



Universidade Federal do Rio de Janeiro
Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho
Laboratório de Cardiologia Celular e Molecular

Tais Hanae Kasai Brunswick

**Caracterização morfofuncional das células de
medula óssea de pacientes submetidos à terapia
celular**

Rio de Janeiro

2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Tais Hanae Kasai Brunswick

Caracterização morfofuncional das células de medula óssea de pacientes submetidos à terapia celular

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas- Fisiologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro visando à obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas – Fisiologia.

Orientadores:

Prof. Regina Coeli dos Santos Goldenberg

Prof. Antônio Carlos Campos de Carvalho

Rio de Janeiro

2009

FICHA CATALOGRÁFICA

Kasai - Brunswick, Tais Hanae

Caracterização morfofuncional das células de medula óssea de pacientes submetidos à terapia celular. - Rio de Janeiro, 2009.

xv+ 100p.

**Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas –Fisiologia)
Universidade Federal do Rio de Janeiro- UFRJ, Laboratório de Cardiologia Celular e Molecular do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho do Centro de Ciências de Saúde, 2009**

Orientadores: Regina Coeli dos Goldenberg e Antonio Carlos Campos de Carvalho

1. Células mononucleares de medula óssea; 2. Terapia celular; 3. Células –tronco mesenquimais de medula óssea – Teses I. Goldenberg, Regina Coeli dos Santos e Campos-de-Carvalho, Antonio Carlos (orient.). II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Laboratório de Cardiologia Celular e Molecular, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho do Centro de Ciências de Saúde. III. Caracterização morfofuncional das células de medula óssea de pacientes submetidos à terapia celular.

Dissertação desenvolvida no Laboratório de Cardiologia Celular e Molecular do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio de Janeiro com auxílio dos órgãos CNPq e FAPERJ.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Tais Hanae Kasai Brunswick

Caracterização morfofuncional das células de medula óssea de pacientes submetidos à terapia celular

Laboratório de Cardiologia Celular e Molecular do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre.

Rio de Janeiro, 01 de setembro de 2009

Prof. Dra. Regina Coeli dos Santos Goldenberg – Orientadora

Laboratório de Cardiologia Celular e Molecular do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho do Centro de Ciências de Saúde da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Prof. Dr. Antonio Carlos Campos de Carvalho – Orientador

Laboratório de Cardiologia Celular e Molecular do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho do Centro de Ciências de Saúde da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Prof. Dra Vivian Mary Barral Dodd Rumjanek – Membro da Banca Examinadora

Laboratório de Imunologia Tumoral do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho do Centro de Ciências de Saúde da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Prof. Dr. Angelo Maiolino – Membro da Banca Examinadora

Coordenador do Programa de Transplante de Medula óssea do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho e docente de programa de pós-graduação em Clínica Médica da UFRJ.

Prof. Dr. Fernando Costa e Silva Filho – Membro da Banca Examinadora

Laboratório de Biologia da Superfície Celular do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho do Centro de Ciências de Saúde da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Prof. Dr. Marcelo Felipe Santiago – Revisor e Suplente Interno

Laboratório de Neurologia Celular e Molecular do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho do Centro de Ciências de Saúde da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Prof. Dr. Alex Balduino – Suplente externo

Laboratório de Terapia Celular do Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia. Centro de Pesquisa em Terapia Celular e Bioengenharia Ortopédica.

*Ao meu marido, Jean, por
tudo!*

AGRADECIMENTOS

A Deus por me garantir ânimo, inspiração e confiança na confecção deste trabalho.

Ao meu marido, Jean, meu amor, minha paixão. Agradeço por sempre me incentivar a seguir em frente, por ser um verdadeiro companheiro e amigo

Aos meus pais, Shoji e Solange, exemplos de caráter, honra e determinação, agradeço não só por minha formação acadêmica, mas principalmente pela minha formação pessoal. Por todo amor o meu muito obrigada!

Aos meus irmãos, Erika, Nando e Gu pelo apoio incondicional, por estarem sempre presentes, me auxiliando e me motivando a continuar.

Aos meus orientadores, Prof. Regina e Antonio, pela oportunidade que me foi dada, por incentivar e acreditar em meu crescimento profissional.

A Andreza e Ju Passipieri pela amizade incondicional. Meninas, como já diziam vocês: “quem tem amigo tem tudo”!

Aos amigos e colegas do Laboratório de Caridiologia Celular e Molecular por tornarem menos árduos os experimentos, mais leves e divertidas as horas de trabalho e por estarem sempre prontos a ajudar.

Ao Igor e Fabi pelos ensinamentos em citometria.

A todos que contribuíram de alguma forma para minha formação e para realização deste trabalho e que não estão aqui listados o meu sincero muito obrigada!

RESUMO

KASAI-BRUNSWICK, Tais Hanae. **Caracterização morfofuncional das células de medula óssea de pacientes submetidos à terapia celular.** Rio de Janeiro, 2009. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas – Fisiologia) - Laboratório de Cardiologia Celular Molecular, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.

As doenças crônicas representam 60% das mortes em todo o mundo. São doenças de longa duração, progressão lenta e, em geral, não apresentam tratamentos eficazes, salvo o transplante de órgãos em alguns casos. Assim o desenvolvimento de alternativas terapêuticas torna-se imperativo, e a partir de 1990 a utilização de células mononucleares de medula óssea (CMMO), surge como uma alternativa para tratamento destas doenças. No entanto, a medula óssea parece ser afetada pelas doenças de natureza crônica. Nosso estudo visou isolar e caracterizar CMMO e cultivar células mesenquimais da medula óssea (MSC) de pacientes com diagnóstico de cirrose hepática, acidente vascular cerebral isquêmico e cardiomiopatia chagásica comparando-as com a de doadores saudáveis. As CMMO foram isoladas do aspirado medular (aproximadamente 120 ml), obtido por punção da crista ilíaca. As CMMO coletadas após a centrifugação em Ficoll 1.077 foram separadas para transplante autólogo (mínimo de $1,0 \times 10^8$ cels/ paciente), caracterização imunofenotípica por citometria de fluxo ($1,0 \times 10^7$ cels) e cultura *in vitro* para obtenção de MSC, que compõem a fração aderente das CMMO ($8,0 \times 10^5$ cels/ cm^2). Foi avaliado, na fração cultivada, o potencial gerador de unidades de colônias formadoras de fibroblastos (CFU-F), a capacidade de diferenciação em osteócitos e adipócitos, o perfil imunofenotípico expresso em cultura e a presença das proteínas vimentina, SSEA-4, TRA1-60 foi detectada por imunofluorescência. Nas frações de CMMO foram identificados linfócitos T, B e NK; monócitos, neutrófilos, eritroblastos, MSC, HSC. O percentual dessas populações foi semelhante entre pacientes x normal. As CMMO foram plaqueadas e sua fração aderente, MSC, foi capaz de se diferenciar em adipócitos e osteócitos. Ensaios de CFU-F mostraram que as MSC provenientes dos pacientes foram capazes de gerar CFU-F, de forma idade-dependente, porém esta capacidade mostrou-se diminuída quando comparada a de doadores saudáveis. As MSC tanto dos pacientes quanto de doadores saudáveis foi positiva para vimentina e negativa para SSEA-4 e TRA1-60. O isolamento de CMMO mostrou ser seguro e exequível. Apesar de não observarmos diferenças percentuais entre os tipos celulares encontrados nas CMMO dos pacientes em relação à de doadores saudáveis, seu potencial de formação de colônias encontra-se prejudicado. Nossos dados sugerem que para futuros ensaios clínicos, a utilização de CMMO ou de MSC de doadores sadios possa ser mais indicada para terapia celular em pacientes acometidos pelas enfermidades estudadas.

Palavras-chave: células mononucleares de medula óssea, célula-tronco mesenquimal, terapia celular.

ABSTRACT

KASAI-BRUNSWICK, Tais Hanae. **Caracterização morfofuncional das células de medula óssea de pacientes submetidos à terapia celular.** Rio de Janeiro, 2009. Disertação (Mestrado em Ciências Biológicas – Fisiologia) - Laboratório de Cardiologia Celular Molecular, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.

Chronic diseases account for 60% of deaths in the world. They are long duration and slowly progressing diseases and, in most cases, there are no efficient treatments, except, in some cases, organ transplants. Therefore, the development of therapeutic alternatives is paramount and starting in 1990 the use of bone marrow-derived mononuclear cells (BMMC) appears as an alternative for the treatment of chronic diseases. However, the bone marrow appears to be affected by chronic diseases. This study aimed to isolate and characterize BMMCs, and cultivate mesenchymal stem cells (MSC) from patients with a diagnosis of liver cirrhosis, ischemic stroke or Chagas disease, comparing them with those from healthy donors. All surgical procedures were performed in the Clementino Fraga Filho University Hospital, Rio de Janeiro, Brazil. Bone marrow (approximately 120ml) was punctured from the patients' iliac crest, and then submitted to centrifugation through a 1.077 g/ml Ficoll gradient (Histopaque®, Amersham Biosciences.) in order to isolate the BMMC. The gathered BMMC were separated for autologous transplant (at least 1.0×10^8 cells/patients), immunophenotypical characterization by flow cytometry (1.0×10^7 cells) (FACSCanto, BD Bioscience) and *in vitro* culture of MSC, which constitute the adherent portion of the BMMC (8.0×10^5 cells/cm²). In the *in vitro* cell culture we evaluated the fibroblast colony-forming unit potential (CFU-f), osteogenic and adipogenic potential, as well as the expression of the proteins vimentin, SSEA-4 and TRA1-60 by immunofluorescence. In the BMMC fraction, T, B lymphocytes, natural killers cells (NK), monocytes, neutrophils, erythroblasts, MSCs and hematopoietic stem cells (HSC) were identified. There were no statistical difference between the percentage of these cells obtained from patients and healthy donors. The BMMC were plated and the adherent fraction, the MSCs, were able to differentiate into adipocytes and osteocytes, after *in vitro* induction. The CFU-F assays show that the MSC from the patients are capable of generating CFU-F, and that this potential is age-dependent. However, patients' CFU-F potential was reduced when compared to healthy donors' cells. *In vitro* expanded MSCs expressed vimentin, but were negative for SSEA-4 and TRA1-60. BMMC isolation has proven to be a safe procedure. Although no differences were inferred between the cell types found in patients' BMMC and those from healthy donors, their CFU-F potential is compromised. It is suggested that, for future clinical trials, the use of BMMC or MSC from healthy donors is preferable for cell therapy in patients with HVC cirrhosis, ischemic stroke or Chagas disease.

Keywords: bone marrow-derived mononuclear cells, mesenchymal stem cell, cell therapy.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ciclo da doença de Chagas.....	6
Figura 2: A divisão de células-tronco	11
Figura 3: Células-tronco de medula óssea.....	17
Figura 4- Tipos celulares utilizados em ensaios clínicos.....	20
Figura 5: Etapas do aspirado e isolamento de CMMO.....	29
Figura 6: Visão anterior das artérias coronárias.....	31
Figura 7: Circulação hepática.....	32
Figura 8: Circulação das artérias cerebrais.....	32
Figura 9: Eficiência de isolamento de CMMO ^h por Ficoll-Plus em pacientes.....	42
Figura 10. Número de CMMO obtidas do isolamento por Ficol-PLUS em pacientes.....	42
Figura 11: Histogramas representativos das células obtidas após o processamento com Ficoll-Plus.....	44
Figura 12: Quantificação dos tipos celulares presentes após o enriquecimento de CMMO por Ficoll-Plus.....	47
Figura 13 : A.Fração enriquecida em CMMO em cultura após o processamento com Ficoll-Plus	50
Figura 14: Histogramas representativos das MSC em passagem 3.....	52
Figura 15:Histogramas representativos das MSC em passagem 3.....	53
Figura 16:Quantificação da expressão de proteínas presentes após o cultivo de MSC em passagem 3 provenientes da fração enriquecida em CMMO	54
Figura 17: Foto ilustrativa da indução de diferenciação em MSC in vitro.....	56
Figura 18: Placa corada com Giensa após a indução de formação de CFU-F.....	59
Figura 19: Número de colônias de CFU-F formadas em MSC separadas por doença de origem.....	59
Figura 20: Número de colônias de CFU-F formadas / 2×10^6 CMMO semeadas x Idade do paciente em anos.....	60
Figura 21: Imunofluorescência para SSEA-4.....	62
Figura 22: Imunofluorescência para TRA1-60.....	63
Figura 23: Imunofluorescência para vimentina.....	64
Figura 24:Histogramas de citometria de fluxo representativos da identificação da população de monócitos	86
Figura 25:Histogramas de citometria de fluxo representativos da identificação da população de natural killer	88
Figura 26:Histogramas de citometria de fluxo representativos da identificação da população de linfócitos T e suas sub-populações.....	90
Figura 27:Histogramas de citometria de fluxo representativos da identificação da população de linfócitos B	92
Figura 28:Histogramas de citometria de fluxo representativos da identificação da população de neutrófilos	94
Figura 29:Histogramas de citometria de fluxo representativos da identificação da população de HSC.....	96
Figura 30: Histogramas de citometria de fluxo representativos da identificação da população de MSC.....	98

Figura 31: Histogramas de citometria de fluxo representativos da identificação da população de eritroblastos.....100

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Resumo de dados dos pacientes do estudo.....	26
Tabela 2 Painel de anticorpos utilizados para o estudo da fração CMMO	34
Tabela 3 Painel de anticorpos utilizados para o estudo de MSC em cultura.	34
Tabela 4: Perfil imunofenotípico de cada população celular estudada.....	46
Tabela 5: Quantificação dos tipos celulares presentes após o enriquecimento de CMMO por Ficoll-Plus	48
Tabela 6: Perfil imunofenotípico das MSC em cultura.....	51

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACM	Artéria Cerebral Média
AIH	Autorizações de internação hospitalar
ANOVA	Análise de variância
APC.	Alofococianina (do inglês <i>Allophycocyanin</i>)
AVC	Acidente Vascular Cerebral
BSA	Albumina bovina (do inglês <i>Bovine Serum Albumine</i>)
CD	Grupo de diferenciação (do inglês <i>Cluster of differentiation</i>)
CEMO	Células estromais de medula ósea
CFU-F	Unidades formadoras de colônias de fibroblastos (<i>colony-forming unit-fibroblast</i>)
CMMO.	Células mononucleares de medula óssea
CO ₂	Dióxido de carbono
CONEP	Comissão Nacional de Ética em Pesquisa
DAPI	4'-6-Diamidino-2-fenilindole (do inglês <i>4'-6-Diamidino-2-phenylindole</i>)
DMEM	Dubelco's Modified Eagle Medium
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético (do inglês <i>ethylenediamine tetraacetic acid</i>)
ES	Células-tronco embrionárias (do inglês <i>Embryonic stem cells</i>)
FITC	Isocianato de fluoresceína (do inglês <i>Fluorescein isothiocyanate</i>)
FSC	Dispersão frontal (do inglês <i>forward scatter</i>)
HEPES	Ácido N-2-hidroxiethylpiperazina N'-2'etanossulfônico
HSC	Células-tronco hematopoiéticas (do inglês <i>hematopoietic stem cells</i>)
HUCFF	Hospital Universitário Clementino Fraga Filho
IBCCF	Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IC	Insuficiência cardíaca
IgG	Imunoglobulina G
MSC	Células-tronco mesenquimais (do inglês <i>Mesenchymal stem cells</i>)
NaHCO ₃	Bicarbonato de sódio
NIH	<i>National Institute of Health</i>
NK	Células assassinas naturais (do inglês <i>Natural Killer cells</i>)
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	Tampão salinatamponado com fosfato (do inglês <i>Phosphate Buffered Saline</i>)
PE	Ficoeritrina (do inglês <i>Phycoerytrin</i>)
PE-Cy5	Ficoeritrina ciano 5 (do inglês <i>Phycoerytrin cyano 5</i>)
PE-Cy7	Ficoeritrina ciano 7 (do inglês <i>Phycoerytrin cyano 7</i>)
SFB	Soro Fetal Bovino
SITC	Sociedade Internacional de Terapia Celular
SSC	Dispersão lateral (do inglês <i>Side scatter</i>)
SSEA-4	Antígeno embrionário estágio específico 4 (do inglês <i>Stage-specific embryonic antigen 4</i>)
SUS	Sistema Único de Saúde
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TRA1-60	Antígeno de carcinoma embrionário humano (<i>Human embryonal carcinoma marker antigen</i>)

VHB	Vírus da hepatite B
VHC	Vírus da Hepatite C

Sumário

1	Introdução	1
1.1	Doença de Chagas	5
1.2	Cirrose Hepática	8
1.3	Acidente Vascular Cerebral.....	9
1.4	Perspectivas terapêuticas	10
1.5	Célula-tronco.....	10
1.5.1	Plasticidade.....	12
1.5.2	Origem.....	13
1.6	Terapia celular.....	19
2	Objetivos.....	24
3	Material e Métodos.....	25
3.1	Pacientes e infusão de CMMO:	25
3.2	Isolamento de Células Mononucleares da Medula Óssea (CMMO):.....	27
3.3	Caracterização por Citometria de Fluxo:	33
3.2.1	Caracterização após o isolamento de CMMO (a fresco):.....	33
3.2.2	Caracterização das células em cultura MSC (passagem3):	35
3.4	Cultura de Unidades Formadoras de Colônias de Fibroblastos (CFU-F):.....	36
3.5	Cultivo de Células Estromais Mesenquimais de Medula Óssea (CEMO):	36
3.6	Diferenciação:	37
3.7	Imunofluorescência:	38
3.8	Análises Estatísticas	40
4	Resultados	41
4.1	Isolamento de Células Mononucleares da Medula Óssea (CMMO):.....	41
4.2	Caracterização por Citometria de Fluxo (a fresco):	43
4.3	Cultivo de Células Estromais Mesenquimais de Medula Óssea (CEMO):	49
4.4	Imunofenotipagem das MSC pós-cultivo:.....	51
4.5	Diferenciação:	55
4.6	Cultura de Unidades Formadoras de Colônias de Fibroblastos (CFU-F):.....	57
4.7	Imunofluorescência:	61
5	Discussão	65
6	Conclusão	75

Refências Bibliográficas.....	76
Anexo I- Principais características das Moléculas CD	82
Anexo II- Análise celular multiparamétrica por citometria de fluxo	85

1 Introdução

As doenças crônicas representam um problema de impacto mundial. Definidas pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como permanentes, causadoras de incapacidade e/ ou deficiências residuais, são causadas por alterações patológicas irreversíveis que exigem uma reabilitação especial do doente ou longos períodos de supervisão, observação e cuidados (WHO, 2005).

São doenças que atingem homens e mulheres em iguais proporções e cerca de metade dos casos acomete indivíduos com mais de 70 anos de idade. Assim, representam a principal causa de morte e incapacidade do mundo abrangendo cerca de 60% dos óbitos mundiais (PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION, 2007).

