

The potential of mesenchymal stromal cells as a novel cellular therapy for multiple sclerosis

National Center for Regenerative Medicine, Case Western Reserve University, Cleveland, OH 44106, USA.

Immunotherapy. 2012 May;4(5):529-47.

Auletta JJ, Bartholomew AM, Maziarz RT, Deans RJ, Miller RH, Lazarus HM, Cohen JA.

O potencial de células-tronco mesenquimais como uma nova terapia celular para esclerose múltipla.

A esclerose múltipla (EM) é uma doença neurodegenerativa inflamatória do sistema nervoso central (SNC) para a qual existem terapias apenas parcialmente eficazes. Pesquisas intensas para definir a fisiopatologia imunológica subjacente têm trazido avanços tanto na compreensão da EM bem como têm revelado potenciais alvos para intervenção clínica. A terapia com células-tronco mesenquimais (CTMs) tem o potencial de modular as respostas imunes aberrantes que causam a desmielinização e a lesão axonal associadas à esclerose múltipla, bem como de reparar e restaurar o tecido do SNC danificado. Este artigo analisa a fisiopatologia subjacente à EM, bem como fornece uma perspectiva de vanguarda no campo da terapia com CTMs, com base na experiência dos autores intrinsecamente envolvidos em pesquisa básica e translacional com CTMs e EM.

A esclerose múltipla (EM) é uma doença neurodegenerativa progressiva do sistema nervoso central (SNC) caracterizada por inflamação crônica, desmielinização e lesão neuronal. Atualmente, não há cura médica para EM, principalmente devido à compreensão incompleta de sua fisiopatologia. Modelos animais de encefalite autoimune experimental (EAE) puderam definir os processos imunes que incitam e perpetuam as manifestações clínicas e a evolução da EM. Este conhecimento resultou na aplicação da imunoterapia para tratar a EM. No entanto, a imunoterapia convencional utilizada em outras doenças tem o potencial de piorar o quadro clínico e aumentar o risco de infecção. As células-tronco mesenquimais (CTMs) são células multipotentes não-hematopoéticas, que possuem propriedades imunomoduladoras e regenerativas. Mais comumente isoladas a partir da medula óssea (MO), as CTMs também foram isoladas a partir de vários tecidos, incluindo tecido adiposo, sangue do cordão umbilical, placenta, timo e polpa dentária. Independentemente da fonte, a designação CTM requer os seguintes critérios mínimos:

- aderência ao plástico durante a expansão in vitro;
- ausência dos marcadores de superfície hematopoiéticos CD14, CD11b, CD19, CD34, CD45 e HLA-DR, e a presença de marcadores de superfície CD73, CD90 e CD105;
- diferenciação in vitro em adipócitos, condroblastos e osteoblastos.

A vontade de se utilizar CTMs como terapia celular decorre da sua facilidade de expansão, de seu perfil seguro de infusão e sua propriedade imunossupressora, especialmente no contexto da alorreatividade, tal como a doença do enxerto versus hospedeiro (DECH), revista em Auletta et al. Recentemente também foi proposto utilizar as CTMs como um tratamento para doenças autoimunes como a esclerose múltipla, em particular dadas as suas funções de imunossupressão e reparação neural, tratados no MD Anderson Cancer Center (MDACC).

EM como um alvo terapêutico para a terapia com CTMs

A patogênese da EM é multifatorial e leva a lesões multifocais do SNC com inflamação perivenular, desmielinização, transecção axonal, degeneração neuronal e gliose na substância branca e cinzenta. A atividade inflamatória predomina nas fases iniciais da doença, refletida mais diretamente na recaída e atividade das lesões detectadas pela ressonância magnética. Contudo, admite-se que a piora gradual na EM se deva à neurodegeneração. Além disso, embora existam processos de reparação intrínseca na EM, eles não conseguem compensar o dano permanente na maioria dos pacientes. Os tratamentos atualmente aprovados para EM estão voltados primariamente à inflamação no SNC. As estratégias de tratamento para prevenir danos no tecido ou aumentar a reparação, incluindo a remielinização e a regeneração axonal, são bastante necessárias. As propriedades imunomoduladoras, protetoras e reparadoras das CTMs as tornam candidatas atraentes para terapia celular.

Transplante com CTMs

Até o momento, os maiores estudos de transplantes com CTMs ocorreram para doenças hematológicas malignas, câncer de mama, DECH e doença isquêmica cardíaca aguda ou crônica.

