

Pesquisa Básica na Terapia Celular - Luxo ou Necessidade?

Hans Fernando Rocha Dohmann
Rio de Janeiro, RJ

A terapia celular é uma idéia inovadora, com uma enorme perspectiva de contribuir para o tratamento de cardiopatas agudos e crônicos. Foi a partir de resultados promissores dos primeiros estudos experimentais, que foram iniciados os estudos clínicos em humanos.

Estudos experimentais iniciais e, posteriormente, ensaios clínicos levantaram várias hipóteses, entre elas a de que o mecanismo fundamental pelo qual a neovascularização aumentaria o desenvolvimento da rede de colaterais seria através do fornecimento de citocina suplementar a indivíduos, que devido a idade avançada, diabetes, hipercolesterolemia e outras circunstâncias, ainda não definidas, seriam incapazes de aumentar a expressão de citocinas em resposta a isquemia tecidual. Apresentaram também a hipótese de que a administração de citocina claramente representaria, somente, um aspecto da intervenção terapêutica.

As implicações terapêuticas dos fatores de crescimento angiogênicos foram identificadas há 2 décadas pelos estudos pioneiros de Folkman e cols., investigações posteriores estabeleceram a possibilidade da utilização de formulações de fatores de crescimento angiogênicos recombinantes com o objetivo de desenvolver ou aumentar a rede de colaterais em modelos animais de isquemia crônica miocárdica ou de membro, o que ampliou a área de conhecimento em angiogênese¹. A partir desses achados iniciais, diversos estudos experimentais, utilizando proteína recombinante ou transferência gênica de VEGF, FGF-2 e HGF, foram realizados²⁻⁴.

Os estudos experimentais com células mononucleares da medula óssea revolucionaram o paradigma de que as células endoteliais eram geradas por replicação de células endoteliais maduras^{5,6}. Asahara e cols. observaram que grande parte das células envolvidas no processo de angiogênese tinham origem na MO⁵. Mais ainda, possibilitaram a descoberta de que há vasculogênese na vida adulta, ou seja, que ocorre surgimento de novos vasos na vida adulta e não somente a replicação de capilares, a partir de vasos já existentes, conceituando o que se sabe, hoje, sobre angiogênese. Após essa publicação muitas outras se seguiram confirmando tais resultados⁶⁻¹⁵.

A utilização de células originadas da MO em experimentos de neovascularização conta com literatura consistente, onde já foram utilizados modelos de isquemia miocárdica aguda e crônica, conduzidos em diversos animais, utilizando a intracoronariana, via transendocárdica e a transepicárdica¹⁶⁻²⁷.

O implante de células-tronco originadas na medula óssea (CT-MO) foi capaz de melhorar a contração e a perfusão miocárdica

em modelos animais de infarto miocárdico e isquemia crônica^{20,25,26,28,29}. Modelos de membro isquêmico em animais também obtiveram neovascularização bem sucedida, a partir do implante de células da MO^{18,22}.

Quanto a capacidade das CT-MO de regenerarem miócitos, muito ainda precisa ser esclarecido. A maioria dos estudos experimentais *in vitro* e *in vivo* aponta para as células do estroma da medula óssea, como sendo as principais responsáveis pela transdiferenciação em cardiomiócitos^{30,31}. Makino e cols. demonstraram desenvolvimento de cardiomiócitos *in vitro* a partir de células mesenquimais de camundongos tratadas com azacitidina³². Estudos experimentais posteriores em animais demonstraram a diminuição da área de fibrose após o transplante com células mesenquimais, tratadas com essa mesma droga. Ainda não está claro se tal técnica pode ser reproduzida em seres humanos apesar desses resultados, uma vez que os efeitos da azacitidina sobre as propriedades mitogênicas das células, ainda não estão totalmente esclarecidos. Os estudos experimentais desenvolvidos por Orlic e cols. puderam demonstrar, pela primeira vez em 2001, que uma subpopulação de células Lin⁻Kit⁺ da medula óssea foi capaz de regenerar o miocárdio *in vivo*³³⁻³⁶. Tais achados abriram um leque de possibilidades para o uso de células mesenquimais na regeneração do músculo cardíaco.

Com base nessa vasta gama de informações pré-clínicas, a partir de 2001, diversos ensaios clínicos em humanos foram publicados. O primeiro relato sobre o uso de CT-MO foi apresentado na Alemanha pelo Dr Bodo Strauer, em agosto de 2001, que realizou a injeção de CT-MO por via coronariana em um paciente após infarto agudo do miocárdio, com segurança^{37,38}.