O aumento do número de pacientes crônicos pode ser, em parte, atribuído a melhora nas condições de vida da população e aos avanços tecnológicos e científicos na área de saúde. Estes proporcionaram uma maior longevidade à população. Tal fato pode ser observado analisando pesquisas do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) sobre a população brasileira que possui 80 anos de idade ou mais, abrangendo dados de 1980 e fazendo projeções até o ano de 2050. Enquanto em 1980 havia aproximadamente um milhão de idosos nesta faixa etária, em 2005 esta população já ultrapassava dois milhões e projeções para o ano de 2050 revelam 14 milhões de idosos com 80 anos de idade ou mais (IBGE, 2000). O aumento da expectativa de vida altera o perfil de morbidade da população.

Uma maior longevidade traz consigo determinada fragilidade. A população idosa é a mais atingida por doenças crônicas. Isto ocorre porque doenças que antes eram fatais, hoje, devido aos avanços terapêuticos, evoluem para doenças crônicas

proporcionando ao indivíduo uma maior sobrevivência e conseqüentemente aumentando o número de pacientes crônicos.

Por outro lado, as mudanças no padrão comportamental da população, devido aos processos de urbanização, industrialização, desenvolvimento econômico e globalização alimentar também são responsáveis pelo aumento do número de pacientes portadores de doenças crônicas. A implantação de um estilo de vida sedentário, dieta desequilibrada e consumo de tabaco são fatores de risco que os pacientes acometidos por esse grupo de doenças têm em comum.

De acordo com a OMS, um bilhão de adultos estão acima do peso (este quadro poderá superar 1,5 bilhão em 2015), 22 milhões de crianças abaixo de cinco anos de idade são obesas e o tabaco causa pelo menos 5 milhões de mortes por ano (WHO, 2005).

Uma análise dos números já gerados por tais enfermidades torna esta constatação ainda mais preocupante. No ano de 2005, mais de 35 milhões de pessoas morreram por doenças crônicas (WHO, 2005). Deste total de óbitos, 80% ocorreu em países pobres e em desenvolvimento, nestes, as mudanças no estilo de vida estão ocorrendo mais rapidamente do que o ocorrido em países desenvolvidos.

No Brasil este panorama não é diferente. Segundo relatório global de doenças crônicas da OMS intitulado “Prevenindo Doenças Crônicas: um investimento vital”, realizado em 2005, mais de 60% de todas as mortes no país são relacionadas a doenças crônicas. Este relatório evidencia ainda o quanto dispendiosas as doenças crônicas são para o país:

- Estima-se que o Brasil perdeu 3 bilhões de dólares de toda a sua produção nacional devido a mortes prematuras por doenças do coração, acidente

vascular cerebral e diabetes em 2004. Para o período de 2004 a 2014 a perda prevista é de 49 bilhões de dólares;

- Estima-se que se houver uma redução de 2% a cada ano na taxa de mortes por doenças crônicas no referido período, o resultado será um ganho de 4 bilhões de dólares para o país (WHO, 2005).

As doenças cardiovasculares, por representarem a principal causa de morbidade e mortalidade em países desenvolvidos, destacam-se entre as inúmeras doenças crônicas conhecidas. Este grupo de doenças é por essência heterogêneo, agrupando enfermidades de caráter agudo e crônico. Entre as infecções agudas, as mais importantes em termos de tamanho da população afetada são de origem isquêmica. Já entre as formas crônicas, as cardiomiopatias isquêmicas e dilatadas são as mais prevalentes (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009). Independente do caráter agudo ou crônico, as cardiopatias podem acarretar seqüelas incapacitantes e de alto custo social.

Na América Latina, o problema é ainda agravado por ser uma região endêmica para doença de Chagas, com cerca de 18 milhões de pessoas portadoras da doença, distribuída por 18 países americanos. Dos infectados, cerca de 20 000 morrem a cada ano. Aproximadamente 30% dos pacientes chagásicos evoluem para doença cardiovascular (DIAS et al, 2002).

As doenças hepáticas também apresentam estatísticas preocupantes. A lesão hepática crônica é uma enfermidade que acomete uma grande parcela da população mundial. Segundo dados da OMS, mais de 2 bilhões de pessoas estão infectadas pelo vírus da hepatite B (VHB), sendo que aproximadamente 15% dos pacientes acometidos poderão desenvolver hepatite crônica ou cirrose hepática. A infecção pelo vírus da hepatite C (VHC) é bem menos freqüente (100 milhões de

peças infectadas), entretanto, ela é responsável por 60% dos casos de hepatites crônicas. Os indivíduos infectados pelo vírus da hepatite C (VHC) desenvolvem cirrose na maioria dos casos.

No panorama brasileiro, de acordo com os dados do Sistema Único de Saúde (SUS) referentes ao período de janeiro de 2008 a abril de 2009, houve 897 óbitos em 17.207 internações devido a doenças hepáticas virais. Além disso, os gastos com o pagamento de autorizações de internação hospitalar (AIH) para as doenças hepáticas virais custaram ao SUS aproximadamente 6 milhões de reais neste mesmo período (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009).

Outra importante doença crônica, o acidente vascular cerebral (AVC), é uma das principais causas de morte no mundo e é causa freqüente de morbidade entre as doenças neurológicas no Brasil (ANDRE, 2006).

Os dados expostos evidenciam a relevância destas doenças que se mostram extremamente dispendiosas para as nações e de significativa importância nos quadros de morbi-mortalidade mundiais.

Assim, a evolução clínica de cada uma das doenças crônicas destacadas acima (doença de Chagas, cirrose hepática e AVC) será enfocada com mais detalhes a fim de conhecendo-nas melhor, novas alternativas terapêuticas, que amenizem este grande problema de saúde pública mundial, possam ser traçadas.

1.1 Doença de Chagas

A Doença de Chagas, também chamada Tripanossomíase Americana, é a infecção causada pelo protista cinetoplástida flagelado *Trypanosoma cruzi*, e transmitida por insetos, conhecidos no Brasil como barbeiros (da família dos Reduviídeos (Reduviidae), pertencentes aos gêneros *Triatoma*, *Rhodnius* e *Panstrongylus* (BRENER et al, 2000).

A infecção ocorre quando o homem, durante a hematofagia, é picado. Neste momento o barbeiro elimina os tripomastigotas metacíclicos em suas fezes. Essas são as formas infectantes que podem penetrar pelas mucosas, quando o homem leva as mãos contaminadas aos olhos ou nariz, ou por soluções de continuidade, como as provocadas pelo ato de coçar ou pelo orifício da picada do barbeiro. Logo após a penetração, o tripomastigota metacíclico invade células do sistema fagocítico mononuclear (célula alvo) e perde o flagelo, passando a se chamar amastigota. Nesse estágio os amastigotas multiplicam-se por divisão binária em ciclos de aproximadamente doze (12) horas, até que a célula infectada fique repleta de amastigotas. Estas amastigotas se transformam em tripomastigotas (BRENER et al, 2000).

Em seguida, a célula infectada se rompe e novos protozoários são lançados na circulação para infectar uma nova célula alvo (Figura 1).

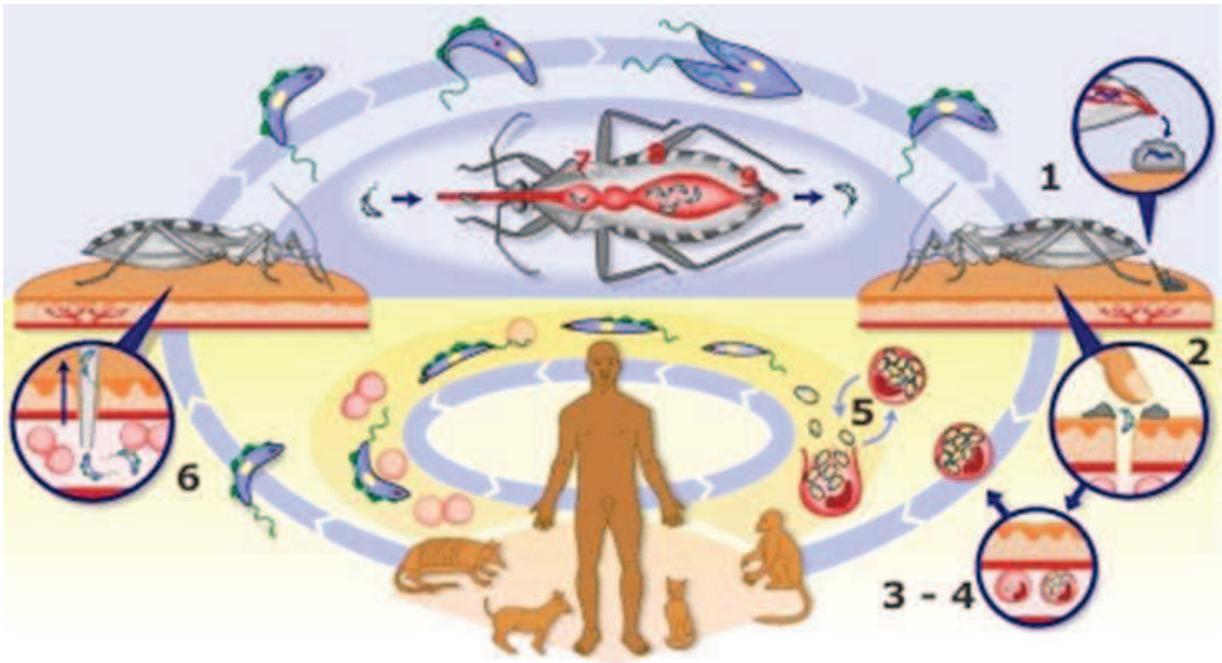


Figura 1: Ciclo da doença de Chagas. (1) O inseto pica e defeca ao mesmo tempo, depositando tripomastigotas na pele do indivíduo. (2) O homem, ao coçar, carrega o parasita para o local da lesão. (3-4) Os tripomastigotas invadem as células onde se transformam em amastigotas. (5) Os amastigotas multiplicam-se no interior das células, transformam-se novamente em tripomastigotas, rompendo a célula. São liberados na circulação sanguínea invadindo novas células e tecidos. (6) Uma vez na circulação, tripomastigotas sanguíneos são absorvidos por novo vetor em nova picada. No barbeiro os tripomastigotas transformam-se em epimastigotas no intestino, multiplicam-se e voltam à forma infectante tripomastigota (*Adaptado OMS, 2005*).

Do ponto de vista clínico a doença de Chagas se caracteriza por apresentar duas fases: aguda e crônica.

Fase Aguda

À medida que o ciclo de invasão e ruptura se repete, o histiotropismo se desloca do sistema fagocítico mononuclear para células musculares lisas e cardíacas e para o sistema nervoso (TEIXEIRA et al, 1975, 1978). Essa fase de intensa multiplicação e invasão de células com elevada parasitemia caracteriza a fase aguda da Doença de Chagas.

No sítio de infecção há intensa reação inflamatória antes de uma disseminação do protozoário. Esta área de inflamação aguda local pode produzir

uma reação intensa denominada Chagoma. A partir daí, a disseminação produz áreas de inflamação multifocais em diversos órgãos, com predomínio da infecção no coração e sistema nervoso, seguido da miosite focal e comprometimento dos plexos nervosos intestinais, nos casos mais graves.

Ao mesmo tempo em que a infecção abrange mais tecidos e a parasitemia aumenta, a resposta imune começa a ser montada com a produção de anticorpos e intensa reatividade celular no sítio inicial de inoculação. Caso essa resposta se torne mais intensa, o número de parasitos circulantes cai progressivamente até que sejam raramente encontrados na circulação, caracterizando o fim da fase aguda da doença.

A morte em pacientes com doença de Chagas aguda (possivelmente um caso em 1000 infectados) é normalmente associada à falência cardíaca e/ou meningite e encefalite (WHO, 2002).

Fase crônica

A fase crônica pode ocorrer de forma sintomática ou assintomática.

Fase assintomática

Esta fase é definida por apresentar:

- ausência de sinais e/ou sintomas;
- reações sorológicas e/ ou parasitológicas positivas;
- ausência de anormalidades no eletrocardiograma;
- tamanho normal do coração, esôfago e cólon avaliados por raios-x.

Geralmente a identificação da doença ocorre em testes de admissão para trabalhos ou doação de sangue. Esta fase pode durar de dez a vinte anos (TEIXEIRA & NASCIMENTO et al. 2006).

Fase sintomática

Após período de intensa reprodução do parasita (fase assintomática), danos irreversíveis já foram causados em órgãos como o coração e sistema nervoso. Gradualmente sinais como demência (3% dos casos iniciais), dilatação do trato digestivo - megaesôfago ou megacólon(6%), devido à destruição da inervação e das células musculares destes órgãos ou cardiomiopatia (em 30% dos casos) vão surgindo (TEIXEIRA & NASCIMENTO et al. 2006). A cardiomiopatia associada à infecção crônica causada por doença de Chagas é a mais letal infecção endêmica do ocidente (CUBILLOS-GARZON et al, 2004).

Em pacientes chagásicos, o tratamento etiológico específico, após a instalação da síndrome de insuficiência cardíaca, nunca teve sua eficácia comprovada. O tratamento desses pacientes, portanto, em nada difere de outras etiologias (MESQUITA et al, 2002) e o único tratamento realmente eficaz em pacientes chagásicos crônicos com a cardiomiopatia já instalada é o transplante cardíaco.

1.2 Cirrose Hepática

A cirrose hepática é uma doença causada por agentes etiológicos distintos como agressões metabólicas, auto-imunes, pós-necróticas, virais e tóxicas, dentre as quais destacamos a cirrose causada pelo vírus da hepatite C.

A doença é consequência de um processo lesivo crônico ao fígado, que causa um desequilíbrio entre a síntese e a degradação do colágeno. Trata-se de um estágio avançado de evolução da fibrose, em que ocorre deposição de tecido cicatricial, redução da fenestração dos sinusóides e distorção da arquitetura do tecido, culminado em perda de função dos hepatócitos e aumento da resistência vascular do fígado (hipertensão portal) (FRIEDMAN et al, 2005).

Assim, apesar da alta capacidade de regeneração hepática mediante injúria, este processo lesivo ocasiona uma irreversível perda da função do órgão levando ao desenvolvimento de quadros fibróticos, cirróticos, culminando em insuficiência hepática. Ao atingir esse estágio da doença, a única alternativa terapêutica é o transplante de órgãos, cuja viabilidade depende de uma política sistemática e eficiente de captação de órgãos no país (ROJKIND et al, 2001).

1.3 Acidente Vascular Cerebral

O comprometimento súbito da função cerebral causado por inúmeras alterações histopatológicas que envolvem um ou vários vasos sanguíneos intracranianos ou extracranianos é denominado acidente vascular cerebral (AVC).

Aproximadamente 80% dos AVCs são causados por um baixo fluxo sanguíneo cerebral (isquemia) e outros 20% por hemorragias tanto intraparenquimatosas como subaracnoídeas (ANDRE, 2006).

Na isquemia cerebral, uma série de eventos complexos é desencadeada em seqüências temporais e espaciais bem definidas que resultam em dano cerebral. Como o tecido cerebral tem uma grande demanda por oxigênio e glicose, a interrupção do fluxo cerebral resulta em depleção de substrato em minutos e no acúmulo de metabólitos tóxicos. A citotoxicidade inicial resulta em necrose na área central do infarto, enquanto o dano tecidual que ocorre na área adjacente, denominada zona de penumbra, ocorre em geral por apoptose e tem um curso temporal mais prolongado. A cascata de eventos de sinalização desencadeada pela isquemia e que atua no cérebro e outros tecidos, como por exemplo, o sistema imune, vai determinar o grau de perda celular e de seqüelas neurológicas resultantes da isquemia.

Cerca de 40 a 50% dos indivíduos que sofrem um AVC morrem ao longo dos seis primeiros meses que se seguem. Um dado preocupante em relação aos AVCs não abrange somente a alta mortalidade causada, mas também a incapacitação imposta ao indivíduo. A maioria dos sobreviventes exibirá deficiências neurológicas e incapacidades residuais significativas, o que faz do AVC a primeira causa de incapacitação funcional do mundo ocidental. É uma doença, sobretudo, de grande impacto social.

1.4 Perspectivas terapêuticas

Apesar dos grandes avanços obtidos na área de saúde ainda não há tratamento para a doença de Chagas, cirrose hepática e AVC. Frente ao ônus incapacitante, financeiro e social que tais doenças acarretam, não cessam as buscas por novas e eficazes alternativas terapêuticas.

Neste cenário, as terapias celulares através do uso clínico de células-tronco adultas derivadas de medula óssea surgem como uma promissora alternativa terapêutica.

Para que o enorme potencial terapêutico destas células seja explorado faz-se necessário compreender o que são, quais são os tipos e quais são as características fundamentais das células-tronco.

1.5 Célula-tronco

Todo organismo pluricelular é composto por diferentes tipos de células. Entre as cerca de 75 trilhões de células existentes em um homem adulto, por exemplo, são encontrados em torno de 200 tipos celulares distintos. Todos eles derivam de células precursoras, denominadas 'células-tronco' (JOHNSON et al, 2004).

O fascínio por estas células foi despertado pelo alemão Theodor Schwann (1810-1882) através do lançamento, em 1839, das bases da teoria celular. A partir

de então, o aprofundamento nos estudos sobre células-tronco as definiu como células que apresentam as seguintes características básicas:

1. São células indiferenciadas (isto é, não estão no fim das vias de diferenciação celular);
2. Podem se dividir ilimitadamente (ou pelo menos durante toda a vida de um animal);
3. Quando se dividem, cada “célula filha” formada pode manter-se indiferenciada ou pode se tornar uma célula funcional especializada. Para realizar essa dupla tarefa (replicação e diferenciação), a célula-tronco pode seguir dois modelos básicos de divisão: o determinístico, no qual sua divisão gera sempre uma nova célula-tronco e uma indiferenciada e o estocástico (ou aleatório), no qual células-tronco geram somente novas células-tronco ou geram apenas células diferenciadas ou ainda uma células-tronco e uma célula diferenciada, conforme exemplificado na Figura 2 (JOHNSON et al, 2004).

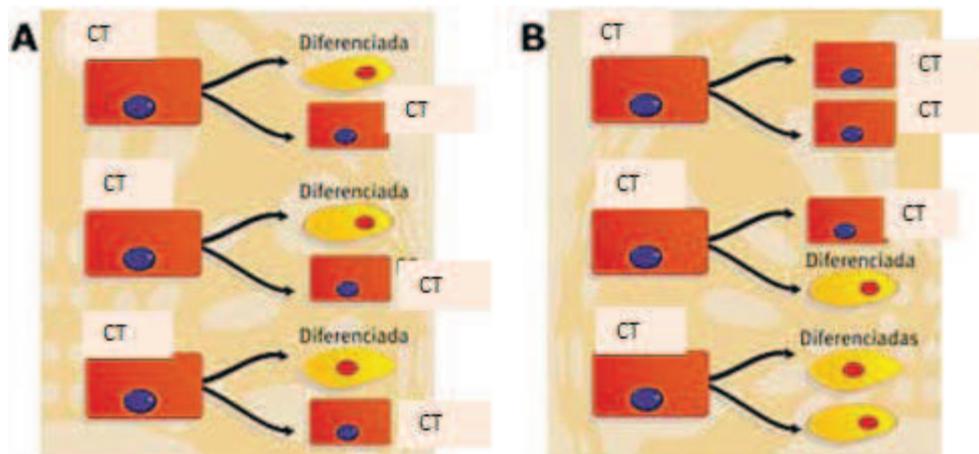


Figura 2: A divisão de células-tronco segue dois modelos: o determinístico (A), que gera sempre uma célula-tronco e uma célula diferenciada, e o aleatório (B) em que podem ser geradas diversas combinações de células. CT: célula-tronco. Adaptado de <http://www.educacaopublica.rj.gov.br>

As células-tronco podem ser classificadas quanto à sua plasticidade e origem.