Houve também relatos de pacientes individuais ou pequenas séries de casos com uma grande variedade de outras condições, incluindo as afecções neurológicas como acidente vascular cerebral, lesão da medula espinhal, trauma cerebral, doença de Parkinson, atrofia de múltiplos sistemas e esclerose lateral amiotrófica.

A experiência publicada em EM é modesta. Recentemente, Connick et al publicou os resultados do único estudo formal de fase I/IIa até a data, em que dez pacientes com esclerose múltipla progressiva secundária e evidência de envolvimento das vias visuais aferentes anteriores foram tratados com uma única infusão intravenosa de CTMs de medula óssea autóloga, expandidas em cultura (1,1-2,0 milhões de células/kg de peso corporal). Os pacientes foram acompanhados neste estudo aberto por até 20 meses no pré-tratamento e 10 meses após o tratamento. Não houve relato de eventos adversos graves. Análises preliminares de eficácia demonstraram benefício em algumas das medidas de estrutura e da função das vias visuais.

CTMs autólogas versus alogênicas para transplante

Uma área de incerteza é se em distúrbios tais como a esclerose múltipla o transplante com CTMs preferível é o autólogo ou o alogênico. Esta incerteza é baseada na preocupação teórica de que, devido à doença subjacente ou ao seu tratamento, as CTMs de doentes com EM podem ter propriedades imunomoduladoras, protetoras ou reparadoras defeituosas. O transplante com CTMs alogênicas parece viável, uma vez que as CTMs são minimamente imunogênicas. In vitro, as CTMs humanas não estimulam a proliferação ou a produção de IFN- α pelas células T alogênicas. Elas não são lisadas e não induzem a produção de IFN- α ou fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) pelas células T citotóxicas alogênicas. In vivo, as CTMs alogênicas e xenogênicas não são rejeitadas em ratos e numerosos estudos demonstram que CTMs alogênicas não são rejeitadas em seres humanos. Esta

propriedade permite o uso de CTMs de doador universal expandidas em cultura, uma abordagem adotada por várias empresas comercializadoras de terapia com CTMs. A utilização de CTMs como um produto “direto da prateleira” (off-the-shelf) melhora a conveniência e permite que CTMs purificadas sejam utilizadas no tratamento de patologias agudas como infarto agudo do miocárdio ou recidiva da EM. Além disso, esta abordagem é claramente necessária para a utilização de CTMs como uma terapia de substituição em doenças genéticas tais como a osteogênese imperfeita, a síndrome de Hunter, a leucodistrofia metacromática e síndrome de Hurler.

No entanto, não existem dados publicados que dão suporte diretamente à hipótese de que as CTMs derivadas de doentes com EM apresentam um potencial terapêutico reduzido. Além disso, embora o transplante alogênico seja viável, isto levanta uma série de questões práticas. Em primeiro lugar, a avaliação do doador para descartar infecção e câncer deve ser mais abrangente. Segundo, se espera que as barreiras regulamentares sejam maiores. Por fim, doenças crônicas tais como a EM provavelmente exigirão transplantes repetidos com CTMs. Apesar de as CTMs serem imunologicamente privilegiadas, a sua administração repetida pode levar à sensibilização e ao aumento do risco de rejeição.

Fatores que afetam as características das CTMs isoladas

Aspectos da coleta das células, a cultura, a criopreservação e a descongelamento, bem como a administração podem impactar sobre a função das CTMs. No entanto, estágios clínicos da doença afetam diferentemente a função das CTMs. Por exemplo, as CTMs obtidas a partir de pacientes com anemia aplásica, osteoartrite avançada e doenças do tecido conjuntivo apresentam proliferação e/ou função alterada. Em contraste, as CTMs de pacientes com lúpus eritematoso sistêmico, artrite reumatoide, esclerose sistêmica, síndrome de Sjögren, polimialgia reumática ou diabetes possuem fenótipo de superfície, capacidade de formação de placas, capacidade de diferenciação, capacidade para promover a hematopoese e propriedades imunomoduladoras semelhante às células-controle de doadores saudáveis, sugerindo que estas doenças e suas terapias imunossupressoras associadas não afetaram negativamente as funções estudadas. Da mesma forma, células estromais da MO de 15 pacientes com EM promoveram hematopoese normal e nenhum efeito do tratamento recente com IFN- β foi detectável. CTMs de cinco pacientes com esclerose múltipla apresentaram proliferação, potencial de diferenciação e expressão do antígeno de superfície celular similares às células de cinco doadores saudáveis. CTMs isoladas de dez pacientes com esclerose múltipla apresentaram proliferação, capacidade de diferenciação, expressão de TLR, atividade imunomoduladora, capacidade de inibir a diferenciação e ativação de células dendríticas similares, mas a produção de IP10 estimulada por lipopolissacarídeo foi significativamente maior, quando comparadas a seis controles saudáveis. Diante desses resultados, ainda é incerto se as CTMs de pacientes com esclerose múltipla têm sua capacidade imunomoduladora e/ou de reparação verdadeiramente alterados. Para atender a essa necessidade, os testes atuais ainda definirão a função das CTMs em pacientes com esclerose múltipla.