No estudo TOPCARE, também realizado na Alemanha, o uso de CT-MO e CT selecionadas no sangue periférico por infusão intracoronariana, quatro dias após o infarto agudo do miocárdio em pacientes tratados por angioplastia primária, sugeriu redução da área de necrose ao final de 4 meses³⁹. Wallert e cols. publicaram em julho de 2004 os resultados do primeiro estudo randomizado em pacientes com infarto agudo do miocárdio (*BOOST trial*), demonstrando a melhora da fração ejeção no seguimento de 6 meses pós implante intracoronariano de CT-MO⁴⁰.

Em dezembro de 2001, quando ainda não havia nenhum anúncio de implante transendocárdico de células, nosso grupo, integrado pelas equipes do Hospital Pro-Cardíaco, da Universidade Federal do Rio de Janeiro e do Texas Heart Institute, baseado nos resultados iniciais do implante intramiocárdico de CT-MO em ratos infartados, através da ligadura da artéria coronária DA e do implante transendocárdico, guiado por cateter NOGA, em cachorros também infartados com uma técnica semelhante⁴¹⁻⁴³, conduziu

um estudo com implante transendocárdico por cateter de CT-MO em 14 pacientes com insuficiência cardíaca de etiologia isquêmica, sem possibilidade de revascularização miocárdica convencional, demonstrando melhora dos sintomas e da perfusão miocárdica ao final de 2 meses⁴⁴. Tse e cols. também realizaram transplantes de CT-MO em pacientes sem possibilidade de revascularização, porém com função ventricular normal, utilizando cateteres NOGA e observaram redução da área de isquemia à ressonância magnética de perfusão após 3 meses.

Outros estudos com implante de CT-MO durante a cirurgia de revascularização miocárdica, também foram realizados com sucesso^{45,46}, confirmando os resultados de estudos experimentais prévios em modelos caninos, de que não houve nenhuma alteração prejudicial nos corações, onde as células-tronco foram injetadas.

Estudos em animais demonstraram que vários tecidos, além da medula óssea, possuem células-tronco com grande plasticidade, como a musculatura estriada esquelética. Teoricamente, as células satélites do músculo esquelético talvez pudessem ter uma capacidade de regeneração do miocárdio superior à das células da medula óssea.

Vários grupos investigaram a hipótese de que as células satélites do músculo esquelético pudessem se transdiferenciar em células com propriedades semelhantes às dos miócitos. Isso foi demonstrado com a realização de cardiomioplastia utilizando o músculo grande dorsal eletricamente pré-condicionado⁴⁷. Resultados promissores também foram obtidos em modelos animais de ratos, coelhos, cachorros, ovelhas e suínos, demonstrando que mioblastos implantados em áreas do miocárdio submetidas à crioinjúria, adquiriram miotubulos incipientes com posterior desenvolvimento de miofibrilas, funcionalmente semelhantes aos cardiomiócitos adjacentes. Posteriormente pôde ser observada a melhora da função sistólica do ventrículo esquerdo em modelos de ratos infartados submetidos ao implante de mioblastos comparado ao implante de cardiomiócitos fetais.

Apesar da habilidade dessas células do músculo esquelético sobreviverem em meio ao tecido fibrótico, existe grande preocupação quanto às diferenças biológicas dessas células em relação ao cardiomiócito adulto, que influenciam o sucesso da integração dessas células ao miocárdio receptor, principalmente no que diz respeito a formação de *gap junctions* e a função dos receptores dihidropiridínicos³⁰.

A co-cultura de células da musculatura estriada esquelética com células mesenquimais, conforme proposto por Souza e cols., talvez possa trazer uma alternativa às diferenças morfofuncionais entre mioblastos e cardiomiócitos que resulte em acomplamento eletromecânico com sucesso.

Menasche e cols. publicaram pela primeira vez, o sucesso do transplante de mioblastos em pacientes com cardiopatia isquêmica grave⁴⁸, durante a cirurgia de revascularização miocárdica, demonstrando melhora da viabilidade e contratilidade nas áreas antes acinéticas, no seguimento de 5 meses, a despeito do aumento da incidência de arritmias ventriculares malignas⁴⁹⁻⁵¹.

A probabilidade do benefício da terapia celular em estudos clínicos futuros em humanos deve ultrapassar todos os riscos que esse tipo de terapia possa oferecer. Tais conclusões só podem ser inicialmente retiradas através de exaustivos estudos experimentais já realizados em animais, onde tanto a potencial eficácia quanto os possíveis riscos tenham sido estabelecidos.