1.5.1 Plasticidade

- Totipotentes: são as células-tronco que podem formar todos os tecidos incluindo os anexos embrionários. Elas constituem o primeiro grupo de até 32 células, e se formam nas primeiras 72 horas após a fecundação do óvulo. Neste momento, não é possível identificar neste grupo celular qualquer diferenciação de tecido específico. A formação da placenta e de seus anexos somente ocorre quando estas células totipotentes são implantadas no útero. Como exemplo de uma célula-tronco totipotente temos o zigoto.
- Pluripotentes: são células-tronco que têm potencial de se diferenciar em qualquer uma das três camadas germinativas:
 1. endoderma (que origina, como exemplo, o trato gastrointestinal e os pulmões);
 2. mesoderma (que origina, como exemplo, os músculos, ossos, sangue e sistema urogenital);
 3. ectoderma (que origina, como exemplo, os tecidos epidermais e sistema nervoso).

Células-tronco pluripotentes podem se especializar em qualquer tecido do organismo, mas elas não podem por si próprias se desenvolver em um ser adulto, uma vez que não possuem a capacidade de gerar tecido extra-embrionário. Um exemplo de células-tronco pluripotentes são as células-tronco embrionárias (JOHNSON et al, 2004).

- Multipotentes: possuem sua capacidade de diferenciação limitada, diferenciando apenas em linhagens relacionadas ao seu tecido de origem.

Elas estão distribuídas pelo organismo em nichos e acredita-se que tenha importância nos mecanismos de reparo do tecido onde estão alocadas (JOHNSON et al, 2004). Suas principais funções são manter a homeostase do tecido e substituir, seguindo os limites de regeneração de cada tecido, as células especializadas mortas por envelhecimento, lesão ou doença (LEBLOND et al, 1964). As células-tronco adultas são células multipotentes, podemos citar como exemplos as células-tronco de gordura, neurais e cardíacas.

1.5.2 Origem

Células-tronco embrionárias

Células derivadas da massa interna de blastocistos de mamíferos, que podem proliferar-se indefinidamente preservando sua pluripotência, e que mantêm esta característica *in vitro* são denominadas células-tronco embrionárias - do inglês *embryonic stem cells* (ES) (JOHNSON et al, 2004).

A descoberta das células-tronco embrionárias em 1981 (EVANS & KAUFMAN, 1981; MARTIN et al, 1981) seguida da imortalização das ES humanas em 1998 (THOMSON et al, 1998) trouxeram novas perspectivas para ciência aproximando da realidade o sonho da bioengenharia tecidual e ampliando as possibilidades para a utilização de células-tronco em terapia celular. Porém, limites tecnológicos ainda necessitam ser transpassados para aplicação clínica deste tipo celular.

Um destes limites é a restrição da proliferação das células-tronco embrionárias. Apesar dos inúmeros esforços de cientistas para controlar seu processo de proliferação, este ainda não é um mecanismo conhecido. Desta forma o

uso clínico das ES oferece riscos uma vez que tais células, reproduzindo-se descontroladamente, podem levar à formação de tumores.

A rejeição imunológica que pode ser desencadeada pelas células diferenciadas originadas a partir das embrionárias (devido a presença do complexo de histocompatibilidade) é outro desafio a ser vencido (ROBERTSON et al, 2001).

Outra limitação encontrada para sua utilização clínica seria a geração de uma população celular pura e homogênea em quantidade suficiente para realização de transplantes. E quando conseguirmos transpassar esta barreira ainda precisaremos elucidar qual seria a melhor maneira de aplicá-las.

Driblando questões tão complexas, células-tronco adultas estão sendo estudadas trazendo consigo perspectivas também muito promissoras.

Células-tronco adultas

Estas são células encontradas em nichos em vários tecidos do organismo adulto. Algumas delas já são utilizadas em ensaios clínicos como por exemplo a células-tronco presentes no cordão umbilical, na medula óssea e em gordura (NIH, 2009).

Sua plasticidade ainda não é um consenso. De 1998 a 2002 alguns estudos causaram impacto mostrando que tais células não seriam multipotentes, mas sim pluripotentes, assim como as embrionárias. Para exemplificar, citamos o polêmico artigo escrito por Bjornson e colaboradores publicado na revista *Science*, intitulado *Turning brain into blood: a hematopoietic fate adopted by adult neural stem cells in vivo*. Este grupo descreve em seu estudo que após realizar ablação de medula óssea em ratos e transplantá-los com células-tronco neurais, estas puderam recuperar a medula depletada, produzindo células sanguíneas.(BJORNSON et al, 1999). Este pensamento foi aceito até 2002, quando novos estudos surgiram

comprovando que estas células são multipotentes. Esta nova corrente de pensamento, aceita pela maior parte da comunidade científica, pode ser exemplificada pelo estudo realizado por Wagers e colaboradores, também publicado na revista *Science*, em 2002, intitulado *Little evidence for developmental plasticity of adult hematopoietic stem cells* (WAGERS et al, 2002). Neste estudo o grupo de Wagers demonstra de maneira elegante que as células-tronco hematopoiéticas são capazes de regenerar a medula de um animal submetido a ablação de medula porém são incapazes de se transdiferenciar em outros tipo de tecido como rim, fígado, cérebro e músculo.

Assim, as células-tronco adultas são hoje consideradas células multipotentes que possuem diferenciação restrita ou dirigida e uma menor capacidade de proliferação, quando comparadas às embrionárias, o que torna remota a possibilidade de formação de tumores quando infundidas em pacientes. Aliado a isto, a possibilidade de utilização de células-tronco adultas de origem autóloga (minimizando problemas como rejeição imunológica) tornam este tipo celular muito promissor para aplicação clínica em medicina regenerativa (ASAHARA et al, 2000).

Explorando tais potencialidades a equipe do Programa de Terapia Celular (PROTECEL) que engloba o Hospital Universitário Clementino Fraga Filho (HUCFF) em colaboração com vários laboratórios do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho (IBCCF) incluindo o Laboratório de Cardiologia Celular e Molecular (do qual este estudo faz parte), desenvolve estudos clínicos fase I (segurança e exequibilidade). Nesse estudo pacientes portadores de AVC, doença de Chagas e cirrose hepática foram transplantados com CMMO. Para que o estudo seja melhor compreendido faz-se necessário caracterizar esta fração de células-tronco adultas presentes na medula óssea.

Células-tronco de medula óssea

A medula óssea é um órgão difuso, mas volumoso e muito ativo. É a fonte de todas as células sanguíneas do organismo. No adulto normal, produz por dia cerca de 2,5 bilhões de eritrócitos, 2,5 bilhões de plaquetas e 1,0 bilhão de granulócitos por quilograma de peso corporal. Esta produção é ajustada com grande precisão às necessidades do organismo (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1999).

A medula óssea é encontrada no canal medular dos ossos longos e nas cavidades dos ossos esponjosos. Como todo tecido hematopoiético, é constituída por células reticulares, associadas a fibras reticulares. Esses elementos formam uma esponja percorrida por inúmeros capilares sinusóides. Entre as células reticulares existe um número variável de células, onde podemos citar como exemplos os macrófagos, células adiposas, células precursoras dos eritrócitos, granulócitos, monócitos, plaquetas e células-tronco indiferenciadas (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1999).

As **células-tronco hematopoiéticas (HSC** – do inglês *hematopoietic stem cell*), são responsáveis pela manutenção da produção de todas as células sanguíneas (SHORT et al, 2003) e foram as primeiras a serem caracterizadas na medula óssea. No ambiente medular também são encontradas **células-tronco mesenquimais (MSC** – do inglês *mesenchymal stem cell*), extremamente raras em condições fisiológicas (constituem 0,001 – 0,01% do total da população célula) são responsáveis pela formação das células do estroma de medula óssea garantindo a homeostasia do ambiente medular para que a hematopoiese ocorra de maneira bem regulada (CHEN et al, 2006). O sistema celular estromal é análogo ao sistema hematopoiético, onde as células-tronco mesenquimais (MSC) residentes na medula são responsáveis por manter um nicho das MSC, por auto-renovação, além de dar

origem as células das várias linhagens que compõem o estroma medular (DEANS & MOSELEY, 2000) (Figura 3).

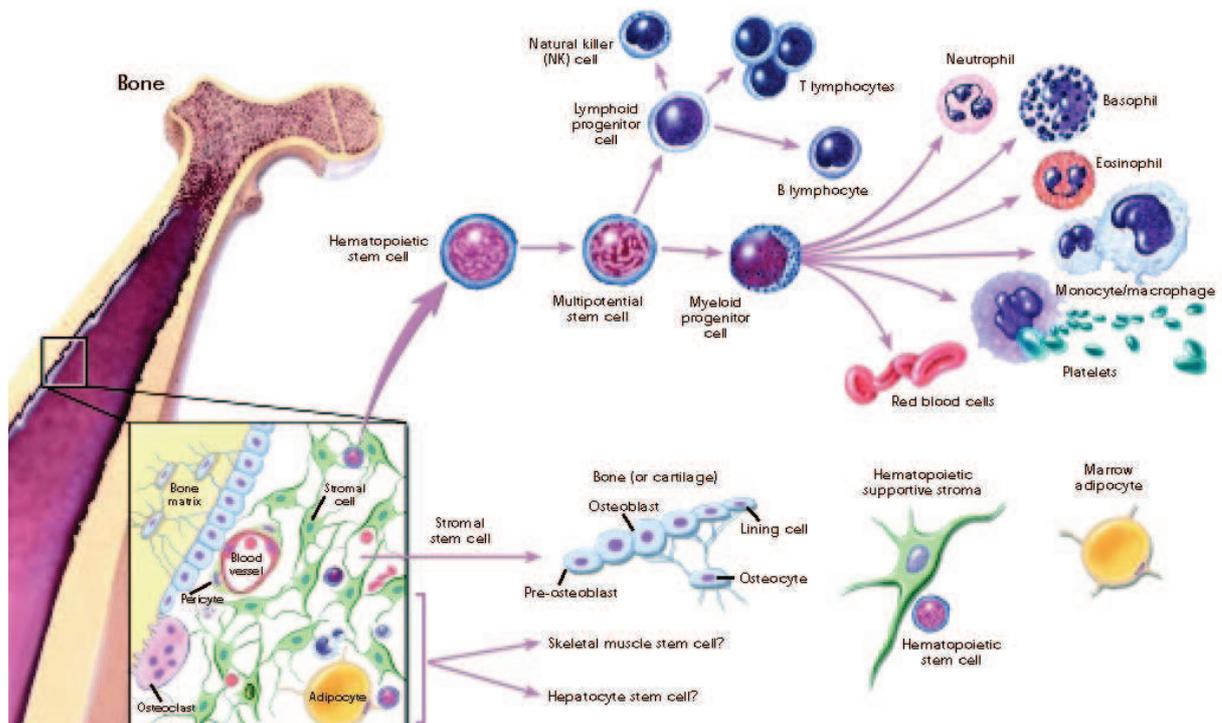


Figura 3: Células-tronco de medula óssea. As HSCs se diferenciam nos precursores linfóides e mielóides, que por sua vez, dão origem a todas as células sanguíneas do organismo. As MSCs podem dar origem a células de osso, cartilagem, tendão e de estroma. (Adaptado de NIH 2001)

- **Células-tronco mesenquimais de medula óssea (MSC)**

Friedenstein *et al.* foram os primeiros a relatar a existência de uma população de células-tronco no estroma de medula óssea. O grupo observou que eram células aderentes ao frasco de cultura de formato fibroblastóide (FRIEDENSTEIN *et al.*, 1976). Desde então, muitos estudos demonstraram que as células-tronco aderentes do estroma de medula óssea ou células-tronco mesenquimais (MSC) são capazes

de gerar várias linhagens celulares incluindo osteócitos, condrócitos e adipócitos (PITTENGER et al, 1999).

Para uniformizar os achados científicos relacionados às células estromais aderentes derivadas de medula óssea, a Sociedade Internacional de Terapia Celular (SITC) publicou um artigo (DOMINICI et al, 2006), onde sugere que tais células podem ser classificadas como MSC (células-tronco mesenquimais) quando atenderem aos três critérios listados abaixo:

1. Aderência às placas de cultura *in vitro*, quando cultivadas em condições adequadas;
2. Expressão de antígenos específicos em sua superfície, apresentando expressão de CD105, CD73 e CD90 mensurados por citometria de fluxo e ausência de expressão de CD45, CD34, CD14 ou CD11b, CD79a ou CD19 e HLA de classe II (menor ou igual a 2%). Ver Anexo I.
3. Diferenciação *in vitro* em osteoblasto, adipócito e condroblasto.

Outro aspecto ainda não totalmente consolidado na literatura torna sua aplicação clínica ainda mais interessante: a capacidade de modular a resposta imune. Estudos demonstram que *ex vivo* MSCs suprimem o funcionamento de uma larga população de células imunológicas, incluindo células T (KRAMPERA et al, 2003; LE BLANC et al, 2003; DI NICOLA et al, 2002), células apresentadoras de antígenos, *natural killer* (NK), e células B (JIANG et al, 2005; AGGARWAL et al, 2005). Este achado é particularmente interessante por minimizar a possibilidade de uma rejeição imunológica contra as células injetadas.

Assim, a facilidade de obtenção, a multipotencialidade e uma suposta capacidade de imunossupressão, (que transpassa os problemas de imunorejeição), ampliam a importância de seu estudo em terapias celulares.

1.6 Terapia celular

A terapia celular é uma proposta terapêutica que, por meio de infusão de células, visa agir na regeneração de órgãos e tecidos.

Dentro desse contexto, uma questão importante é a identificação de qual seria a célula-tronco ideal para tal fim. Certamente o ideal seria a utilização de células-tronco existentes no tecido lesado do próprio indivíduo. No entanto, para que isto seja possível, é necessário entender melhor os fatores que controlam a proliferação, migração e diferenciação destas células-tronco adultas e das células por elas geradas antes que se possa propor uma possível abordagem terapêutica usando as mesmas. Há também a dificuldade inerente de obtenção destas células sem provocar lesões significativas nos órgãos de onde seriam retiradas.

Como as células-tronco dos próprios tecidos não são ainda uma alternativa terapêutica viável, uma outra alternativa interessante seria, teoricamente, partir de células-tronco embrionárias, diferenciá-las no tipo celular desejado antes de transplantá-las para o local da lesão. No entanto, ainda serão necessários vários anos para que os estudos pré-clínicos cheguem a resultados que possam ser transmitidos para a prática clínica.

Outra alternativa seria a utilização de células-tronco mesenquimais. Como a população celular de MSC é extremamente rara, é necessário que haja expansão *in vitro* para sua utilização clínica. O procedimento de expansão destas células *in vitro*, livre de produtos de origem animal, foi estabelecido recentemente, (MULLER et al, 2006) e alguns estudos clínicos pioneiros já começaram a utilizar este tipo celular em ensaios clínicos. Porém este domínio tecnológico (cultivo de MSC em condições livres de produtos de origem animal e dentro das boas práticas de manufatura) é recente.

Até este momento, a fração celular mais utilizada em ensaios clínicos para tratamento de doenças crônicas de origem não hematológica corresponde às células mononucleares de medula óssea (CMMO), segundo dados do National Institute of Health (NIH, 2009) (Figura 4).

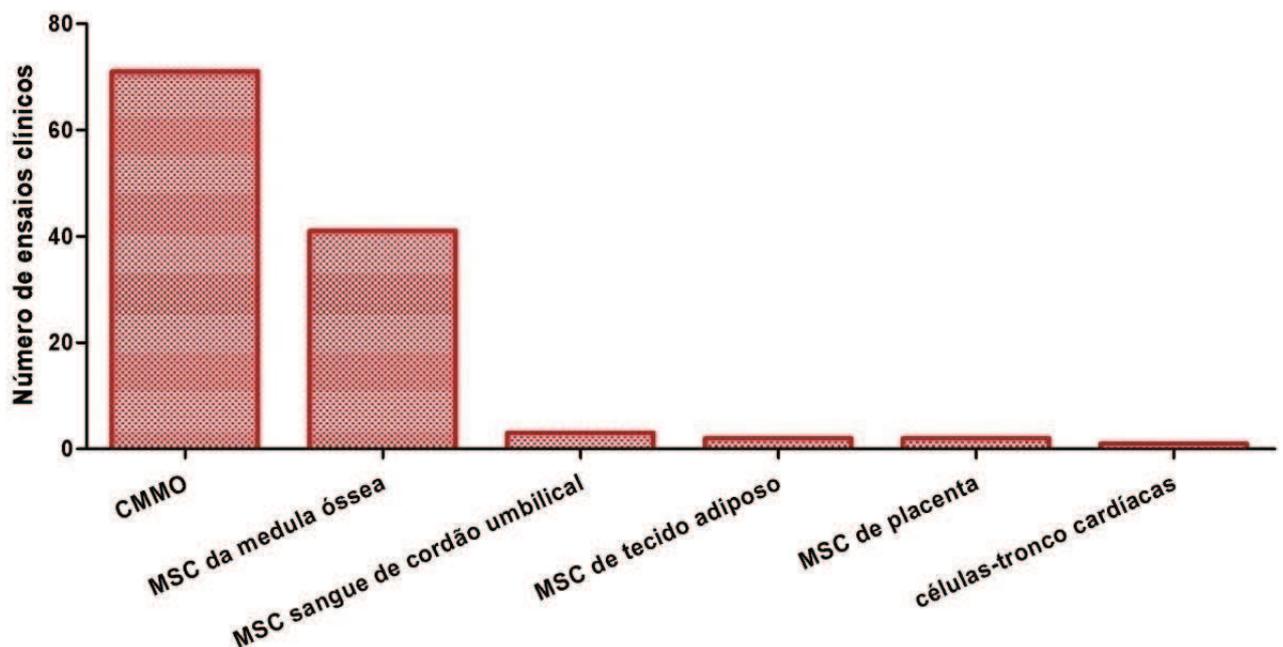


Figura 4- Tipos celulares utilizados em ensaios clínicos. Número de ensaios clínicos registrados no NIH para protocolos de terapia celular para tratamento de doenças não hematopoéticas. CMMO –células mononucleares de medula óssea, MSC- mesenchymal stem cell (NIH,2009)

Um grande facilitador para aplicação clínica desta fração celular é o seu processo de obtenção: é o mesmo utilizado em transplante de medula óssea, é rotineiro na rede hospitalar, relativamente simples de ser executado e não envolve grandes custos.

