

Caro Colega,

Nos últimos 30 anos, uma parcela significativa e crescente da comunidade científica em todo o mundo tem se dedicado a tentar compreender o que são, como funcionam e quais as potenciais aplicações terapêuticas das células-tronco (CTs). Tomando por base a utilização das CTs hematopoiéticas em terapias consagradas (como o transplante de medula óssea, por exemplo) até as controversas CTs embrionárias (CTEs), o número de ensaios voltados para o campo da medicina regenerativa atesta o futuro promissor destes verdadeiros coringas biológicos.

Merecedoras de especial atenção por suas características biológicas e evidências relevantes de sua aplicabilidade segura, as células-tronco mesenquimais (CTMs) cada vez mais tem se mostrado candidatas apropriadas para uso autólogo e também alogênico na medicina regenerativa. **Atualmente já existem em todo o mundo 208 ensaios clínicos (em humanos) com CTMs, sendo 200 deles para testarem a segurança e a eficácia (Fases I e II) e apenas 8 deles no estágio mais avançado de ensaios multicêntricos de maior porte (Fase III). Isto demonstra que, apesar de ainda ser cedo para dispormos de resultados conclusivos, estamos no caminho certo.** Através do Stem Cell Review a Cordvida vem mantendo seu compromisso com a atualização da comunidade médica na área de terapia celular escolhendo alguns dos mais relevantes artigos científicos sobre terapias com células-tronco para compartilhar com nossos colegas.

Dr. Marlon Knabben, PhD
Diretor Médico CordVida

Células-tronco mesenquimais: imunobiologia e papel na imunomodulação e regeneração tecidual.

(Revisão)

Mesenchymal stem cells: immunobiology and role in immunomodulation and tissue regeneration.

Kode JA, Mukherjee S, Joglekar MV, Hardikar AA. Cytotherapy. 2009;11(4):377-91. Review.

Resumo

Células-tronco mesenquimais (MSCs) são células multipotentes que se diferenciam em osteoblastos, condrócitos, miócitos, adipócitos e células produtoras de insulina. O mecanismo subjacente à sua diferenciação in vivo não é claro e estima-se ser causado por fusão celular espontânea ou por fatores presentes no microambiente. No entanto, sua facilidade de isolamento, alto potencial de expansão 'ex-vivo' e capacidade de se diferenciar em várias linhagens tornam as MSCs ferramentas atraentes para uso potencial em terapia celular. As MSCs foram isoladas a partir de vários tecidos, incluindo tecido ósseo, medula óssea, gordura, geléia de Wharton, sangue do cordão umbilical, placenta e pâncreas. A propriedade imunossupressora das MSCs humanas as torna candidatas importantes para terapia celular em uso alogênico. O uso alogênico de MSCs para reparação de grandes defeitos pode ser uma alternativa aos procedimentos atuais de transplante de tecidos autólogos e alogênicos. Este artigo discute as MSCs humanas com especial referência à expressão de seus marcadores de superfície, seu papel como imunomoduladoras e seu potencial de diferenciação multilinhagem e possível uso na reparação e regeneração de tecidos.

Introdução

Células-tronco mesenquimais (MSCs) despertaram interesse muito antes do termo 'MSC' ter sido cunhado. Em 1867, Cohnheim identificou pela primeira vez MSCs na medula óssea como células-tronco não-hematopoiéticas. Friedenstein e outros (1966–1976) caracterizaram estas células como células derivadas da medula óssea, clonais, aderentes ao plástico, capazes de se diferenciar em osteoblastos, adipócitos e condrócitos. Estas células foram inicialmente referidas como 'células-tronco da medula'. O termo "células-tronco mesenquimais humanas" foi usado primeiramente por Caplan, em 1991 para descrever células homogêneas derivadas de medula, aderentes, que proliferam ex vivo e podem ser diferenciadas para produzir vários tipos celulares do tecido conjuntivo.

As MSCs residem em diversos tecidos e órgãos, tais como sangue, medula óssea fetal e adulta, baço, líquido amniótico, cartilagem, tendões, placenta, tecido adiposo, tecidos fetais, periósteo, líquido sinovial, timo, osso trabecular, derme, polpa dental e pulmão. Já se demonstrou que as MSCs podem se diferenciar não só nas linhagens condrogênica, adipogênica e osteogênica, mas também em outras como a linhagem ectodérmica (neuronal) e endodérmica (epitélio hepático, pancreático e respiratório).

