 out 2017]. Disponível em: http://www.ambitojuridico.com.br/site/index.php?n_link=revista_artigos_leitura&artigo_id=972
84. Marodin G SJ, Motta MdL, Santos LMP. Diretrizes nacionais para biorrepositório e biobanco de material biológico humano. *Rev Assoc Med Bras*. 2013;59(1):72-7. <https://doi.org/10.1590/S0104-42302013000100014>
85. Senado Federal (BR). Constituição da República Federativa do Brasil. Brasília, DF: Senado Federal; 1988.
86. Alves G. Leis do Brasil travam desenvolvimento de alternativas aos testes em animais. *Folha de São Paulo*. 17 maio 2017[acesso 11 out 2017]. Disponível em: <http://www1.folha.uol.com.br/ciencia/2017/05/1884667-leis-do-brasil-travam-desenvolvimento-de-alternativas-aos-testes-em-animais.shtml>
87. Martinho AM, Turner L. Stem cells in court: historical trends in US legal cases related to stem cells. *Regen Med*. 2017;12(4):419-30. <https://doi.org/10.2217/rme-2017-0002>
88. Ministério da Saúde (BR), Conselho Nacional de Saúde. Resolução Nº 441, de 12 de maio de 2011. Aprovar diretrizes para análise ética de projetos de pesquisas que envolvam armazenamento de material biológico humano ou uso de material armazenado em pesquisas anteriores. *Diário Oficial União*. 18 jul 2011.
89. Ministério da Saúde (BR), Conselho Nacional de Saúde. Resolução Nº 466, de 12 de dezembro de 2012. Aprovar diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos. *Diário Oficial União*. 13 jun 2013.
90. King NM, Perrin J. Ethical issues in stem cell research and therapy. *Stem Cell Res Ther*. 2014;5(4):85. <https://doi.org/10.1186/scrt474>



91. Brasil. Lei Nº 10.205, de 21 de março de 2001. Regulamenta o § 4º do art. 199 da Constituição Federal, relativo à coleta, processamento, estocagem, distribuição e aplicação do sangue, seus componentes e derivados, estabelece o ordenamento institucional indispensável à execução adequada dessas atividades, e dá outras providências. Diário Oficial União. 22 mar 2001.
92. Sugarman J. Human stem cell ethics: beyond the embryo. *Cell Stem Cell*. 2008;2(6):529-33. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2008.05.005>
93. Caulfield T, Rachul C, Zarzeczny A. The evolution of policy issues in stem cell research: an international survey. *Stem Cell Rev*. 2012;8(4):1037-42. <https://doi.org/10.1007/s12015-012-9404-5>
94. Pirnay JP, Baudoux E, Cornu O, Delforge A, Delloye C, Guns J et al. Access to human tissues for research and product development: from EU regulation to alarming legal developments in Belgium. *EMBO Rep*. 2015;16(5):557-62. <https://doi.org/10.15252/embr.201540070>
95. West CC, Murray IR, González ZN, Hindle P, Hay DC, Stewart KJ et al. Ethical, legal and practical issues of establishing an adipose stem cell bank for research. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*. 2014 Jun;67(6):745-51. <https://doi.org/10.1016/j.bjps.2014.01.030>
96. Regulation (EC) Nº 1394/2007 of the European Parliament and of The Council of 13 November 2007 on advanced therapy medicinal products and amending Directive 2001/83/EC and Regulation (EC) No 726/2004, (2007).
97. Chabannon CC, Caunday-Rigot C, Faucher C, Slaper-Cortenbach I, Calmels B, Lemarie C et al. Accreditation and regulations in cell therapy. *ISBT Sci Ser*. 2016;11 S1:271-6. <https://doi.org/10.1111/voxs.12205>
98. Carias R, Borojevic R, Granjeiro JM. Obtenção de células humanas certificadas: um desafio da biometrologia. *Vigil Sanit Debate*. 2014;2(3):2-12. <https://doi.org/10.3395/vj.0.0.311>
99. Seo BM, Miura M, Gronthos S, Bartold PM, Batouli S, Brahim J et al. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet*. 2004;364(9429):149-55. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(04\)16627-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(04)16627-0)
100. Staerk J, Dawlaty MM, Gao Q, Maetzel D, Hanna J, Sommer CA et al. Reprogramming of human peripheral blood cells to induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*. 2010;7(1):20-4. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2010.06.002>
101. Zhou T, Benda C, Dunzinger S, Huang Y, Ho JC, Yang J et al. Generation of human induced pluripotent stem cells from urine samples. *Nat Protoc*. 2012;7(12):2080-9. <https://doi.org/10.1038/nprot.2012.115>

Agradecimentos

Os autores agradecem o apoio do CNPq, da Capes e da Fundação Araucária. BD é bolsista de produtividade em pesquisa do CNPq, APRA é bolsista do Programa Nacional de Pós-doutorado - Capes (UFPR), TLR é bolsista de doutorado da Capes e ACCP é bolsista de mestrado da Fundação Araucária.

Agradecemos também a Wagner Nagibe de Souza Birbeire pelo *design* visual das Figuras 1 e 2.

Conflito de Interesse

Os autores informam não haver qualquer potencial conflito de interesse com pares e instituições, políticos ou financeiros deste estudo.



Esta publicação está sob a licença Creative Commons Atribuição 3.0 não Adaptada.

Para ver uma cópia desta licença, visite http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/deed.pt_BR.