O mecanismo de ação destas células no reparo tecidual ainda é controverso. Alvarez-Dolado e cols., em 2003, demonstraram que a capacidade de transdiferenciação destas em outros tipos celulares é muito restrita, assim como é restrita a capacidade de fusão das células de medula óssea com as células do tecido

do hospedeiro; seu uso, assim, não teria capacidade de regenerar órgãos lesados (ALVAREZ-DOLADO et al, 2003). Essas observações não excluem porém a possibilidade de um papel terapêutico para CMMO.

Por outro lado, as CMMO apresentam outras características mais fáceis de serem exploradas terapeuticamente a curto e médio prazo. Uma delas é o tropismo que apresentam por áreas de lesão. Outra característica importante é que estas células produzem diversos fatores tróficos. Estes fatores melhoram o funcionamento de tecidos lesados, promovem maior sobrevivência das células que os compõem, diminuem a inflamação e aumentam a vasculogênese (CHOPP & LI, 2002).

Assim, acredita-se que o papel das CMMO em terapias celulares é proteger as células que sobreviveram após a injúria (por ação parácrina), ao invés de substituir as que já morreram, realizando assim um processo de reparo celular em lugar de regeneração celular que se atribuiu inicialmente como mecanismo de ação das células-tronco derivadas de medula óssea.

Diversos estudos foram realizados demonstrando a enorme relevância das CMMO em terapia celular. Estudos envolvendo aplicação de CMMO no tratamento de doenças cardíacas, por exemplo, já estão bem avançados, estes, não só comprovam a segurança e exequibilidade do método como apresentam resultados preliminares bastante animadores (ASSMUS et al, 2002; PERIN et al, 2003; STAMM et al, 2003).

O sucesso apresentado no tratamento de pacientes cardiopatas através do transplante autólogo de CMMO motivou a comunidade científica a explorá-lo também em outras doenças crônicas. Assim, modelos propostos para o estudo em AVC, doença de Chagas e cirrose hepática mostraram-se também promissores.

Um estudo pioneiro envolvendo as instituições Hospital Pró-Cardíaco, Universidade Federal do Rio de Janeiro e Instituto do Milênio de Bioengenharia Tecidual, realizado por Rosália Mendes Otero e colaboradores relata o primeiro caso de transplante autólogo de CMMO via intra-arterial na fase aguda do AVC isquêmico. Um paciente, com lesão isquêmica aguda recente no território da artéria cerebral média (ACM) esquerda, foi submetido à terapia celular. Foram injetados cerca de 30×10^7 CMMO por cateterização da artéria cerebral média esquerda. O estudo de fase I foi desenhado para avaliar a segurança e exequibilidade do procedimento de transplante intra-arterial de CMMO em pacientes na fase aguda do AVC isquêmico. Houve melhoras clínicas pós-terapia, mas como o estudo foi de Fase I, abrangendo somente um paciente, não é possível afirmar se a evolução clínica favorável, está ligada ao transplante de CMMO ou à recuperação neurológica espontânea (MENDONÇA et al, 2006).

Outro estudo brasileiro de grande relevância, realizado por Vilas-Boas e colaboradores, é o do primeiro caso de transplante de CMMO para o miocárdio de um portador de insuficiência cardíaca de etiologia chagásica. Os resultados obtidos demonstraram ser possível realizar a injeção intracoronariana de célula de medula óssea, sugerindo que este procedimento é potencialmente seguro e efetivo em pacientes com insuficiência cardíaca chagásica (VILAS-BOAS et al, 2004).

Continuando os estudos Vilas-Boas e colaboradores analisaram uma amostra de 28 pacientes. O procedimento foi realizado da mesma maneira que o estudo anterior. Não houve complicações relacionadas diretamente ao procedimento. Os dados demonstraram que a injeção intracoronariana de células mononucleares da medula óssea é exequível e sugere ser potencialmente segura e eficaz em pacientes com insuficiência cardíaca (IC) de etiologia chagásica (VILAS-BOAS et al, 2006).

Para doenças hepáticas, um único estudo envolvendo nove pacientes com cirrose hepática foi realizado. Os pacientes receberam $5,2 \pm 0.63 \times 10^9$ CMMO por via periférica e a presença de MSC na amostra foi confirmada por citometria de fluxo. Após a terapia a função hepática foi monitorizada por exames sanguíneos durante 24 semanas. Efeitos adversos não foram encontrados. O grupo concluiu que terapia celular com CMMO deve ser considerada como um novo tratamento para cirrose hepática descompensada (TERAI et al, 2006).

Os estudos clínicos, embora animadores, ainda são muito recentes e muito ainda há para ser desvendado. Mas dada à limitação de eficácia das alternativas farmacológicas vigentes para o tratamento da insuficiência cardíaca (MESQUITA et al, 2002) e da inexistência de alternativas terapêuticas para doenças crônicas (à exceção do transplante de órgãos no caso da cirrose hepática), o uso terapêutico de células mononucleares de medula óssea mostra-se promissor. No presente estudo, pacientes acometidos por doença de Chagas, cirrose hepática e AVC foram tratados por meio de transplante autólogo de CMMO. Esperamos que este estudo contribua no esclarecimento de algumas das dúvidas ainda não elucidadas para tornar rotineiro este promissor procedimento terapêutico.

2 Objetivos

Este estudo tem por objetivo geral estudar as células de medula óssea utilizadas nos transplantes autólogos realizados em pacientes com cirrose hepática, doença de Chagas e AVC comparando-as com as de doadores saudáveis.

Os objetivos específicos são:

- Isolar as CMMO provenientes do aspirado medular para as três enfermidades do estudo;
- Caracterizar por citometria de fluxo o fenótipo da população de células injetadas em cada enfermidade;
- Cultivar as células mesenquimais *in vitro*;
- Caracterizar por citometria de fluxo o fenótipo da população mesenquimal em cultura;
- Avaliar a capacidade de diferenciação das células mesenquimais *in vitro*;
- Avaliar a capacidade de formação de colônias de fibroblastos (CFU-F);
- Avaliar por imunocitoquímica a expressão de proteínas tecido-específicas

3 **Material e Métodos**

3.1 *Pacientes e infusão de CMMO:*

Com o objetivo de isolar CMMO para tratamento experimental por terapia celular, pacientes acometidos por cirrose hepática (n=7), AVC (n=5), doença de Chagas (n=5) e doadores saudáveis (n=3) participaram do estudo.

A inclusão de cada paciente no projeto foi realizada após esclarecimentos sobre os objetivos e procedimentos por parte dos pesquisadores clínicos e a leitura conjunta do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), com posterior assinatura por paciente e pesquisador

Os dados referentes a idade, sexo, bem como número de células infundidas em cada paciente separados por doença estão compilados na Tabela 1.

Tabela 1: Resumo de dados dos pacientes do estudo

Doença	Paciente	Sexo	Idade	N de cels infundidas
Acidente Vascular Cerebral	R.C.R	M	24	5.8×10^8
	C.M	M	66	2.2×10^8
	M.S.R	M	47	3.9×10^8
	M.J.G.	M	58	5.0×10^8
	J.P.M.B.	M	48	1.0×10^8
Cirrose hepática	A.P.S	M	69	2.3×10^8
	C.A.C.S.	M	51	7.48×10^8
	E.C.M.C.	F	49	2.0×10^8
	I.A.R.	M	65	3.5×10^8
	D.C.T.	F	65	3.5×10^8
	J.A.C.C.B	M	59	3.5×10^8
	M.S.T	F	52	2.5×10^8
Doença de Chagas	L.C.S.	F	56	9.6×10^8
	J.F.F.M	M	61	$1,8 \times 10^8$
	G.P.A	M	57	$3,2 \times 10^8$
	W.D.S.	M	64	$2,56 \times 10^8$
	D.A.A	F	60	$1,0 \times 10^8$
Doadores Saudáveis	R.E.W.	F	40	-
	I.C.F.S	M	30	-
	J.R.S.	M	42	-

3.2 Isolamento de Células Mononucleares da Medula Óssea (CMMO):

O protocolo descrito abaixo, aprovado pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP), foi realizado para todos os pacientes deste estudo. Os registros junto a este órgão, para cada doença, seguem abaixo:

- Para AVC, registro nº CNS/9396;
- Para cirrose hepática, registro nº 12573;
- Para cardiomiopatias em doença de Chagas, registro nº 4108;

As amostras de doadores saudáveis foram gentilmente cedidas pela professora Eliane Buschelat do Instituto Nacional do Câncer (INCA) e pelo professor Alex Balduino do Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia (INTO).

- **Protocolo de separação de células mononucleares de medula óssea**

As CMMO foram obtidas por punção de medula óssea da crista ilíaca do paciente- realizada por hematologistas em centro cirúrgico. Este aspirado medular, recolhido em diversas seringas, foi transportado para ambiente estéril, onde foi processado sob campo cirúrgico.

O aspirado medular foi transferido para o becker pertencente ao **kit de filtração de medula óssea** (composto por 2 beckers de 250 mililitros (ml), mesa de sustentação, 2 membranas de filtração, êmbolo) e o volume de medula foi contabilizado.

Foram adicionados 2 ml de heparina sódica e o dobro do volume de medula de salina estéril (NaCl 0,9%), diluição 1:2, ao becker contendo o aspirado medular.

A solução obtida foi filtrada em membrana de filtração, de malha grossa, (60 mesh, 250 μm) com auxílio do êmbolo presente no kit de filtração, caso necessário.

Uma nova filtração foi realizada utilizando uma membrana de filtração de malha mais delgada (100 mesh, 150 μm).

A solução filtrada foi colocada com bastante cautela em tubos cônicos de 50 ml já contendo Ficoll-PLUS (Amershan Bioscience, produto licenciado para uso humano), mantendo a proporção de 1:1.

Em seguida o material foi centrifugado a 400xg por 25 minutos a 25°C, com 40 segundos de frenagem. Este passo é denominado separação por centrifugação.

A camada gordurosa formada no sobrenadante foi coletada e desprezada, evitando a contaminação do anel de células mononucleares.

O anel de CMMO formado acima da camada de Ficoll-PLUS foi coletado com cuidado e transferido para tubos cônicos de 50 ml. Salina estéril (NaCl 0,9%) foi acrescentada para completar um volume de 45 ml em cada tubo cônico.

Os tubos cônicos foram centrifugados (200xg por 15 minutos, a 25°C) e os precipitados de células formados foram transferidos para um único tubo cônico de 50 ml de capacidade e ressuspensos em salina estéril (NaCl 0,9%).

Uma nova centrifugação foi efetuada (200xg por 15 minutos, a 25°C) e o precipitado de células formado foi ressuspensado em 1-2 ml de salina estéril.

As células foram contadas em câmara de Neubauer utilizando líquido de Turk (ácido acético 3%) e azul de Trypan 0,4% (Trypan Blue, SIGMA) para estimar o número de células nucleadas e a viabilidade celular, respectivamente.

As amostras foram separadas para diversos fins segundo as concentrações abaixo:

- Citometria de fluxo: $1,0 \times 10^7$ células;
- CFU-F: $8,0 \times 10^6$ células;
- Cultura: $3,0 \times 10^7$ células;
- Paciente: mínimo de $1,0 \times 10^8$ células

As amostras foram enviadas em salina com 5% de soro autólogo para que chegassem viáveis aos seus destinos.

Na Figura 5 temos representadas as etapas do procedimento de isolamento da fração de células mononucleares.

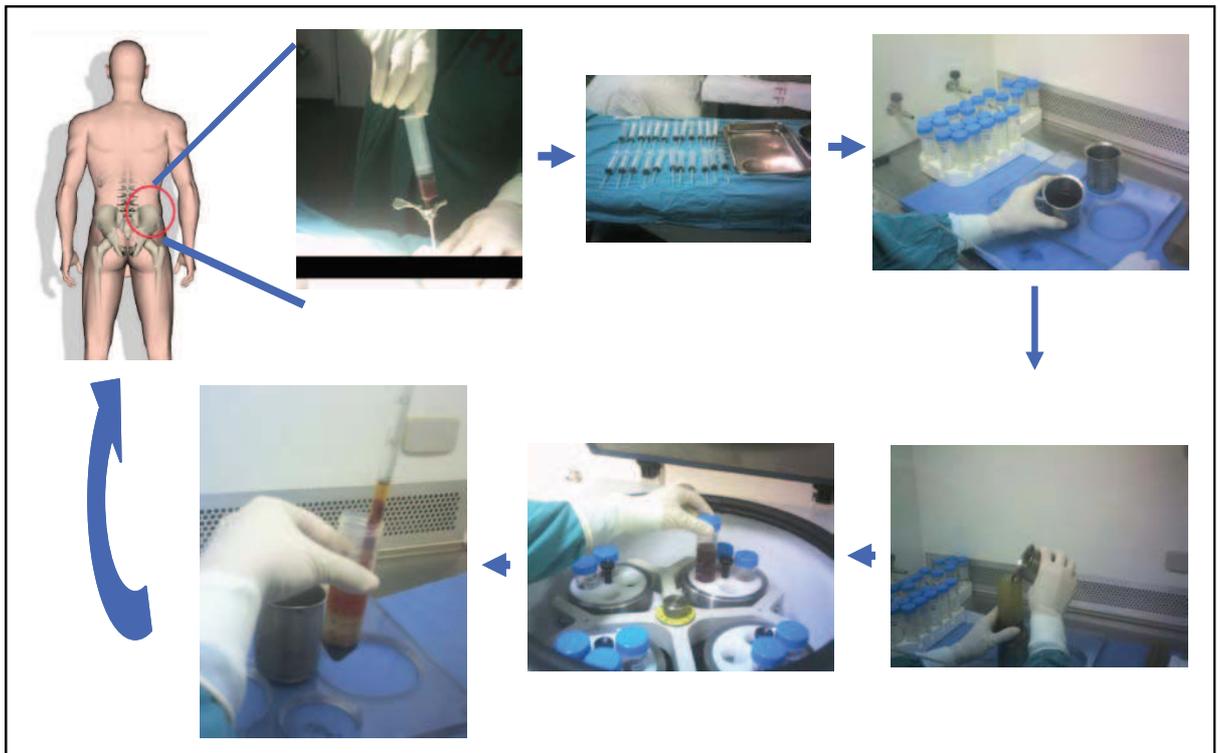


Figura 5: Etapas do aspirado e isolamento de CMMO. É realizada punção de medula óssea da crista ilíaca dos pacientes. Em seguida este aspirado é diluído em salina estéril (NaCl 0,9%), submetido à filtrações. O enriquecimento da fração de CMMO é realizado pela sua separação por Ficoll-PLUS.

- ***Vias de injeção***

As vias de injeção variam de acordo com cada enfermidade. Os pacientes acometidos por cardiomiopatia isquêmica de origem chagásica receberam as CMMO através da injeção de 5 ml de células na artéria coronária direita, 10 ml na esquerda e 5 ml na circunflexa (Figura 6). Já aqueles que sofriam de cirrose hepática, a injeção foi realizada via artéria hepática (Figura 7); e por fim, os pacientes que apresentaram AVC receberam seu tratamento pela artéria cerebral média (ACM) (Figura 8).

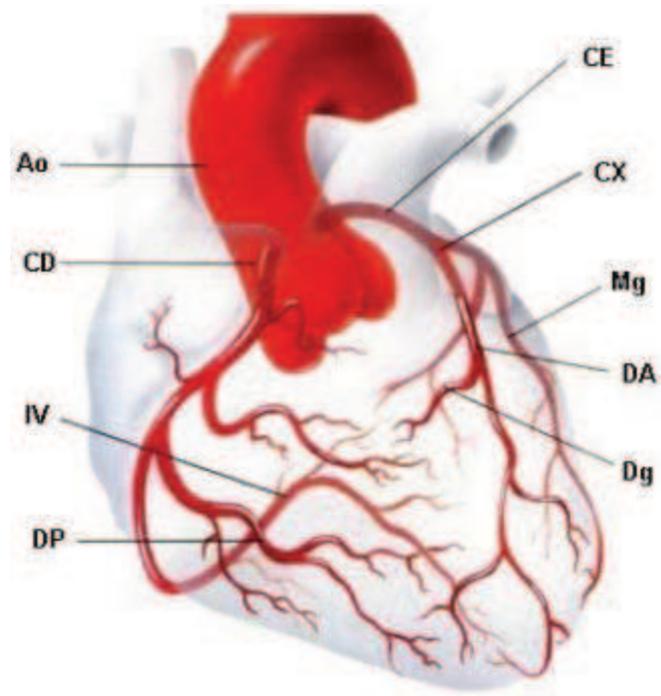


Figura 6: Visão anterior das artérias coronárias. Os ramos principais são a coronária direita (CD) e os ramos descendente anterior (DA) e circunflexo (CX) da coronária esquerda. Ao - artéria aorta; CD - coronária direita; IV - ramo interventricular; DP - ramo descendente posterior; CE - coronária esquerda; CX - ramo circunflexo; Mg - ramo marginal; DA - ramo descendente anterior; Dg - ramo diagonal. Disponível em <http://iatreion.warj.med.br>

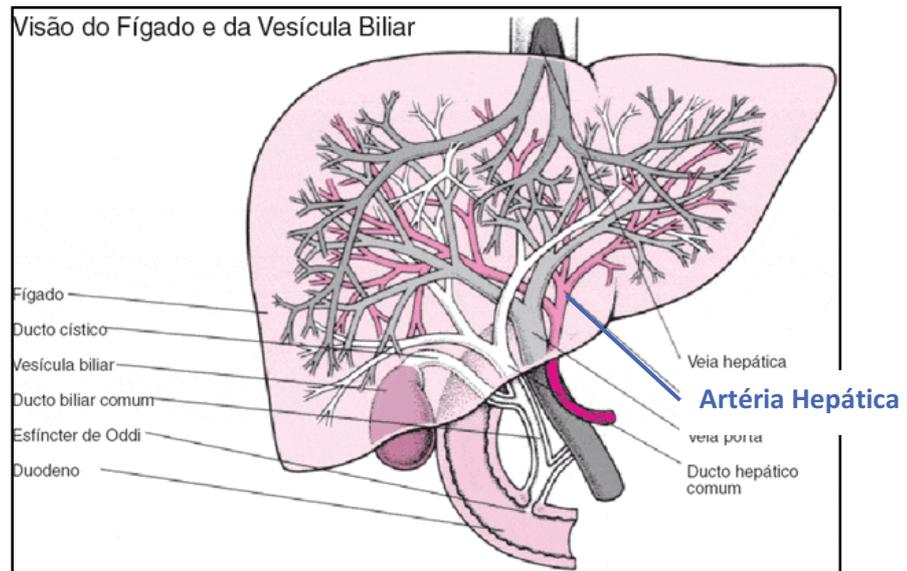


Figura 7: Circulação hepática. As células são injetadas na artéria hepática de pacientes cirróticos (destacada em rosa). Disponível em <http://www.msd-brazil.com>

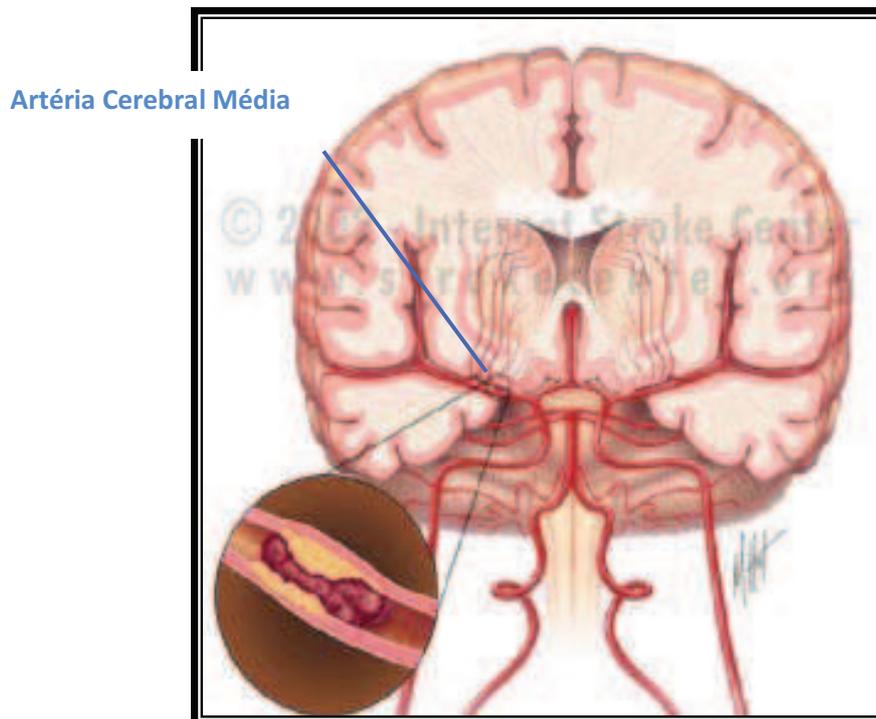


Figura 8: Circulação das artérias cerebrais. As CMMO foram injetadas via ACM. (Adaptado da Universidade de Washington) Disponível em <http://www.strokecenter.org>

3.3 Caracterização por Citometria de Fluxo:

As células foram caracterizadas por citometria de fluxo em dois momentos distintos: logo após o isolamento das CMMO e após atingirem a terceira passagem em cultura.