Caracterização das MSCs

A identificação de proteínas específicas na superfície celular é um dos maiores desafios na caracterização de um tipo de célula que define o tipo de interações entre células vizinhas. As MSCs expressam receptores CD44, CD73, CD90 e CD105 enquanto os marcadores de células-tronco hematopoiéticas como CD14 e CD31, CD33, CD34, CD45 estão ausentes. Embora nenhum marcador específico de superfície celular possa explicitamente identificar as MSCs, o conjunto já descrito de diferentes marcadores fornece pistas para as interações que as MSCs podem estabelecer com outros tipos de células durante a expansão celular e/ou diferenciação.

Vários estudos mostraram que MSCs expandidas in vitro migram preferencialmente para locais de dano tecidual, onde melhoram a cicatrização de feridas, favorecem a regeneração e, no caso da medula óssea, restauram o microambiente medular após os danos causados por quimioterapia mieloablativa. As características das MSCs, como da maioria das células-tronco, sabidamente são reguladas por seu microambiente, composto de múltiplos fatores em diferentes concentrações, que interagem com estas

células independentemente ou, mais provavelmente, em combinação. As citocinas mais estudadas incluem as interleucinas, quimiocinas e interferons. Além dos fatores solúveis, as MSCs também são afetadas pela comunicação intercelular. Os perfis de expressão genética de citocinas das MSCs residentes no pulmão são distintos daquelas derivadas da medula óssea. Em MSCs derivadas de medula óssea a expressão elevada de osteopontina, um marcador para a osteogênese e também um importante fator para a hematopoiese, sugere um papel dos diferentes ambientes teciduais em determinar as funções das MSCs.

Estipula-se que, após estímulos como lesão mecânica, inflamação, infecção e câncer, as MSCs migrem do seu nicho ao local lesionado, levando à reparação tecidual. Os exatos eventos de sinalização que direcionam as MSCs para reparar os danos ainda são desconhecidos. Esta propriedade das MSCs tem sido estudada para a sua utilização como agentes terapêuticos de entrega que ajudam na reparação de tecidos danificados.

Imunomodulação

Há muito se sabe que as MSCs são imunomoduladoras. Estima-se que sua ação geral seja de orientar a resposta imune em direção de fenótipos anti-inflamatórios, incluindo a mudança da resposta T-helper tipo 1 (Th1) em direção a Th2, down regulation da produção de interferon gama (IFN- γ) pelas células NK (natural killer) e redução da produção de anticorpos pelas células B. As MSCs regulam a linfopoiese e suprimem a resposta imune. As MSCs de medula óssea participam no processo de desenvolvimento de linfócitos T e B via fatores de crescimento, citocinas e moléculas de adesão. Além disso, as MSCs mediam efeitos imunorreguladores tanto na imunidade inata quanto na adaptativa, indiretamente, através de fatores solúveis, ou diretamente, via contato físico direto. As MSCs não possuem moléculas MHC de classe II, indicando a possibilidade de evasão imune em ambientes alogênicos. As MSCs tem suscitado grande interesse clínico sob a forma de produtos "prontos para uso alogênico" ou como "células doadoras universais", particularmente na medicina regenerativa e para a indução de tolerância em transplantes alogênicos.

O co-cultivo de MSCs com linfócitos alogênicos falha em estimular a proliferação destas células, indicando que as MSCs são intrinsecamente não-immunogênicas. Além disso, as MSCs podem inibir a proliferação de linfócitos, de células apresentadoras

de antígeno (APC) e de células NK em reações mistas de linfócitos (MLR).

A potencialmente fatal doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH) pós-transplante de medula óssea é um modelo de MLR e frequentemente não responde completamente a vários esquemas imunossupressores. Abordagens atuais com moléculas imunes como alvo mostram grande promessa no tratamento da DECH. No entanto, estudos recentes têm demonstrado que as MSCs podem não ser imunoprivilegiadas, como se pensava anteriormente.