Potenciais problemas de segurança com transplante de CTMs

De maneira geral, o transplante com CTMs, inclusive os alogênicos, tem sido bem tolerado. Tampouco eventos adversos agudos quanto de longo prazo, clinicamente significativos e atribuíveis às CTMs foram relatados. Até 10×10^6 células/kg de peso corporal podem ser infundidas com segurança. No entanto, vários efeitos adversos potenciais demandarão especial atenção em estudos futuros.

Toxicidade relacionada à infusão

A maioria dos ensaios clínicos não relataram eventos adversos relacionados à infusão. Um paciente desenvolveu encefalopatia, infarto do miocárdio e acidente vascular cerebral relacionado ao dimetilsulfóxido, um componente do meio de congelamento. Anticorpos antissoro fetal bovino são comuns, mas geralmente não são clinicamente significativos. Um estudo relatou um participante que teve um aumento de 150 vezes nos títulos dos anticorpos antissoro fetal bovino e desenvolveu uma erupção urticariforme após uma segunda infusão de CTMs alogênicas. Pelo fato de as CTMs serem células relativamente grandes (20-60 μm) e a aglutinação de células ser possível, a embolia pulmonar é uma preocupação potencial. Nenhum estudo relatou sintomas respiratórios, diminuição da saturação de oxigênio ou mudanças na radiografia de tórax. O cumprimento dos procedimentos estabelecidos para o descongelamento e infusão de células pode minimizar o potencial para esses eventos adversos.

Câncer

O potencial de transformação maligna não é algo inesperado, dadas algumas das semelhanças biológicas entre as células-tronco e células cancerosas. As CTMs em adultos podem se tornar tumorigênicas e têm sido implicadas em vários tumores, experimentais ou em humanos, incluindo leucemia infantil, cânceres epiteliais gástricos e os sarcomas ósseos. Num estudo realizado por Tolar et al, a frequência elevada de sarcomas ósseos no pulmão de murinos após transplante com CTMs pareceu estar relacionada à propensão das células murinas em desenvolver alterações citogenéticas frequentes, mesmo em cultura de curto prazo. Anormalidades citogenéticas não foram observadas em alguns estudos com CTMs humanas, mas foram relatadas em outros, predominantemente naqueles com cultura de células prolongada. Assim, um fator importante parece ser a continuação da cultura após a crise de senescência celular.

Vários estudos têm demonstrado o homing de CTMs aos sítios primários de cânceres e aos sítios metastáticos, locais em que elas podem formar estroma tumoral. Além disso, efeitos tróficos ou imunossupressores das CTMs poderiam criar um ambiente permissivo para o desenvolvimento do câncer. Por exemplo, adipócitos derivados de CTMs reduziram a apoptose de células de leucemia promielocítica aguda em cultura. CTMs humanas misturadas a células de tumor de mama humano, injetadas por via subcutânea como um xenoinxerto em ratos levaram a um aumento acentuado no potencial metastático. CTMs prolongaram a sobrevida de células tumorais de melanoma B16 quando injetadas por via subcutânea em ratos. Finalmente, em um estudo

randomizado sobre doenças hematológicas malignas, células-tronco hematopoéticas de irmão HLA-compatível, em conjunto com CTMs ou isoladamente, houve menor incidência de DECH nos receptores de CTMs (11,1 versus 53,3%), mas houve aumento na recaída da leucemia: seis em cada dez (60%) versus três em cada 15 pacientes (20%) respectivamente. Apesar destas preocupações teóricas, não há relatos de formação de novo tumor como complicação após transplantes com CTMs em humanos, sejam eles diretamente derivados das CTMs transplantadas ou dos efeitos permissivos indiretos das CTMs em outros tipos celulares. No entanto, em ensaios clínicos futuros, as culturas com CTMs devem expandidas pelo menor tempo necessário para se obter um rendimento suficiente de células, para diminuir a possibilidade de anomalias citogenéticas e um cuidado adicional deve ser tomado: excluir os participantes com uma história de câncer concomitante.