3.2.1 Caracterização após o isolamento de CMMO (a fresco):

A fração enriquecida em CMMO foi analisada segundo a combinação de monoclonais descrita na Tabela 2 ($1,0 \times 10^6$ CMMO/ tubo). Os monoclonais foram diluídos (1:30) segundo combinações de $3\mu\text{l}$ de cada monoclonal para $100\mu\text{l}$ de CMMO, as amostras foram incubadas por 20 minutos, ao abrigo de luz, a temperatura ambiente.

Após a incubação com os monoclonais, as células foram lavadas com 5 ml de PBS a 400xg por 3 minutos. O sobrenadante foi descartado e acrescentamos $500\mu\text{L}$ de PBS em cada tubo. As amostras foram adquiridas no equipamento FACSCanto (BD Bioscience) utilizando o software BDFacsDIVA (versão 6.1.1) e analisadas no software Paint-a-Gate^{PRO} (BD Bioscience)

Foram observados aspectos morfológicos (side scatter - SSC-A, forward scatter- FSC-H) e a presença ou ausência dos anticorpos relacionados na Tabela 2 para a completa caracterização das amostras. Análise prévia da viabilidade das amostras foi realizada com o corante 7AAD.

As principais características das moléculas CDs utilizadas neste estudo estão resumidas no Anexo I deste trabalho.

Tabela 2 Painel de anticorpos utilizados para o estudo da fração CMMO

Tubo	*APC	FITC	PE	CY5	CY7
1	-	CD8	CD3	CD4	CD45
2		CD19	CD56	-	CD45
3	CD45	CD105	CD73	CD117	CD34
4	CD45	CD105		CD90	CD34
5	CD45	CD31	CD34	HLA-DR	CD33
7	CD45	CD105	CD14	CD64	CD34

Tabela 3 Painel de anticorpos utilizados para o estudo de MSC em cultura.

Tubo	*APC	FITC	PE	CY5	CY7
1	CD45	CD105	CD73	CD90	CD34
2	CD45	CD105	CD73	HLA-DR	CD34
3	branco	branco	Branco	branco	Branco

*Anticorpos conjugados aos fluorocromos APC (do inglês *allophycocyanin*), FITC (do inglês *Fluorescein isothiocyanate*), PE (do inglês *Phycoerythrin*), PE-CY5 (do inglês *Phycoerythrin cyano5*) e PE-CY7 (do inglês *Phycoerythrin cyano7*).

3.2.2 Caracterização das células em cultura MSC (passagem3):

As células foram removidas do frasco de cultura por digestão enzimática (tripsina 0,25%EDTA) após atingirem aproximadamente 90% de confluência em terceira passagem (aproximadamente 30 dias).

O precipitado de células formado foi mantido sob agitação leve em temperatura ambiente com meio DMEM 15%SFB por 30 minutos afim de recuperar possíveis epítomos que sofreram com a ação da tripsina.

A seguir, as células foram lavadas com 5 ml de PBS e centrifugadas a 400 xg por 3 minutos. Este procedimento foi repetido por três vezes.

O precipitado celular formado (após a terceira lavagem) foi ressuspenso em 500 µl de PBS. 100µL destas células foram transferidos para tubos contendo as combinações de anticorpos descritas na Tabela 3 (3µl de cada monoclonal), incubados por 20 minutos ao abrigo de luz, a temperatura ambiente.

As amostras foram adquiridas no equipamento FACSCanto (BD Bioscience) utilizando o software BDFacsDIVA (versão 6.1.1) e analisadas no software Paint-a-Gate^{PRO} (BD Bioscience).

Para ajustar as voltagens do equipamento para células em cultura é necessário realizar a aquisição de células não marcadas primeiro, este passo nos permite retirar o brilho proporcionado por auto-fluorescência das células em cultura e ajustar a sensibilidade do equipamento para cada fotomultiplicador.

Após este passo, procedemos as aquisições dos tubos marcados com monoclonais identificando o percentual de expressão das proteínas analisadas em cada amostra.

3.4 *Cultura de Unidades Formadoras de Colônias de Fibroblastos (CFU-F):*

A fração das CMMO separada para CFU-F foi plaqueada na densidade de $2,08 \times 10^5$ células/cm² no dia do procedimento terapêutico. As células foram mantidas em estufa a 37°C com atmosfera úmida em presença de 5% de CO₂.

As células foram cultivadas em meio de cultura DMEM (Gibco) suplementado com 2g NaHCO₃ (23,8 mM), 5 g HEPES (20,98 mM), 0,293g L-glutamina (2 mM), 1% de penicilina e estreptomicina (Gibco), 20% SFB (Hyclone) e 0,1% hidrocortisona (1µM).

Após sete dias, metade deste meio de cultura foi cuidadosamente retirado e substituído por um novo meio com composição idêntica ao anterior.

Dezesseis dias pós-terapia celular, as colônias já formadas foram lavadas com PBS por 3 vezes e fixadas em metanol PA por 5 minutos. Em seguida foram coradas com Giensa por 5 minutos e o excesso de corante foi retirado por lavagens com água destilada.

As colônias, visíveis a olho nu, foram manualmente contadas.

3.5 *Cultivo de Células Estromais Mesenquimais de Medula Óssea (CEMO):*

A fração enriquecida em CMMO separada para cultura celular foi plaqueada na densidade de $8,0 \times 10^5$ células/cm², manida em estufa a 37°C com atmosfera úmida em presença de 5% de CO₂ em meio de cultura DMEM suplementado com 2g NaHCO₃ (23,8 mM), 5 g HEPES (20,98 mM), 0,293g L-glutamina (2 mM), 1% de penicilina e estreptomicina (Gibco) e 20% FBS (Hyclone).

Após três dias do plaqueamento inicial, o meio presente no frasco de cultivo foi recolhido, transferido para um tubo cônico de 15 ml de capacidade e

centrifugado a 250xg por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado formado ressuspendido em novo meio de cultura.

Este novo meio foi colocado sobre as células aderidas. O processo de centrifugação foi realizado para que as células estromais que ainda não estivessem aderidas não fossem descartadas. A fração de células aderentes, isoladas de CMMO, que contém entre outras células, MSC, é chamada de células estromais mesenquimais de medula óssea.

O meio de cultura foi trocado a cada três dias e as células foram removidas dos frascos de cultura quando necessário por método enzimático.

3.6 Diferenciação:

As células foram plaqueadas a uma densidade $5,7 \times 10^4$ células/ cm^2 em placa de 6 poços.

Para indução da osteogênese, as células foram cultivadas em DMEM alta glicose suplementado com 15% SFB + 50 U/ml penicilina + 50 mg/ml estreptomicina, 10^{-6} μM de dexametasona, 10mM de β -glicerofosfato, e 50 μM de ácido ascórbico (reagentes Sigma-Aldrich).

Para indução da adipogênese, as células foram cultivadas em DMEM alta glicose suplementado com 15% SFB, 50 U/ml penicilina, 50 mg/ml estreptomicina, 50 μM de indometacina, 10 $\mu\text{g/ml}$ de insulina humana, e 10^{-7} μM de dexametasona (reagentes Sigma-Aldrich).

Após 21 dias de cultivo em meio de indução, as células foram fixadas com Formaldeído 4% em PBS por 30 minutos a temperatura ambiente. O fixador foi retirado e as células lavadas com água destilada. Depois de secas, adicionamos a placa de cultura os corantes Vermelho de alizarina 1% (Sigma-Aldrich) e Óleo

Vermelho O 0,2% (Sigma-Aldrich), capazes de corar depósitos de cálcio e vacúolos citoplasmáticos de lipídeos, respectivamente, por 20 minutos. O corante foi retirado e as placas foram lavadas novamente com água destilada.

3.7 Imunofluorescência:

Foram analisadas lamínulas de células cultivadas *in vitro* em passagem 3 para análise em imunocitoquímica.

A expressão de proteínas foi detectada por imunofluorescência na qual foram utilizados os anticorpos monoclonais anti-vimentina (Sigma, número de catálogo V6630), SSEA-4 (Chemicon International, número de catálogo MAB4360) e TRA1-60 (Chemicon International, número de catálogo MAB 4304). A localização dos anticorpos primários foi realizada pela ligação de anticorpo secundário anti-mouse IgG (Molecular Probes A1101), conjugado ao fluorocromo Alexa 488. O comprimento de onda de excitação do fluorocromo Alexa 488 é de 490 nm e de emissão é 525 nm. O núcleo das células foi marcado com 4'-6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI), que apresenta o pico de excitação no comprimento de onda 350 nm e o pico de emissão no comprimento de onda de 450 nm.

Gelatinizamos as lamínulas previamente. Após este tratamento as células foram colocadas na densidade de $5,7 \times 10^4$ células/ cm² em terceira passagem.

Mantivemos as células em estufa a 37°C com atmosfera úmida em presença de 5% de CO₂ em meio de cultura DMEM suplementado com 2g NaHCO₃ (23,8 mM), 5 g HEPES (20,98 mM), 0,293g L-glutamina (2 mM, 1% de penicilina e estreptomicina (Gibco) e 20% SFB (Hyclone).

Quando as células atingiram um grau de semi-confluência (~80% do campo), foram fixadas com paraformaldeído 4% em tampão fosfato, por 20 minutos a

37°C. Retiramos o fixador, lavamos as lamínulas com solução salina PBS e as armazenamos a 4°C.

As células nas lamínulas foram bloqueadas com solução de PBS em 2% albumina por 30 minutos em temperatura ambiente. Os anticorpos primários foram diluídos em PBS BSA (do inglês *bovine serum albumin*) 0,1% (1:200) e colocados sobre as lamínulas. O período de incubação foi de 60 minutos a 37°C.

Em seguida as lamínulas foram lavadas com PBS três vezes durante 10 minutos/ lavagem. Após as lavagens as incubamos com anticorpo secundário apropriado também diluído em PBS BSA 0,1% (1:400), por 60 minutos ao abrigo de luz a 37°C. Novamente três lavagens de 10 minutos cada com PBS foram realizadas.

Marcamos as lamínulas por DAPI durante 5 minutos a temperatura ambiente e lavamos as lamínulas com PBS novamente.

As lamínulas foram montadas sobre lâminas utilizando Vectashield (Vecta Lab) como meio de montagem e analisadas no microscópio de fluorescência APOTOME (Zeiss).

Foram utilizados para controles positivos da proteína vimentina as células-tronco mesenquimais dos doadores saudáveis, uma vez que a vimentina é expressa constitutivamente em células de origem mesenquimal.

Utilizamos para controle positivo de TRA1-60 e SSEA-4, células-tronco mesenquimais derivadas de líquido amniótico, uma vez que existem trabalhos na literatura que descrevem a expressão desta proteínas de pluripotência nestas células (YOU et al, 2007). Assim, consideramos interessante o fato das células-tronco derivadas de líquido amniótico serem células de origem mesenquimal

(assim como as células-tronco mesenquimais de medula óssea) e expressarem tais proteínas.

Como controles negativos, amostras de todas as enfermidades e de doadores saudáveis foram incubadas somente com o anticorpo secundário.

3.8 Análises Estatísticas

Os resultados foram apresentados como média \pm desvio padrão. Para análise entre grupos foi utilizado o teste ANOVA de uma via com o pós teste de Bonferroni realizados pelo software GraphPad Prisma versão 5.0. Foram consideradas significativas diferenças para $P < 0,01$.

4 Resultados

O isolamento de CMMO e sua posterior injeção em pacientes acometidos por doença de Chagas, AVC, e cirrose hepática fazem parte de um estudo de FASE I, que visa avaliar somente a segurança e exeqüibilidade do método.

4.1 Isolamento de Células Mononucleares da Medula Óssea (CMMO):

O anel de células resultante do processamento da medula por Ficoll-Plus foi recolhido e analisado por citometria de fluxo. O processo de isolamento de CMMO mostrou-se eficaz, promovendo o enriquecimento da amostra em CMMO, $73.54 \pm 8.80\%$ das células presentes nesta fração correspondem à CMMO.

O número de CMMO, bem como os percentuais obtidos em cada enfermidade estudada foram comparados e não foram observadas diferenças significativas quando confrontados com os dados relativos as CMMO de doadores sadios, como demonstrado nas Figuras 9 e 10.

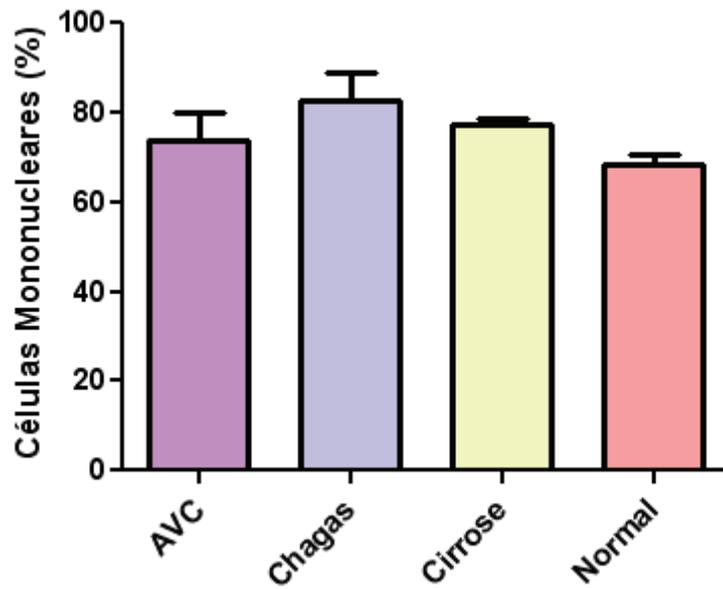


Figura 9: Eficiência de isolamento de CMMO_h por Ficoll-Plus em pacientes acometidos por AVC (n=5), cirrose hepática (n=7), Doença de Chagas (n=5) e doadores normais (n=3). P>0.01

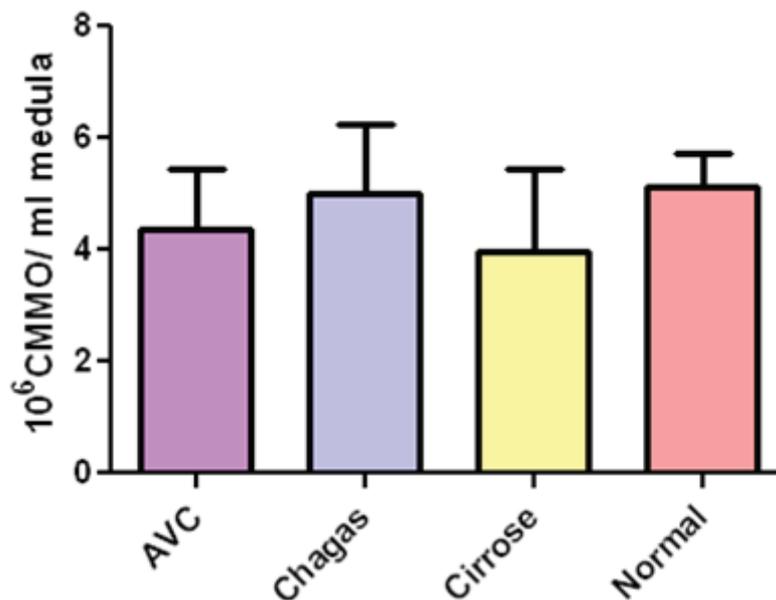


Figura 10. Número de CMMO obtidas do isolamento por Ficol-PLUS em pacientes acometidos por AVC (n=5), cirrose hepática (n=7), Doença de Chagas (n=5) e doadores normais (n=3). P>0.01

4.2 Caracterização por Citometria de Fluxo (a fresco):

Na imunofenotipagem por citometria de fluxo são utilizados anticorpos monoclonais associados a fluorocromos para reagir com moléculas que integram a superfície, o citoplasma ou o núcleo celular, formando complexos antígeno-anticorpo. O padrão de reatividade entre os antígenos e a presença ou ausência de determinada proteína permitem estabelecer qual linhagem celular e em que grau de maturação encontra-se a população celular analisada. Deste modo, análises utilizando anticorpos distintos permitem a confecção de um mapa de características fenotípicas da célula que leva a identificação exata do tipo celular presente na amostra e qual porcentagem este representa da mesma.

Assim, com o objetivo de caracterizar quais populações estavam presentes na injeção de CMMO das amostras analisadas, foram utilizados os parâmetros morfológicos SSC (do inglês *side scatter*) e FSC (do inglês *forward scatter*) - onde SSC permite analisar a granulosidade, isto é, a complexidade das células da amostra (presença de organelas, núcleo etc) e FSC permite diferenciar por tamanho a população celular - e parâmetros fenotípicos representados pela marcação dos anticorpos ou CDs (do inglês *cluster of differentiation*).

Com a utilização desta ferramenta, constatamos a presença de diversos tipos celulares nas amostras estudadas, dos quais destacam-se células mononucleares - linfócitos (T,B e natural killers), monócitos, precursores eritróides, MSC e HSC- e células polimorfonucleares, como neutrófilos - ilustrados na Figura 11.