Também foi mostrado que as MSC suprimem a proliferação de células T e a produção de citocinas, através de mecanismos ainda desconhecidos. A capacidade imunossupressora das MSCs não é inata, mas sim induzida por citocinas pró-inflamatórias, produzidas durante uma resposta imune e que induzem a expressão de quimiocinas pelas MSCs. Estas quimiocinas podem servir para recrutar/mobilizar linfócitos, uma etapa-chave na imunossupressão mediada pelas MSCs. De maneira geral, as MSCs parecem regular a resposta imune reduzindo a geração/diferenciação de células dendríticas, aumentando o número de células T reguladoras e suprimindo as células T efetoras através de vários fatores de crescimento, iNOS, heme-oxigenase-1, PGE2 e IDO (indolamina-2,3-oxigenase). Além disso, upregulation de moléculas MHC de classe II nas MSCs poderia levar a downregulation da proliferação e citotoxicidade das células NK.

Regeneração de tecidos

Células-tronco estão sendo consideradas como ferramentas de substituição, reparação, regeneração e renovação de células/tecidos lesados ou mortos. Certas doenças, como a doença de Parkinson, são causadas pela degeneração progressiva de um ou mais tipos celulares. Em tais casos, células-tronco utilizadas como terapia de substituição tem sido propostas para oferecer tratamento ao longo de toda a vida. Ao isolar as células-tronco, acredita-se também que novas células cardíacas poderiam ser cultivadas, por exemplo, para reparar danos causados por ataques cardíacos, ou as células do fígado para tratar a cirrose. Uma vez implantadas, as células-tronco seriam capazes de interagir com o microambiente circundante e facilitar a regeneração dos tecidos vizinhos através da secreção de certos fatores e renovação das funções biológicas (como o sistema imunológico) ou agindo troficamente para dar suporte e rejuvenescer as

células do hospedeiro. Essas propriedades levaram à suposição de que as MSCs podem ter um papel importante na reparação e regeneração de tecidos.

“Uma vez implantadas, as células-tronco seriam capazes de interagir com o microambiente circundante e facilitar a regeneração dos tecidos vizinhos”

Regeneração tecidual

As MSCs derivadas do embrião humano podem ser transformadas em células epidérmicas, in vitro e in vivo. Dadas as propriedades regenerativas, imunomoduladoras e de privilégio imunológico das MSCs, um possível uso para essas células é acelerar a cicatrização de feridas. Em um recente estudo pré-clínico, se demonstrou que MSCs de medula óssea humana (cultivadas em uma esponja de colágeno imitando uma camada de derme) se diferenciaram em tecido dérmico após implantação subcutânea em ratos imunodeprimidos. Além disso, o transplante de enxertos autólogos gerados a partir de uma matriz de colágeno e MSCs demonstrou melhora significativa em feridas que não cicatrizavam em 18 de 20 pacientes com dermatopatias refratárias. Também se sugere que as MSCs têm um papel na regeneração neural. MSCs implantadas em enxertos musculares desvitalizados dão algum suporte à regeneração de nervos periféricos. Transplante de MSCs no núcleo estriado tem promovido melhorias funcionais em modelos murinos de doença de Parkinson. Nos seres humanos, MSCs transdiferenciadas em células-tronco neurais melhoraram a recuperação funcional e elétrica de dois pacientes com lesão medular crônica.

O transplante de tecidos é o principal tratamento para várias doenças hepáticas em fase final e para o diabetes. Ele é dificultado pela falta de órgãos doados e complicações associadas à imunossupressão e à rejeição. Embora não haja evidência crescente sugerindo a medula óssea como fonte de progenitores de células beta pancreáticas, agora se acredita que células mesenquimais de medula óssea transplantadas podem ajudar na indução de regeneração e/ou a proliferação de células produtoras de insulina previamente residentes. MSCs da medula óssea

podem efetivamente se transdiferenciar em hepatócitos, tanto in vitro como in vivo. Elas também permitem resgatar quadros experimentais de insuficiência hepática, propiciando regeneração hepática e oferecendo, portanto, uma potencial terapia de reposição de células para o tratamento de doenças do fígado. MSCs originárias da medula óssea podem contribuir para a reparação da vasculatura de ilhotas pancreáticas danificadas e podem resgatar os danos de longo prazo associados com a diabetes, como a neuropatia, cardiomiopatia, nefropatia e pé diabético.