Já se somam perto de 30 anos de pesquisa básica com terapia celular, tendo o primeiro estudo publicado em 1975, onde foi investigado o crescimento espontâneo de células da medula óssea em tecido tumoral⁵², e muitas questões ainda aguardam respostas.

O modelo ideal de célula tronco a ser injetado ainda é desconhecido, assim como a quantidade e os subtipos celulares essenciais para o bem sucedido e adequado desenvolvimento de angiogênese e cardiomiogênese. Alternativas concomitantes também precisam ser investigadas, como a associação de terapia medicamentosa ou modificação do microambiente tecidual e/ou celular por engenharia genética.

Até o presente momento, ainda não se sabe se a terapia celular deve ser realizada na fase inicial do infarto agudo do miocárdio, ou quando o ventrículo esquerdo já estiver remodelado, ou ainda, tardiamente, na cardiopatia isquêmica avançada. Não se sabe se existe algum subtipo celular mais adequado para cada objetivo terapêutico, seja o de angiogênese ou miogênese ou ambos, ou se é a interação do *pool* total de células e seu caldo de citocinas e mediadores inflamatórios com o microambiente tecidual que determina o caminho da regeneração tecidual a ser seguido. O fato é que diversas questões permanecem a respeito dos mecanismos funcionais dessas células *in vivo*, assim como da capacidade dessas células se integrarem elétrica e funcionalmente ao tecido miocárdico. Em se tratando de terapia com mioblastos, estudos clínicos em seres humanos têm demonstrado grande potencial de arritmias malignas, talvez sugerindo que haja discordância entre as propriedades contráteis e estruturais dessas células em oposição às suas características eletrofisiológicas.

A evidência científica tanto *in vitro* quanto *in vivo* tem demonstrado o potencial de diferenciação celular das células tronco e sua capacidade plástica em animais e, possivelmente, em humanos. Contudo, muito ainda precisa ser esclarecido, a partir de modelos pré-clínicos até a sua translação para modelos de terapia em seres humanos, que sejam seguros e eficazes.

O avanço na pesquisa básica é de fundamental importância para que os estudos em humanos possam ir adiante, com modelos randomizados, controlados e duplo-cego, de forma a permitir a clara avaliação dos possíveis benefícios e de forma rápida e eficiente, dar o retorno não somente a sociedade como um todo, mas também e, principalmente, à população de cardiopatas e vasculopatas agudos ou crônicos, cuja sobrevivência numa grande parcela dos casos depende do surgimento de novas modalidades terapêuticas.

Em nossa experiência, não teria sido possível propor um protocolo em humanos, como foi feito em 2001, com chances adequadas de sobrepor os benefícios aos riscos, sem as informações dos modelos experimentais. A opção entre mioblastos ou células da medula óssea, a opção da via de administração em relação ao modelo clínico que pretendíamos tratar, a opção entre *pool* de células mononucleares ou separação de células, enfim, todas opções fundamentais para o desenho do estudo clínico proposto foram feitas com base em informações colhidas de modelos experimentais desenvolvidos pelo Instituto do Milênio de Bioengenharia Tecidual.

Apesar de todo avanço que ocorreu no campo da terapia celular, fica claro que novas técnicas de administração de células devem estar embasadas em modelos experimentais. Grupos de pesquisa ao redor do mundo que queiram iniciar sua própria experiência com terapia celular devem, portanto, reproduzir técnicas já demonstradas como seguras em outras experiências clínicas ou desenvolver base experimental para tal, como os artigos publicados



neste número. A decisão do momento da passagem para a fase clínica não obedece à regra específica (variando de situação para situação na dependência de diversos fatores), mas será sempre

da responsabilidade, que o coordenador do projeto ache razoável assumir, desde que respaldado pela sociedade civil, através dos órgãos competentes para este fim, ou seja, o sistema CEP/CONEP.