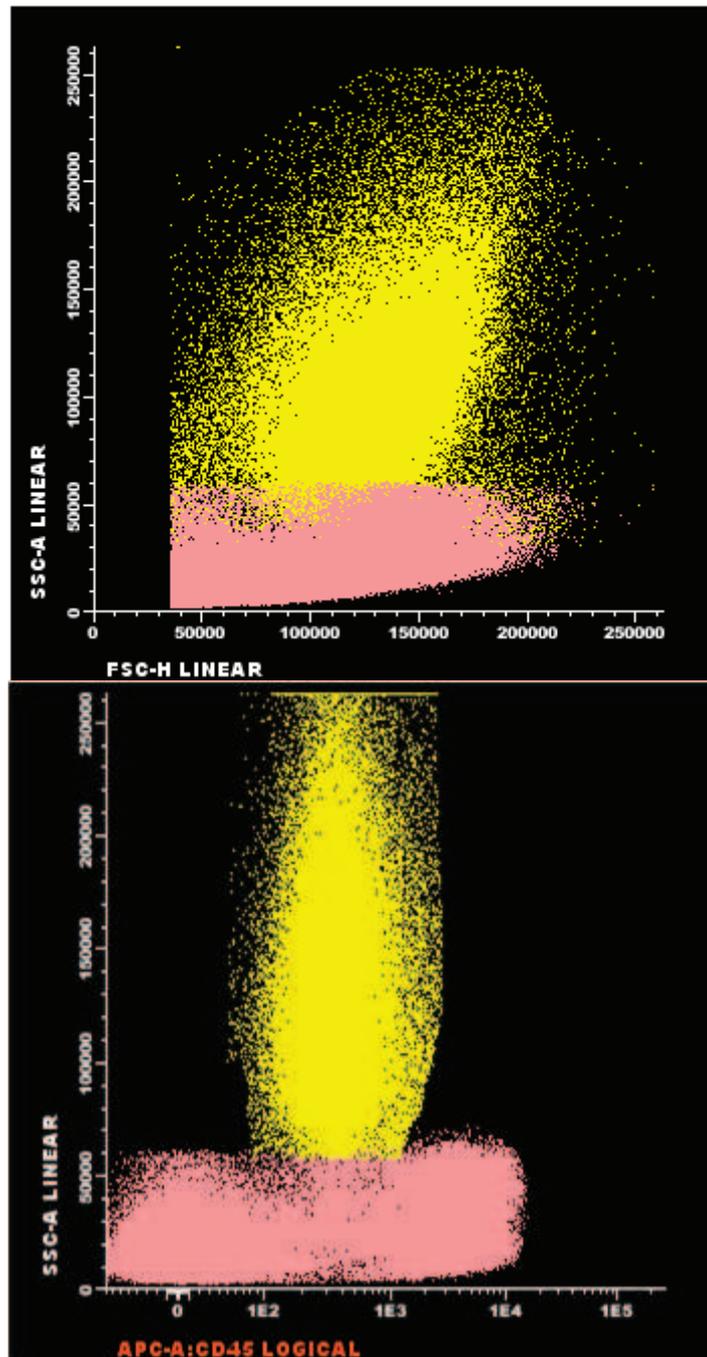


Figura 11: Histogramas representativos das células obtidas após o processamento com Ficoll-Plus. Encontram-se destacadas em rosa as células mononucleares e em amarelo as polimorfonucleares. FSC(forward scatter), SSC (side scatter), CD45 monoclonal considerado pan leucocitário.

Através da identificação imunofenotípica - que confere um conjunto de características de expressão específica para cada tipo celular- conseguimos identificar os tipos celulares presentes na fração enriquecida em CMMO. Este conjunto de características está compilado na Tabela 4 e a metodologia de análise detalhada encontra-se no AnexoII deste trabalho.

Tabela 4: Perfil imunofenotípico de cada população celular estudada.

Fenótipo	Tipo celular identificado
CD45 ^{dim} CD34 ^{high} SSC↓	Células-tronco hematopoiéticas
CD45-CD34- SSC↓ FSC↓	Eritroblastos
CD105+CD90 ^{high} CD73+CD45-CD34-HLA-DR-	Células mesenquimais
CD45+CD34-CD33+CD31+	Neutrófilos
CD45+CD34-CD64+CD14+HLA-DR+	Monócitos
CD45+CD34-CD3+	Linfócitos T
CD45+CD34-CD3+CD4+	Linfócitos T helper
CD45+CD34-CD3+CD8+	Linfócitos T citotóxicos
CD45+CD34-CD3-CD19+	Linfócitos B
CD45+CD34-CD56+	Células NK

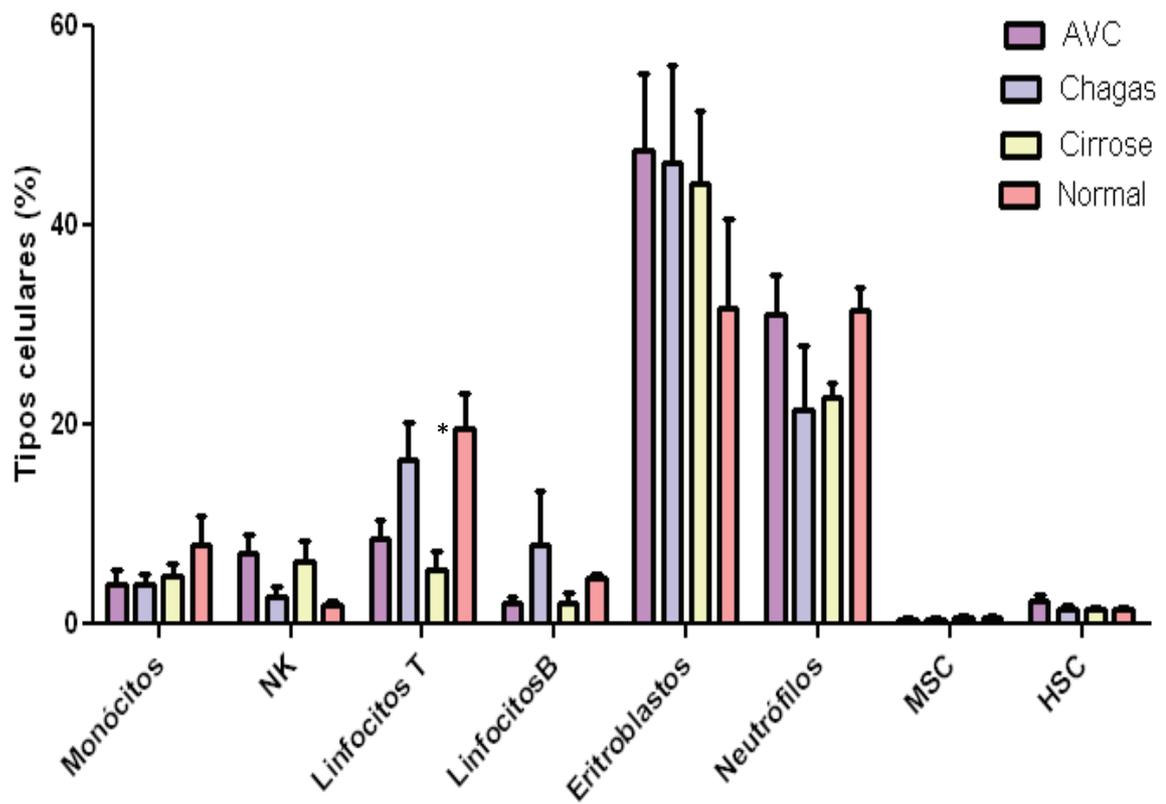


Figura 12: Quantificação dos tipos celulares presentes após o enriquecimento de CMMO por Ficoll-Plus nas medulas provenientes de pacientes acometidos por AVC (n=5), cirrose hepática (n=7), Doença de Chagas (n=5) e doadores normais(n=3) *P<0.01

Tabela 5: Quantificação dos tipos celulares presentes após o enriquecimento de CMMO por Ficoll-Plus nas medulas provenientes de pacientes acometidos por AVC (n=5), cirrose hepática (n=7), Doença de Chagas (n=5) e doadores normais(n=3) Média±desvio padrão

Tipo Celular	AVC	Chagas	Cirrose	Normal
HSC	2,40±1,36	1,5±1,12	1,54±0,61	1,47±0,38
MSC	0,39±0,6	0,54±0,24	0,60±0,55	0,63±0,48
Monócito	4,02±3,38	6,82±2,20	4,88±3,97	7,94±5,05
Linfócitos T	8,63±3,92	15,93±9,04	5,43±5,12	19,67±6,10
Linfócitos B	2,12±1,35	2,14±0,53	2,06±2,98	4,54±0,85
NK	7,05±3,87	2,78±2,50	6,31±5,39	2,06±0,69
Eritroblasto	47,44±17,50	46,27±19,65	44,20±20,34	31,68±15,42
Neutrófilo	31,02±7,86	21,54±12,95	22,67±4,13	31,56±3,92

Assim, além de identificar cada população celular e quantificar qual percentual da amostra representavam, comparamos também se haviam diferenças significativas entre as células dos pacientes doentes e as de doadores normais (Figura 12 e Tabela 5). Esta comparação detalhada bem como seu perfil fenotípico estão representados nas Figuras: 24 monócitos; Figura 25 Células NK; Figura 26: linfócitos T; Figura 27: linfócitos B; Figura 28 neutrófilos; Figura 29: HSC; Figura 30 MSC; Figura 31 eritroblastos.

4.3 Cultivo de Células Estromais Mesenquimais de Medula Óssea (CEMO):

As células foram mantidas em cultura por um período de 90 dias, correspondente a passagem 9, com o objetivo de avaliar seu potencial de manter-se em cultura, sua capacidade de auto-replicação e de não sofrer diferenciação espontânea após sucessivas passagens enzimáticas.

A morfologia das células foi semelhante para as três doenças e para células de doadores saudáveis - característica de células mesenquimais, forma fibroblastóide e formando morros e vales no frasco de cultura.

Na Figura 13A temos células recém-plaqueadas obtidas após o processamento com Ficoll-Plus (dia 0). Na Figura 13B observamos algumas células começando a aderir ao frasco de cultura (mesenquimais) e outras células, presentes na fração de enriquecimento de células mononucleares de medula óssea arredondadas e brilhantes, no sobrenadante (representativo das células em cultura no dia 3). Nas Figuras 13C-F observamos as células mesenquimais aderidas ao frasco de cultura em terceira passagem, representativos das amostras recebidas de pacientes com AVC, doença de Chagas, cirrose hepática e doadores normais respectivamente.

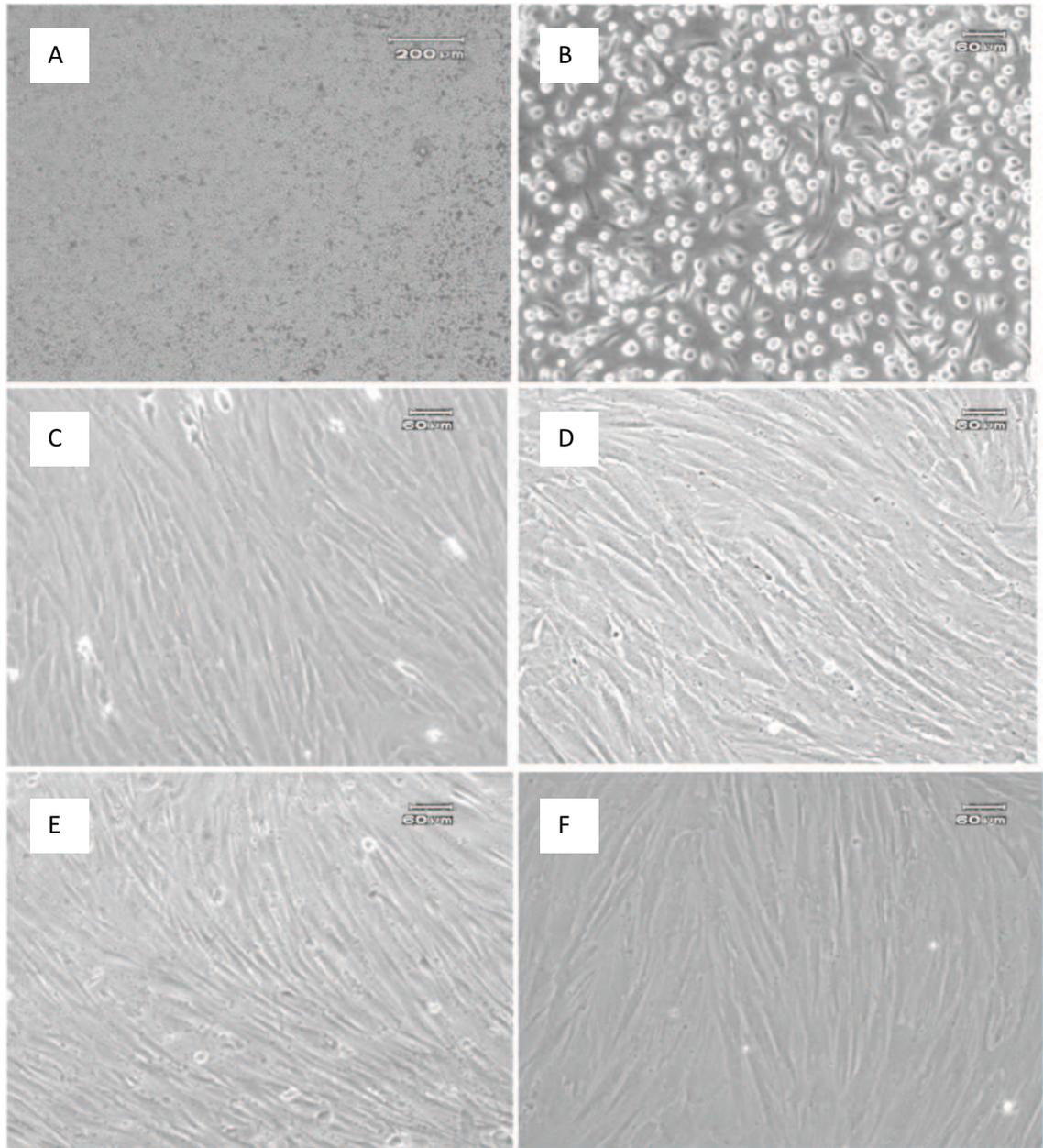


Figura 13 : A.Fração enriquecida em CMMO em cultura após o processamento com Ficoll-Plus (dia 0). B. CMMO após 3 dias de cultivo. C. MSC em passagem3 (AVC). D. MSC em passagem3 (doença de Chagas). E. MSC em passagem3 (Cirose hepática). F. MSC de doador normal em passagem 3 .

4.4 Imunofenotipagem das MSC pós-cultivo:

As células cultivadas até a terceira passagem foram novamente caracterizadas com o objetivo de identificarmos qual ou quais tipos celulares estavam sendo cultivados.

Todas as culturas analisadas, independentes da doença de origem, apresentaram os mesmos perfis morfológicos e fenotípicos demonstrados na Tabela 6 e nas Figuras 14 e 15.

Os percentuais de expressão das proteínas (sugeridas pela Sociedade Internacional de Terapia Celular - SITC) foram quantificados e comparamos os resultados obtidos nas MSC derivadas de pacientes doentes em relação à doadores saudáveis. Não foram observadas diferenças significativas entre as MSC derivadas de pacientes e MSC derivadas de doadores saudáveis (Figura 16).

Tabela 6: Perfil imunofenotípico das MSC em cultura.

Positivas	Negativas
CD73	CD34
CD90	CD45
CD105	

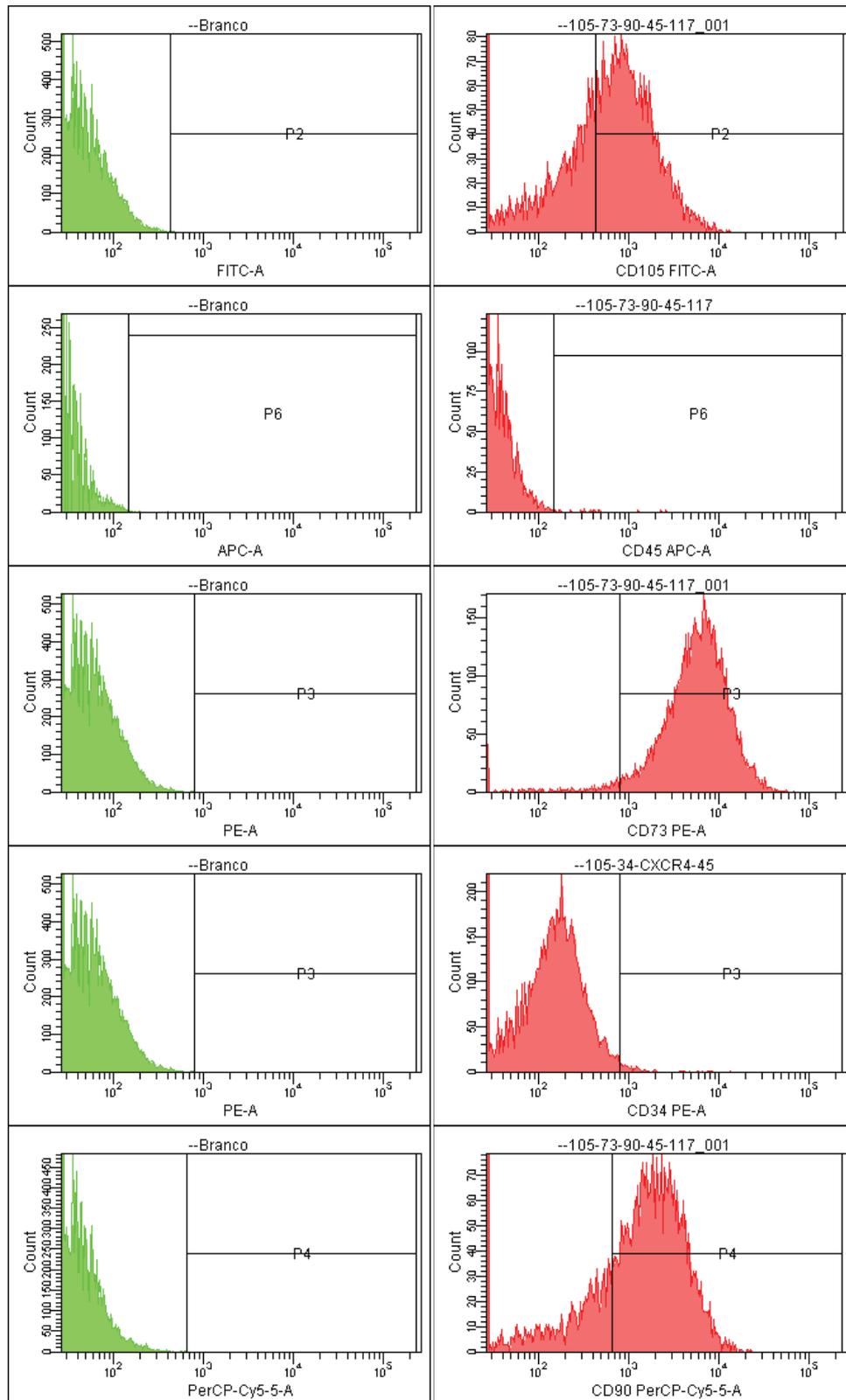


Figura 14: Histogramas representativos das MSC em passagem 3. Em verde, MSC não marcadas (branco) e em vermelho CD105+, CD45-, CD73+, CD34- e CD90+.