Ensaios clínicos em terapia celular

As MSCs atualmente estão sendo avaliadas em diversos estudos pré-clínicos e clínicos e oferecem um potencial significativo como uma nova terapia celular para reparação e regeneração de tecidos. Vários estudos em modelos animais de lesão cardíaca, acidente vascular cerebral e isquemia renal demonstraram o potencial clínico das MSCs na reparação e regeneração de tecidos. Alguns estudos em humanos demonstraram que a aplicação de MSCs autólogas e alogênicas expandidas por cultivo celular para transplantes de medula óssea leva à migração das MSCs para a medula óssea, propiciando rejuvenescimento do estroma medular de pacientes tratados com quimio e radioterapia.

O mecanismo que regula todos esses casos parece ser o mesmo: as MSCs secretam fatores biologicamente ativos que inibem a formação de cicatriz e a apoptose e induzem a angiogênese e proliferação de células-tronco ou progenitoras intrínsecas. Essa atividade complexa, multifacetada, causada pela atividade secretora das MSCs é referida como “atividade trófica”, sendo distinta da capacidade das MSCs em se diferenciar. Várias empresas de biotecnologia têm desenvolvido formulações patenteadas de células-tronco adultas e avaliado a segurança em ensaios clínicos de fase II/III para tratamento de DECH aguda, neoplasias hematológicas e doença de Crohn. Formulações similares são propostas com potencial para o tratamento da diabetes tipo 1, insuficiência cardíaca, insuficiência hepática, cirrose, defeitos de ossos longos, feridas/queimaduras não cicatrizantes, etc e, em breve, serão utilizadas em ensaios clínicos.

Aplicação clínica em terapia gênica

Nas últimas duas décadas, a capacidade de transferir genes para MSCs e a capacidade das MSCs em migrar para uma lesão tem gerado esperanças em relação

ao uso de abordagens baseadas em terapia gênica para fornecer resultados terapêuticos em longo prazo.

As MSCs podem ter as células tumorais com alvo e esta abordagem tem sido sugerida como meio possível para a entrega/transporte de agentes terapêuticos. Esta propriedade também pode ser usada para rastrear cânceres e seletivamente matar células tumorais através da incorporação de um gene antitumoral nas MSCs.

Conclusões

Uma abordagem alogênica permitiria que MSCs fossem isoladas de um doador qualquer, expandidas e criopreservadas, fornecendo uma fonte prontamente disponível de células para engenharia de tecidos. Estes fatos são fortemente refletidos no atual crescimento exponencial nos estudos de investigação de células-tronco nas comunidades de farmacêuticas e de biotecnologia.

Com a expansão do conhecimento sobre células-tronco pluripotentes induzidas (iPS), a imunomodulação pode ser mais fácil de se conseguir usando células somáticas dos pacientes.

Por exemplo, a obtenção de uma biópsia de pele para estabelecer uma população de células pluripotentes que não seja rejeitada pelo paciente parece ser viável. No entanto, a capacidade de diferenciar com eficiência essas células em tipos celulares especializados que mantenham essas propriedades no transplante in situ continua a ser a tarefa principal em terapias de medicina regenerativa bem-sucedidas. Além disso, a abordagem terapêutica utilizando células-tronco adultas elimina os riscos adicionais de rejeição e de formação de teratomas, vistos nos tratamentos baseados em células-tronco embrionárias (ES). Com base em estudos realizados até o momento, admite-se que a terapia com MSCs é focada em proporcionar uma abordagem mais segura para o tratamento de doenças neurodegenerativas, insuficiências cardíacas, queimaduras, defeitos ósseos, etc, em comparação com o potencial oferecido pelas células ES. No entanto, o conhecimento atual da imunobiologia e aplicação clínica das MSCs necessita ser reforçado através da realização de estudos sistemáticos em ratos, em modelos com grandes animais e então em estudos-piloto humanos. Isso pode abrir o caminho para a mais rápida comercialização de produtos à base de MSC em comparação com a terapia baseada em célula ES ou iPS.