Referências

1. Takeshita S, Zheng LP, Brogi E, et al. Therapeutic angiogenesis. A single intraarterial bolus of vascular endothelial growth factor augments revascularization in a rabbit ischemic hind limb model. *J Clin Invest.* 1994;93:662-70.
2. Vale PRMD, Losordo DWMD, Milliken CEMS, et al. Randomized, Single-Blind, Placebo-Controlled Pilot Study of Catheter-Based Myocardial Gene Transfer for Therapeutic Angiogenesis Using Left Ventricular Electromechanical Mapping in Patients With Chronic Myocardial Ischemia. [Article]. *Circulation.* 2001; 103: 2138-43.
3. Sarkar N, Ruck A, Kallner G, et al. Effects of intramyocardial injection of phVEGF-A165 as sole therapy in patients with refractory coronary artery disease - 12-month follow-up: Angiogenic gene therapy. [Article]. *Journal of Internal Medicine.* 2001; 250:373-81.
4. Murohara T, Asahara T, Silver M, et al. Nitric oxide synthase modulates angiogenesis in response to tissue ischemia. *J Clin Invest.* 1998;101:2567-78.
5. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science.* 1997;275:964-7.
6. Asahara T, Isner JM. Endothelial progenitor cells for vascular regeneration. *J Hematother Stem Cell Res.* 2002;11:171-8.
7. Bhattacharya V, McSweeney PA, Shi Q, et al. Enhanced endothelialization and microvessel formation in polyester grafts seeded with CD34(+) bone marrow cells. *Blood.* 2000;95:581-5.
8. Boyer M, Townsend LE, Vogel LM, et al. Isolation of endothelial cells and their progenitor cells from human peripheral blood. *J Vasc Surg.* 2000;31:181-9.
9. Davidoff AM, Ng CY, Brown P, et al. Bone marrow-derived cells contribute to tumor neovasculature and, when modified to express an angiogenesis inhibitor, can restrict tumor growth in mice. *Clin Cancer Res.* 2001;7:2870-9.
10. Edelberg JM, Tang L, Hattori K, Lyden D, Rafii S. Young adult bone marrow-derived endothelial precursor cells restore aging-impaired cardiac angiogenic function. *Circ Res.* 2002;90:E89-93.
11. Gill M, Dias S, Hattori K, et al. Vascular trauma induces rapid but transient mobilization of VEGFR2(+)AC133(+) endothelial precursor cells. *Circ Res.* 2001;88:167-74.
12. Gunsilius E. Bone marrow-derived endothelial cells for therapeutic angiogenesis and antiangiogenesis: facts and visions. *J Hematother Stem Cell Res.* 2002;11:153-5.
13. Ikpeazu C, Davidson MK, Haltzman D, Browning PJ, Brandt SJ. Donor origin of circulating endothelial progenitors after allogeneic bone marrow transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2000;6:301-8.
14. Lin Y, Weisdorf DJ, Solovey A, Heibel RP. Origins of circulating endothelial cells and endothelial outgrowth from blood. *J Clin Invest.* 2000;105:71-7.
15. Shi Q, Rafii S, Wu MH, et al. Evidence for circulating bone marrow-derived endothelial cells. *Blood.* 1998;92:362-7.
16. Kalka C, Asahara T, Krone W, Isner JM. [Angiogenesis and vasculogenesis. Therapeutic strategies for stimulation of postnatal neovascularization]. *Herz.* 2000;25:611-22.
17. Asahara T, Masuda H, Takahashi T, et al. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res.* 1999;85:221-8.
18. Al-Khalidi A, Al-Sabti H, Galipeau J, Lachapelle K. Therapeutic angiogenesis using autologous bone marrow stromal cells: improved blood flow in a chronic limb ischemia model. *Ann Thorac Surg.* 2003;75:204-9.
19. Carmeliet P, Luttun A. The emerging role of the bone marrow-derived stem cells in (therapeutic) angiogenesis. *Thromb Haemost.* 2001;86:289-97.
20. Fuchs S, Baffour R, Zhou YF, et al. Transendocardial delivery of autologous bone marrow enhances collateral perfusion and regional function in pigs with chronic experimental myocardial ischemia. *J Am Coll Cardiol.* 2001;37:1726-32.
21. Hamano K, Li TS, Kobayashi T, et al. Therapeutic angiogenesis induced by local autologous bone marrow cell implantation. *Ann Thorac Surg.* 2002;73:1210-5.
22. Hamano K, Li TS, Kobayashi T, et al. The induction of angiogenesis by the implantation of autologous bone marrow cells: a novel and simple therapeutic method. *Surgery.* 2001;130:44-54.
23. Ikenaga S, Hamano K, Nishida M, et al. Autologous bone marrow implantation induced angiogenesis and improved deteriorated exercise capacity in a rat ischemic hindlimb model. *J Surg Res.* 2001;96:277-83.
24. Kawamoto A, Tkebuchava T, Yamaguchi J-I, et al. Intramyocardial Transplantation of Autologous Endothelial Progenitor Cells for Therapeutic Neovascularization of Myocardial Ischemia. *Circulation.* 2003;107:461-8.