Formação do tecido ectópico

As CTMs podem se diferenciar em vários tecidos mesodérmicos e, possivelmente, em células derivadas de outras camadas germinativas. Calcificação ectópica e/ou ossificação foram observadas após a injeção direta de CTMs em ratos com infarto do miocárdio. No entanto, a formação de tecido ectópico não foi relatada em estudos em humanos e foi especificamente avaliada (e não foi detectada) em sete pacientes submetidos a co-transplante de células-tronco hematopoéticas e CTMs (seguimento superior a 3 anos e de autópsia em um participante).

Autoimunidade

Não houve relatos de fenômenos autoimunes com transplantes de CTMs. Contudo, até agora a utilização de CTMs em doenças imunomediadas, incluindo EM, foi extremamente limitada. Outros tratamentos para EM já produziram fenômenos autoimunes imprevistos, tais como doenças da tireoide, púrpura trombocitopenia imunológica e doença da membrana basal glomerular com alemtuzumab, ou aumento da atividade da EM com bloqueadores de TNF- α . Pelo fato de as CTMs possuírem efeitos imunes tanto anti quanto pró-inflamatórios, o monitoramento de fenômenos autoimunes e a ativação paradoxal da doença de base devem ser um foco de estudos futuros sobre transplante de CTMs para EM.

Homing

O conceito de utilização de CTMs para a terapia regenerativa tem sido reforçado pela observação de que essas células podem se deslocar, se dirigir ao sítio alvo e enxertar por longo prazo em vários tecidos-alvo. Após a administração intravenosa, as CTMs aparecem em maior número nos pulmões, mas evidências recentes mostram que estas células chegam também a lesões ou tecidos inflamados (cérebro inclusive). Os mecanismos pelos quais as CTMs podem ser recrutadas para atravessar as camadas de células endoteliais e se infiltrar nos tecidos ainda estão em estudo, mas provavelmente envolvam interações ligante-receptor.

Terapia com CTMs: considerações gerais para a aplicação clínica

As complexas interações celulares aqui discutidas colocam

a EM como uma das muitas doenças para as quais a aplicação terapêutica de CTMs melhoraria o curso da doença. Aplicações terapêuticas de CTMs inicialmente se concentravam na enxertia, uma vez que as CTMs são um componente normal da MO. Além disso, diversos investigadores demonstraram que tanto citocinas quanto fatores de crescimento hematopoéticos podem ter sua produção induzida pelas CTMs, bem como ser constitutivamente secretados pelas CTMs nos meios de cultura. Estudos pré-clínicos com animais corroboraram o potencial estimulador hematopoético destas células. O primeiro ensaio clínico com CTMs em humanos focou em mostrar a segurança e a viabilidade da expansão celular ex vivo e da reinfusão. Um próximo passo lógico foi avaliar em humanos se um aumento de células do estroma pode acelerar o enxerto no cenário da terapia mieloablativa de alta dose com transplante autólogo de células progenitoras de sangue periférico, como foi observado em pacientes com câncer de mama.

Na sequência destes estudos originais, uma modificação nos benefícios clínicos pretendidos com a terapia com CTMs ocorreu. Um dos focos foi redirecionado para o transporte celular de mediadores solúveis, dado o potencial das CTMs em elaborar uma vasta gama de citocinas e quimiocinas. Outro enfoque tem sido gerar um produto clínico mais universal com CTMs, ao invés de um produto especificamente dirigido, obtido de 1 doador. Vários produtos celulares surgiram comercialmente como aplicações-alvo para imunossupressão e para a medicina regenerativa, em diversos cenários clínicos como DECH aguda e crônica, infarto agudo do miocárdio, isquemia crítica de membros, artrose, lesões traumáticas da coluna, lesão pulmonar aguda, doença inflamatória intestinal, diabetes mellitus e EM. Universalmente, foi demonstrada a segurança. Além disso, em quase todos os estudos de fase I e II, a dose máxima tolerada não foi demonstrada.