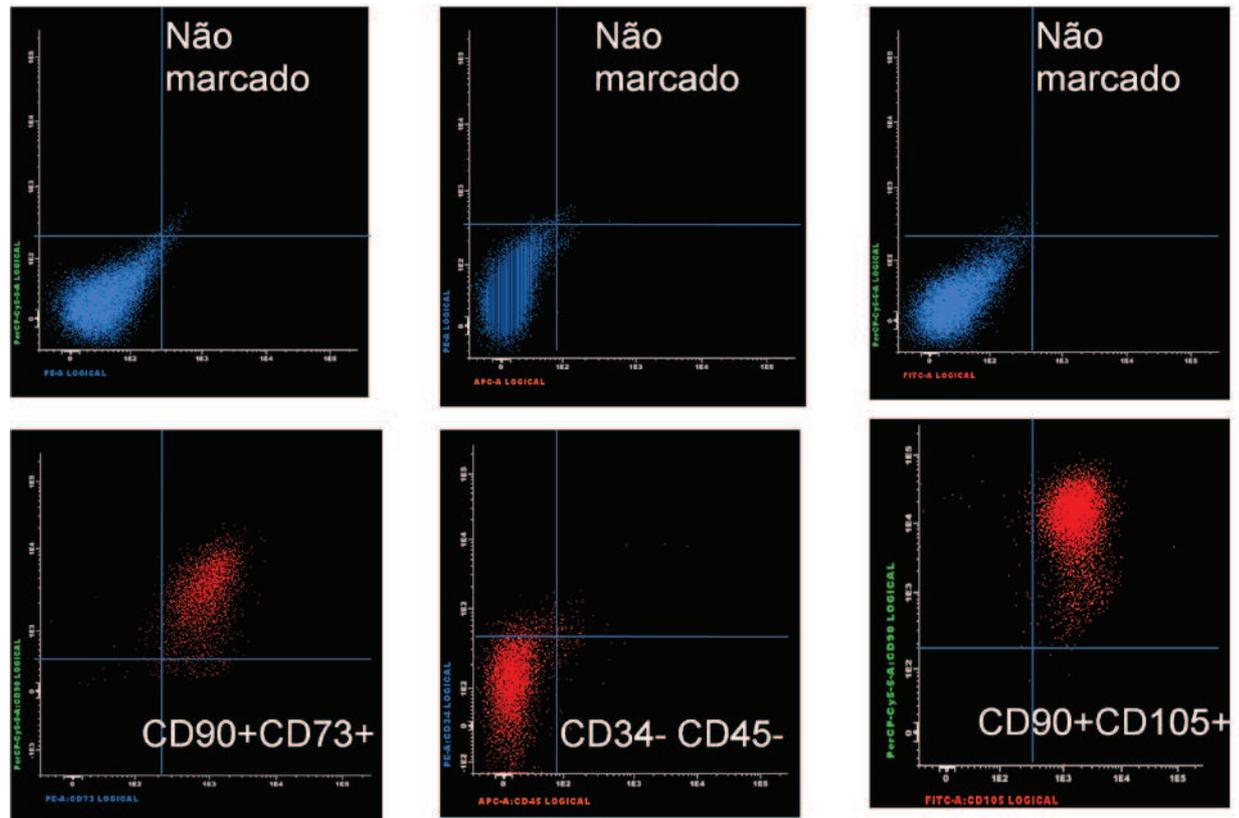


Figura 15: Histogramas representativos das MSC em **passagem 3**. Em azul, MSC não marcadas (branco) e em vermelho expressão de CD90, CD105 CD73 e ausência de expressão de CD34 e CD45

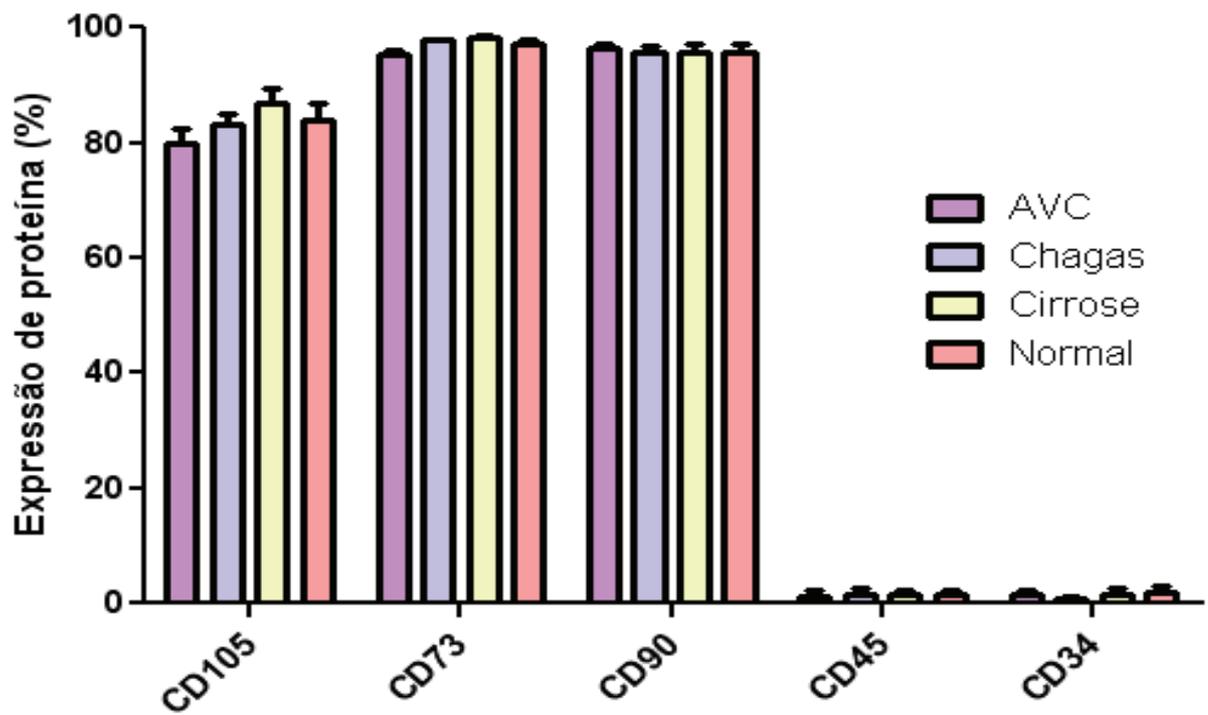


Figura 16:Quantificação da expressão de proteínas presentes após o cultivo de MSC em passagem 3 provenientes da fração enriquecida em CMMO de pacientes acometidos por AVC (n=5), cirrose hepática (n=7), Doença de Chagas (n=5) e doadores normais(n=3)

4.5 Diferenciação:

Para atendermos aos critérios de classificação de uma célula-tronco mesenquimal definidos pela SITC, já mencionados anteriormente, avaliamos o potencial de diferenciação adipogênico e osteogênico das células em cultura do estudo.

Para tal, três amostras de cada enfermidade e três amostras de doadores saudáveis foram submetidas a indução adipogênica e osteogênica. Todas as culturas apresentaram diferenciação após 21 dias de indução osteogênica e adipogênica.

Na Figura 17 observamos imagens representativas dos experimentos de diferenciação. A Figura 17A mostra células que foram cultivadas durante 21 dias com meio de cultivo basal (controle) e na Figura 17B podemos observar células que apresentam vacúolos lipídicos corados em vermelho (pelo corante oil red) em seu citoplasma, característica observada em adipócitos. Na Figura 17C observamos um poço de placa de 6 poços onde as células foram cultivadas com meio basal (controle) e na Figura 17D, células coradas com vermelho de alizarina, este corante tem afinidade por cálcio, sugerindo células com capacidade aumentada de depositar cálcio em seu citoplasma, característica compartilhada com osteócitos.

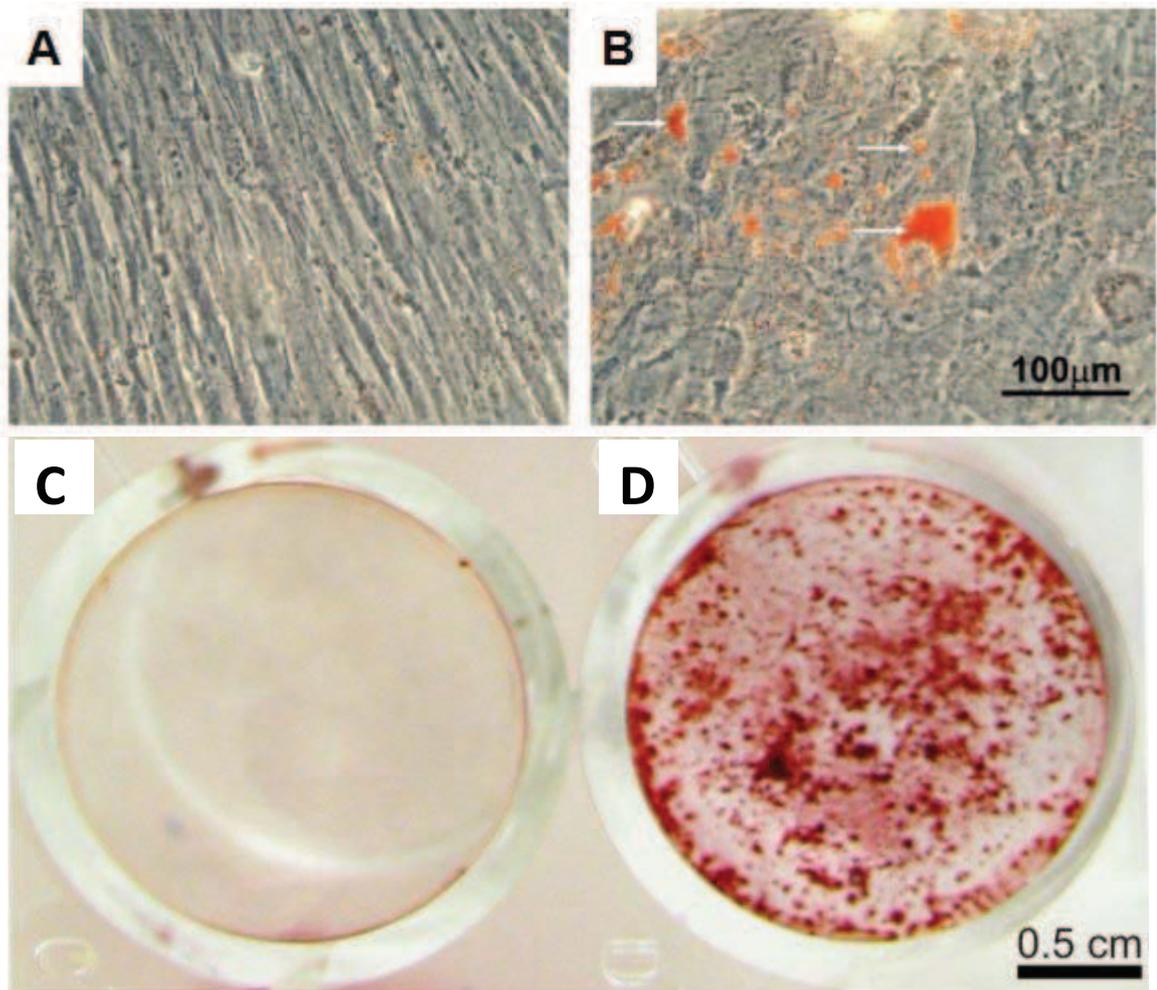


Figura 17: Foto ilustrativa da indução de diferenciação em MSC in vitro. A. Controle negativo – células que não receberam o meio de indução adipogênica. B. Células que receberam tratamento de indução adipogênica. Setas Brancas: Vacúolos corados por Oil Red O representando vacúolos lipídicos. C. Controle negativo- células que não receberam o meio de indução osteogênica. D: Macroscopia de placa de cultura após tratamento com vermelho de alizarina. Pontos vermelhos representam depósitos de cálcio.

4.6 Cultura de Unidades Formadoras de Colônias de Fibroblastos (CFU-F):

O ensaio utilizando unidades formadoras de colônias de fibroblastos, CFU-F (do inglês *colony forming unit fibroblast*), (Figura 18) como descrito na literatura (MEULEMAN et al, 2006; DEANS et al, 2000) é usado como um método *in vitro* para avaliar a capacidade funcional das MSC. Presume-se que cada colônia foi gerada por uma única célula precursora.

Assim, com o objetivo de avaliar o potencial gerador de colônia de fibroblastos este ensaio foi realizado em três amostras de cada enfermidade. Infelizmente não tivemos a oportunidade de realizar este ensaio em amostras de doadores saudáveis devido à dificuldade de obtenção das mesmas e ao volume reduzido de medula das amostras saudáveis que recebemos – o que nos levou a priorizar desta forma os outros ensaios.

Os resultados obtidos sugerem a presença de células-tronco mesenquimais com potencial gerador de colônias de fibroblastos em todas as amostras analisadas. A Figura 18 é representativa de nossos experimentos, onde observamos as colônias de CFU-F em macro e micro aumento respectivamente.

Como todas as culturas foram capazes de gerar CFU-F fomos então avaliar se havia diferença no potencial de geração de CFU-F entre células provenientes das diferentes doenças, onde não observamos diferenças com significância estatística. (Figura 19)

Porém, quando confrontamos o número de colônias de fibroblastos/ml de medula com dados obtidos de doadores sadios da literatura (DIMMELER et al, 2007) observamos que as MSC derivadas de pacientes apresentam uma capacidade de formar colônias de fibroblastos cerca de 5 vezes menor que as MSC de doadores

saudáveis. Para tanto tivemos o cuidado de comparar nossos dados com dados da literatura que utilizaram o mesmo protocolo que nosso grupo, tanto no isolamento/enriquecimento das CMMO quanto nos ensaios de indução de formação de colônias.

Observamos que o fator doença é capaz de interferir na capacidade de formação de colônias de fibroblastos. Diante destes resultados, avaliamos se a idade dos pacientes também seria capaz de interferir na capacidade funcional das MSC através do mesmo ensaio. Conforme demonstrado na Figura 20 existe uma correlação negativa entre idade dos pacientes e capacidade de formação de colônias.

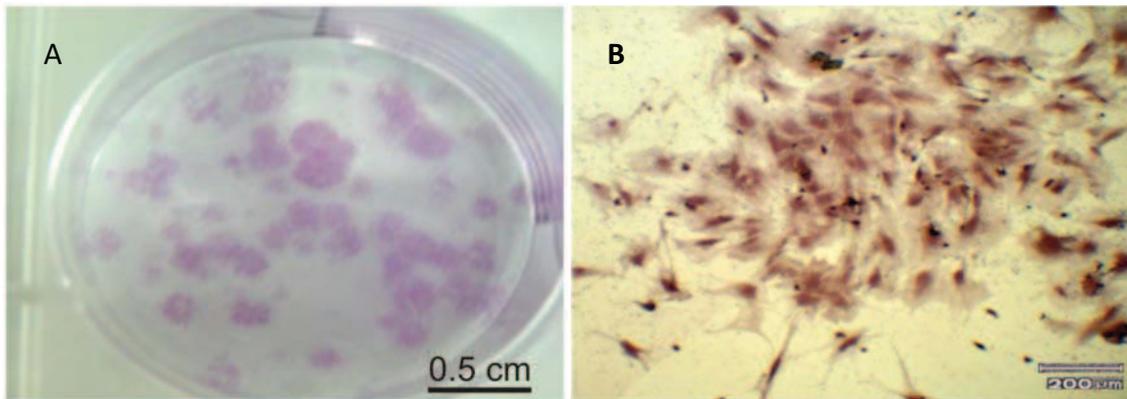


Figura 18: Placa corada com Giemsa após a indução de formação de CFU-F. A. Macro aumento. B. Micro aumento.

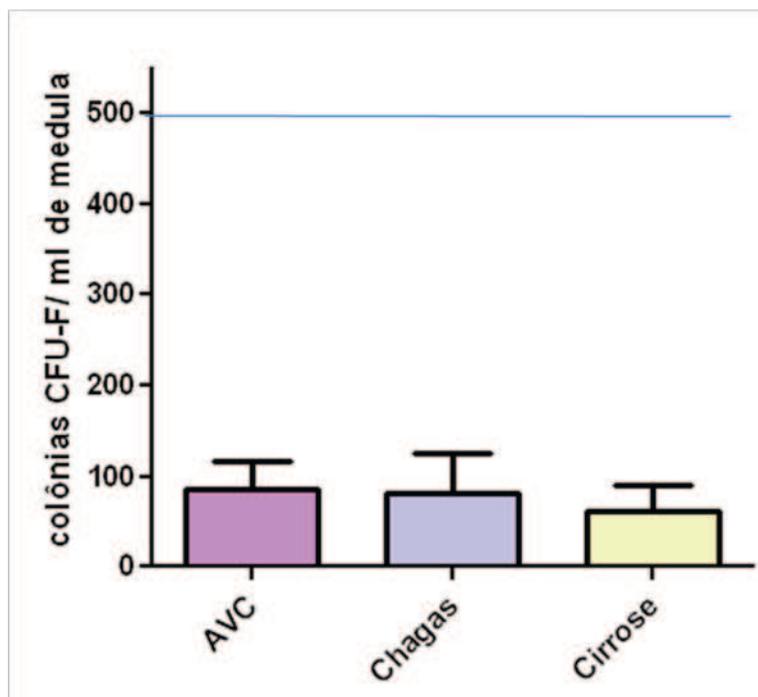


Figura 19: Número de colônias de CFU-F formadas em MSC separadas por doença de origem. AVC (n=3), Cirrose hepática (n=3) Chagas (n=3), Barra azul representa número de colônias de CFU-F formado em células derivadas de doadores normais (DIMMELER et al,2007)

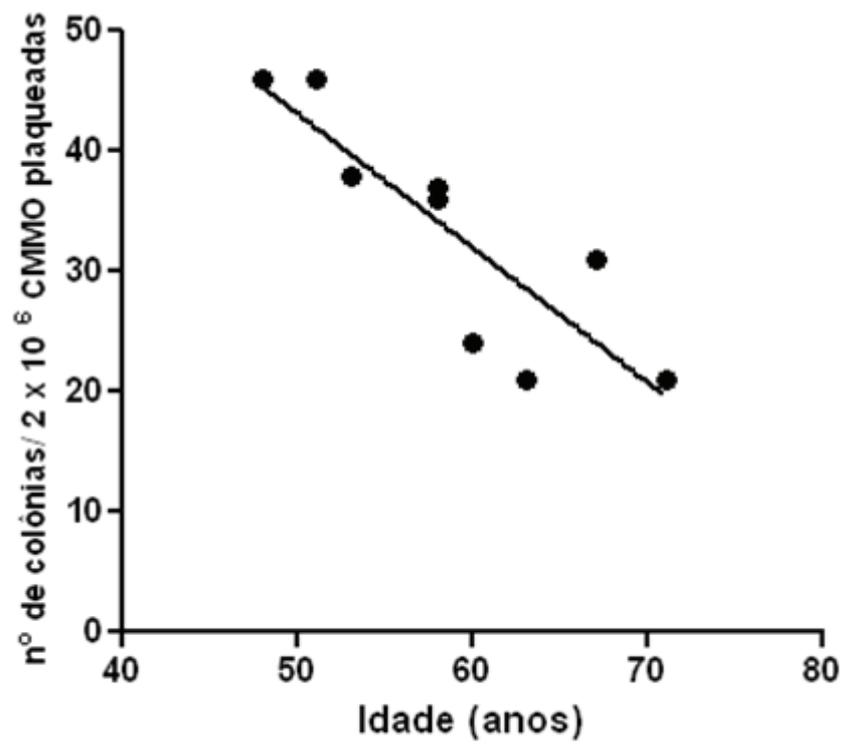


Figura 20: Número de colônias de CFU-F formadas / 2×10^6 CMMO semeadas x Idade do paciente em anos. (N=9)

$$R^2 = 0.7453$$

4.7 Imunofluorescência:

Para avaliarmos se as doenças poderiam alterar qualitativamente a expressão de proteínas específicas realizamos ensaios de imunofluorescência para as proteínas vimentina, SSEA-4 (do inglês *stage-specific embryonic antigen 4*) e TRA1-60 (do inglês *Human embryonal carcinoma marker antigen*).