25. Kamihata H, Matsubara H, Nishie T, et al. Implantation of bone marrow mononuclear cells into ischemic myocardium enhances collateral perfusion and regional function via side supply of angioblasts, angiogenic ligands, and cytokines. *Circulation.* 2001;104:1046-52.
26. Kocher AA, Schuster MD, Szabolcs MJ, et al. Neovascularization of ischemic myocardium by human bone-marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function. *Nat Med.* 2001; 7:430-6.
27. Takakura N, Watanabe T, Suenobu S, et al. A role for hematopoietic stem cells in promoting angiogenesis. *Cell.* 2000;102:199-209.
28. Tomita S, Mickle DA, Weisel RD, et al. Improved heart function with myogenesis and angiogenesis after autologous porcine bone marrow stromal cell transplantation. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2002;123:1132-40.
29. Shake JG, Gruber PJ, Baumgartner WA, et al. Mesenchymal stem cell implantation in a swine myocardial infarct model: engraftment and functional effects. *Ann Thorac Surg.* 2002;73:1919-25; discussion 1926.
30. Hughes S. Cardiac stem cells. *J Pathol.* 2002;197:468-78.
31. Prockop DJ. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science.* 1997;276:71-4.
32. Makino S, Fukuda K, Miyoshi S, et al. Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro. *J Clin Invest.* 1999;103:697-705.
33. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, et al. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature.* 2001;410:701-5.
34. Orlic D, Hill JM, Arai AE. Stem cells for myocardial regeneration. *Circ Res.* 2002;91: 1092-102.
35. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Bodine DM, Leri A, Anversa P. Transplanted adult bone marrow cells repair myocardial infarcts in mice. *Ann N Y Acad Sci.* 2001;938: 221-9; discussion 229-30.
36. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, et al. Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001; 98:10344-9.
37. Strauer BE, Brehm M, Zeus T, et al. [Intracoronary, human autologous stem cell transplantation for myocardial regeneration following myocardial infarction]. *Dtsch Med Wochenschr.* 2001;126:932-8.
38. Strauer BE, Brehm M, Zeus T, et al. Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans. *Circulation.* 2002;106:1913-8.
39. Assmus B, Schachinger V, Teupe C, et al. Transplantation of Progenitor Cells and Regeneration Enhancement in Acute Myocardial Infarction (TOPCARE-AMI). *Circulation.* 2002;106:3009-17.
40. Wollert KC, Meyer GP, Lotz J, et al. Intracoronary autologous bone-marrow cell transfer after myocardial infarction: the BOOST randomised controlled clinical trial. [see comment]. *Lancet.* 2004;364:141-8.
41. Olivares EL, Ribeiro VP, Castro JPW. Bone Marrow Stromal Cells Improve Cardiac Performance in Healed Infarcted Rat Hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2004.
42. Olivares EL, Ribeiro VP, Ribeiro KC, et al. Bone Marrow Stromal Cells Improve Cardiac Performance in Healed Infarcted Rat Hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2004.
43. Perin EC, Young J, Sousa A, Silva G, Coulter S. Intramyocardial Delivery of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells Improves Myocardial Contractility in a Chronic Ischemic Model. *J Am Coll Cardiol.* 2003;41:1178-88.
44. Perin EC, Dohmann HF, Boroevic R, et al. Transendocardial, autologous bone marrow cell transplantation for severe, chronic ischemic heart failure. *Circulation.* 2003;107:2294-302.
45. Hamano K, Nishida M, Hirata K, et al. Local implantation of autologous bone marrow cells for therapeutic angiogenesis in patients with ischemic heart disease: clinical trial and preliminary results. *Jpn Circ J.* 2001;65:845-7.
46. Stamm C, Westphal B, Kleine HD, et al. Autologous bone-marrow stem-cell transplantation for myocardial regeneration. *Lancet.* 2003;361:45-6.
47. Hooper TL, Stephenson LW. Cardiomyoplasty for end-stage heart failure. *Surgery Annual.* 1993;25:157-73.
48. Menasche P, Hagege A, Scorsin M, et al. [Autologous skeletal myoblast transplantation for cardiac insufficiency. First clinical case]. *Arch Mal Coeur Vaiss.* 2001;94: 180-2.
49. Menasche P. Myoblast transplantation: feasibility, safety and efficacy. *Ann Med.* 2002;34:314-5.
50. Menasche P. Cell transplantation for the treatment of heart failure. *Semin Thorac Cardiovasc Surg.* 2002;14:157-66.
51. Menasche P, Hagege AA, Vilquin JT, et al. Autologous skeletal myoblast transplantation for severe postinfarction left ventricular dysfunction. *J Am Coll Cardiol.* 2003;41:1078-83.
52. Nooter K, Bentvelzen P. Cell density-dependent growth in agar of bone marrow cell from tumor-bearing BALB/c mice in the absence of a colony-stimulating factor. *Cancer Research.* 1975;35:117-21.