Se as intervenções terapêuticas com CTMs para EM evoluírem ainda mais, então um último ponto é merecedor de comentário adicional. Muitos dos esforços acadêmicos e industriais atuais estão focados em estabelecer as CTMs como um agente terapêutico ou uma “droga”. É importante compreender a farmacodinâmica da droga e os impactos do corpo sobre a droga (farmacocinética), assim como desenvolver os meios para acompanhar a entrega da droga in vivo.

Se a comunidade de medicina regenerativa continuar a explorar as CTMs para fins terapêuticos, várias questões permanecerão. Qual é o tempo ideal para a administração? Qual é o número mínimo necessário de células para se obter uma resposta terapêutica? As populações de CTMs devem ser pré-tratadas ex vivo ou ser ativadas após o tratamento in vivo? Qual é a via preferencial de entrega? Pode uma aplicação isolada ser suficiente ou seriam necessárias aplicações repetidas? Existe uma necessidade de supressão imunológica concomitante? Estas respostas necessitam ser definidas, reconhecendo que o financiamento da saúde disponível para apoiar estes esforços está diminuindo.

Tais abordagens requerem um exame minucioso, equilibrando o custo de produção e a otimização do efeito das CTMs. É ingenuidade pensar que um produto off-the-shelf consiga ter sido otimizado a ponto de se tornar

uma aplicação universal para uma vasta gama entidades nosológicas. Por exemplo, o paciente com EM obviamente é muito diferente de um paciente que sofreu recentemente um infarto agudo do miocárdio. Para as CTMs seguirem surgindo como uma ferramenta terapêutica eficaz, no futuro próximo deveremos reconhecer como aperfeiçoar o desenvolvimento de terapêuticas de baixo custo neste clima financeiro atual. A manipulação das CTMs provavelmente levará a resultados terapêuticos mais ideais. No entanto, o sucesso terapêutico terá de ser validado não apenas em ensaios clínicos, mas sob o olhar crítico de análises baseadas em evidências, e ser acessível dentro das limitações de um sistema de saúde com dificuldades financeiras.

Conclusão

Os aspectos inflamatório crônico e neurodegenerativo da EM são complexos. A este respeito, a terapia com CTMs tem o potencial de focar nos múltiplos níveis da fisiopatologia da EM, incluindo a imunomodulação e a reparação e regeneração de neurônios. No entanto, a perspectiva de terapias com CTMs deve ser contrabalanceada com a necessidade de se definir melhor a fisiopatologia da EM, bem como os efeitos in vivo das CTMs, sendo ambos criticamente necessários para assegurar o êxito desta terapia celular como um tratamento viável ou até mesmo para curar a EM.

Perspectivas

Apesar da definição de vias terapêuticas na EM, ainda permanecem grandes lacunas na compreensão da sua fisiopatologia, assim como na biologia e função das CTMs no contexto da doença neuronal, o que limita o sucesso no uso do transplante de CTMs para curar a EM.

O uso da terapia com CTMs alogênicas traz risco de sensibilização imune e riscos para a liberação do produto terapêutico. Aferir estes riscos deve ser o foco dos futuros estudos clínicos de fase intermediária. Inicialmente, uma abordagem autóloga minimiza o risco de aloimunização, mas permanecem questões sem resposta no que dizem respeito à potência e à variabilidade dos produtos com CTMs derivadas de pacientes doentes. Melhores ensaios biológicos para caracterização das CTMs e das respostas de potência devem resolver esta questão.

Com base na concorrência e na evolução de novas tecnologias de bioprocessamento, terapias com CTMs de doador universal podem evoluir para um produto de baixa margem de lucro e alta demanda tanto para a indústria farmacêutica quanto a de saúde. Em contraste, o modelo de produção autólogo se beneficiará do investimento em tecnologias de bioprocessamento, impulsionado por conceitos da medicina personalizada ligados às terapias com células-tronco pluripotentes e células-tronco embrionárias. Independentemente da fonte de CTMs ser autóloga versus alogênica, o avanço metodologicamente rigoroso para provar o seu mecanismo clínico de ação será essencial para o sucesso da aplicação da terapia com CTMs para EM. Em última análise, a abordagem terapêutica mais eficaz vai impulsionar o investimento em tecnologia capaz de tornar o tratamento de autoimunidade baseado em CTMs uma prática clínica padrão.