Em todas as amostras analisadas (cirrose- n=3; doença de Chagas – n=3, cirrose hepática – n=3 e saudáveis – n=3), o núcleo das células foi marcado por DAPI, este é um corante que se liga fortemente ao DNA e é capaz de passar pela membrana intacta das células.

Em nosso estudo, as células apresentaram marcação positiva para vimentina (Figura 23) e negativa para SSEA-4 e TRA-1 60. (Figuras 21 e 22).

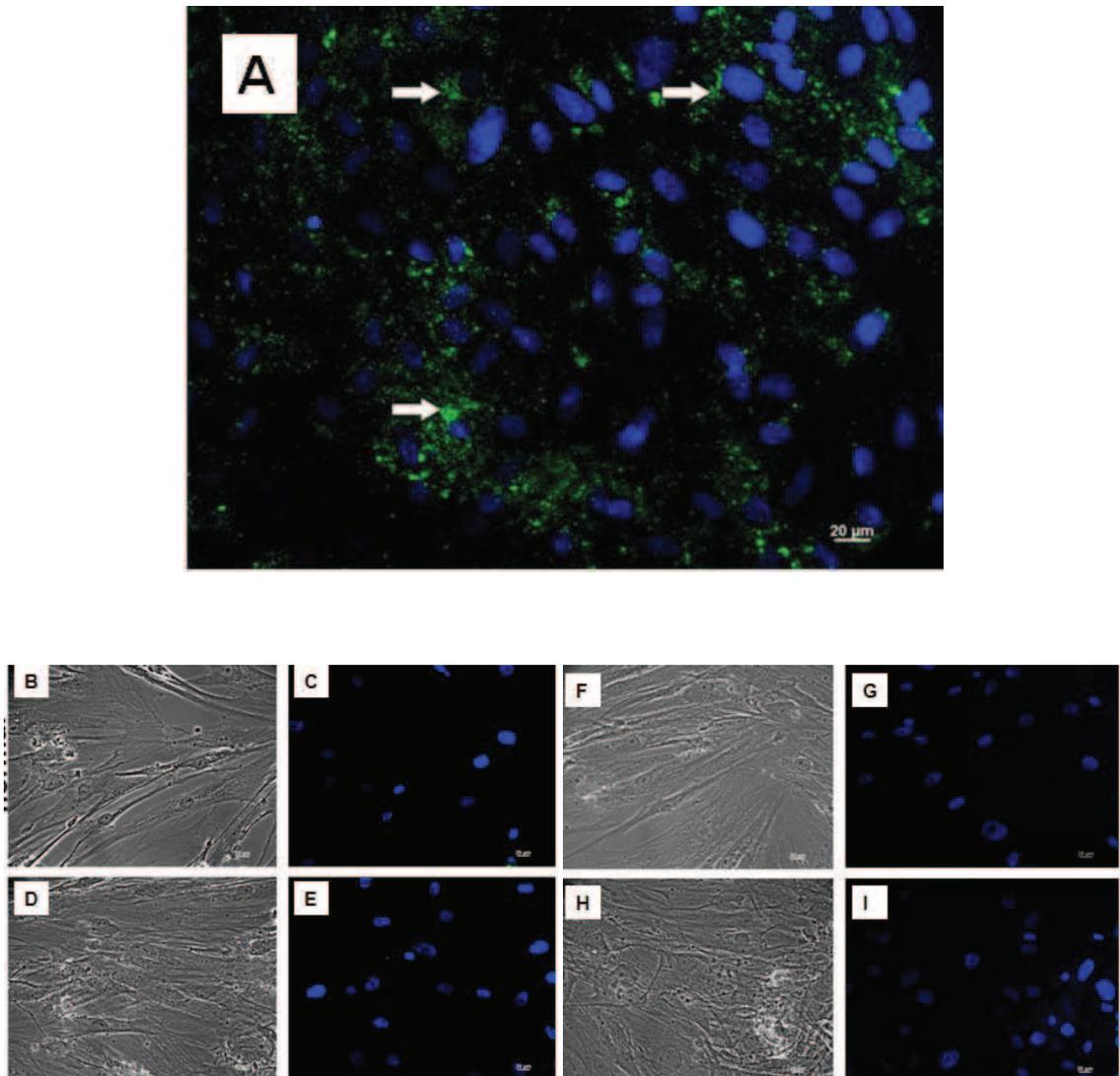


Figura 21: Imunofluorescência para SSEA-4. B, D, F, H: microscopia de campo claro. A, C, E, G, I: marcações. A: Controle positivo: Células mesenquimais derivadas de líquido amniótico em passagem3. Marcação em verde para SSEA-4 (setas brancas) e em azul para DAPI. B e C: MSC de doadores saudáveis em passagem3 (n=3). D e E: MSC de pacientes que sofreram AVC em passagem3 (n=3). F e G: MSC de pacientes com cirrose hepática em passagem3 (n=3). H e I: MSC de pacientes chagásicos em passagem3 (n=3).

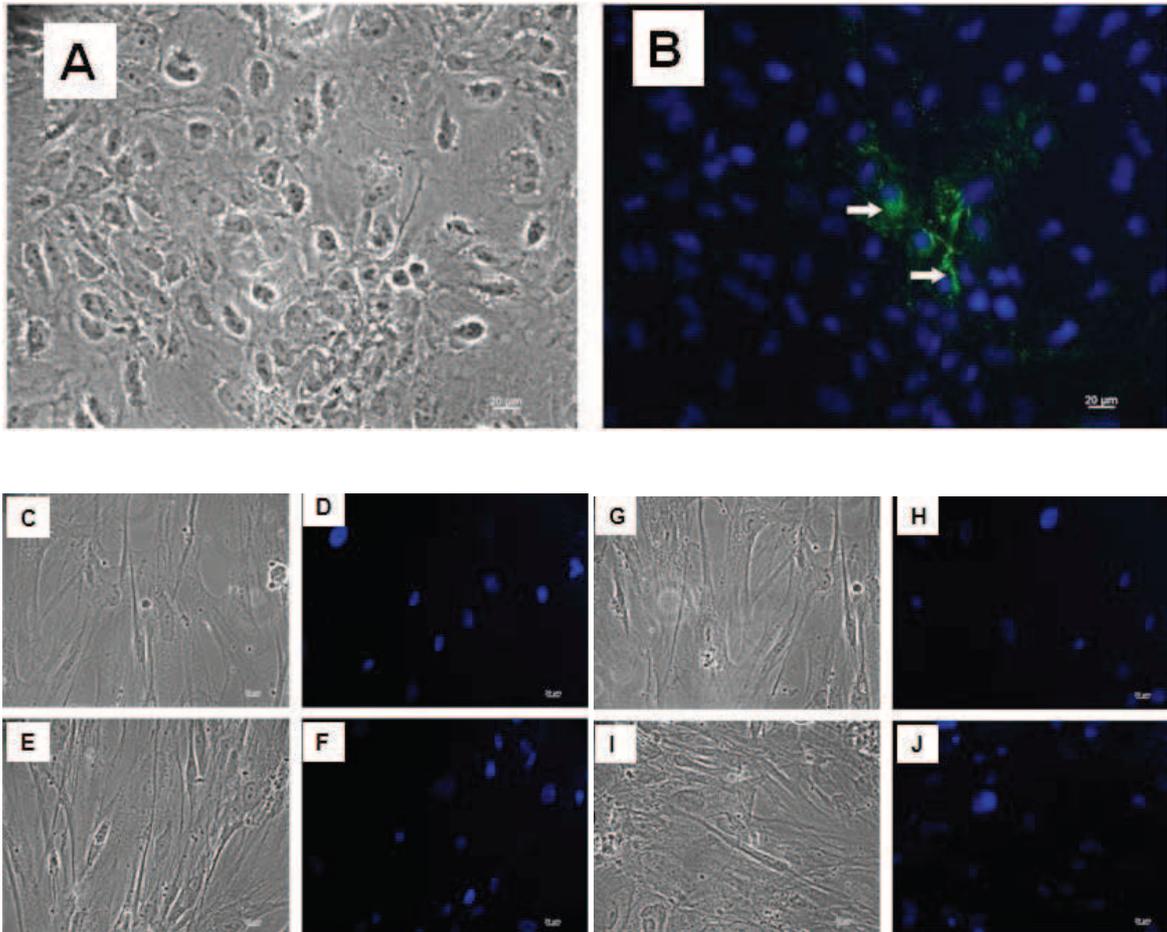


Figura 22: Imunofluorescência para TRA1-60 A,C, E, G, I: microscopia de campo claro. B, D, F, H, J: marcações. A e B: Controle positivo: Células-tronco mesenquimais derivadas de líquido amniótico em passagem3.. Marcação em verde para TRA1-60 (setas brancas) e em azul para DAPI. C e D: MSC de doadores saudáveis em passagem3 (n=3). E e F: MSC de pacientes que sofreram AVC em passagem3 (n=3). G e H: MSC de pacientes com cirrose hepática em passagem3 (n=3). I e J: MSC de pacientes chagásicos em passagem3 (n=3).

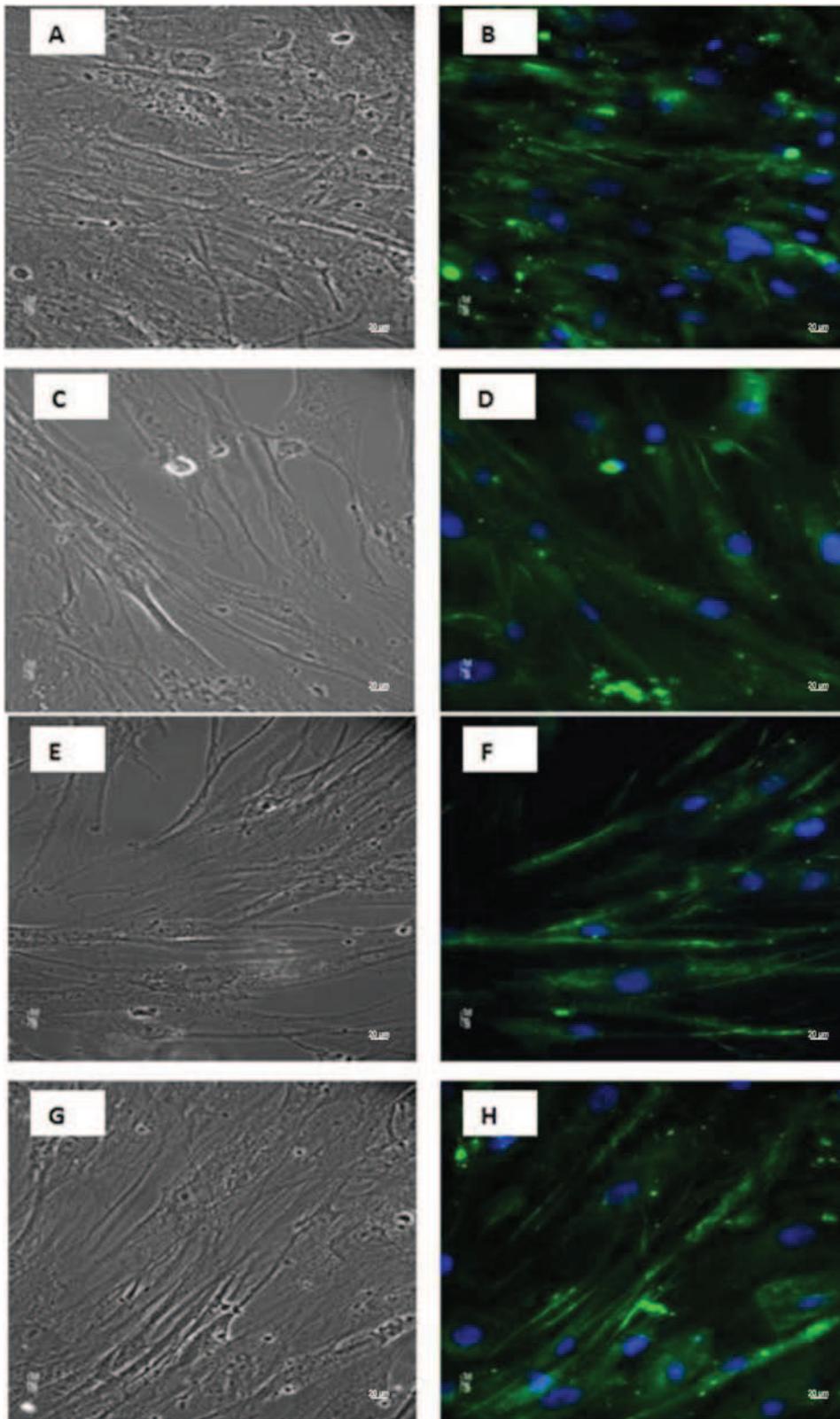


Figura 23: Imunofluorescência para vimentina. A, C, E e G: microscopia de campo claro. B, D, F e H: marcações. A: Controle positivo: MSC de doadores sadios em passagem3 (n=3). Marcação em verde para vimentina e em azul para DAPI. C e D: MSC de AVC em passagem3 (n=3). E e F: MSC de Doença de Chagas em passagem3 (n=3). G-H: MSC de Cirrose hepática em passagem3 (n=3)

5 Discussão

A fração celular mais utilizada em protocolos clínicos é a de CMMO. Talvez isto se deva a uma série de fatores que tornaram atraente o seu uso em estudos clínicos, como:

- a técnica de isolamento das CMMO estar bem estabelecida na prática clínica, uma vez que teve seu início com o transplante de medula óssea, realizado com sucesso desde a década de 70 (THOMAS, 1999)
- por serem células de fácil obtenção (crista ilíaca posterior);
- possibilitam a infusão no órgão alvo do paciente sem necessidade de cultivo e expansão *in vitro*, o que evita problemas de manutenção das células em condições GMP (do inglês – *good manufacturing practices*) o que tornaria o procedimento bastante oneroso para o sistema de saúde;
- podem ser realizadas infusões de CMMO autólogas o que minimiza o risco de rejeição imunológica, dispensando assim o uso de imunossupressores em pacientes já bem debilitados pela própria enfermidade;
- são células multipotentes que possuem uma capacidade de proliferação um pouco mais restrita que as células-tronco embrionárias, minimizando assim os riscos de formação de tumores.

Existem em andamento 49 estudos clínicos envolvendo a utilização de CMMO registrados no NIH e 22 já concluídos (NIH,2009). Ensaio em modelos animais apresentaram resultados bastante promissores em diversas enfermidades o que motivou a comunidade científica a avaliá-los também em ensaios clínicos.

Vale ressaltar que alguns estudos em terapia celular que utilizaram CMMO já apresentam resultados animadores em cardiopatias isquêmicas, insuficiência arterial

periférica, AVC, lesão de medula espinhal e hepatopatias (PERIN et al, 2003; ASSMUS et al , 2002; STAMM et al, 2003; MENDONÇA et al, 2006; TERAÍ et al, 2006).

A qual ou a quais células poderíamos atribuir tais resultados? Para que possamos responder a esta pergunta-chave que nos levará ao momento de determinarmos qual tipo celular é mais adequado para tratar determinada doença precisaremos responder antes muitas outras perguntas. A primeira delas seria: quais são os tipos celulares presentes nesta fração celular injetada? Será que as células-tronco presentes na fração de CMMO derivadas de pacientes que sofrem de doenças não hematológicas possuem capacidade funcional semelhante às células-tronco presentes na medula óssea de doadores saudáveis?

Inspirados por esta proposta, nosso estudo objetivou estudar as CMMO de pacientes submetidos à terapia celular que apresentavam acidente vascular cerebral isquêmico, cardiopatia chagásica e cirrose hepática comparando-as com CMMO derivadas de doadores saudáveis.

O processo de isolamento de CMMO demonstrou ser um processo seguro, exeqüível e de fácil reprodutibilidade. Após o processamento por Ficoll-Plus o anel resultante deste procedimento enriquecido em CMMO foi analisado. Foram isoladas $73.54 \pm 8.80\%$ de CMMO corroborando com os dados de outros estudos também bem sucedidos que utilizaram a mesma técnica de isolamento. (VILAS-BOAS et al, 2006; VILAS-BOAS et al, 2004; MENDONÇA et al, 2006).

O número e o percentual de CMMO obtidas após o processo de isolamento em pacientes acometidos pelas 3 enfermidades abordadas neste estudo quando comparados aos valores obtidos em doadores saudáveis não apresentaram

significância estatística (Figuras 9 e 10), o que nos permitiu analisar cada população celular presente nestas amostras em dados percentuais.

A partir da análise multiparamétrica realizada por citometria de fluxo, conseguimos identificar populações celulares presentes na fração enriquecida em CMMO que se encontram compiladas na Tabela 4. Encontramos diversos tipos celulares como neutrófilos, monócitos, linfócitos T (e seus subtipos T helper e T citotóxico), B, células *natural killer* (NK), eritroblastos, MSC e HSC. Sabemos da existência de outros precursores na medula, porém nosso painel de anticorpos não nos possibilita identificá-los com exatidão. Por isso optamos por alocá-los em um único grupo denominado HSC, apesar de conhecermos a heterogeneidade do mesmo. Ficamos confortáveis em realizar este agrupamento de precursores analisando-o como um bloco único já que os trabalhos apresentados na literatura sobre estudo de células de medula óssea em terapia celular também o fazem (DIMMELER et al, 2007; CHAMBERS & GOODELL, 2007), permitindo deste modo a comparação entre nosso estudo e dados da literatura.

Em nosso estudo, as análises obtidas por citometria de fluxo denotam perfis fenotípicos semelhantes nas amostras de doença de Chagas, cirrose hepática, AVC e de doadores saudáveis (Figura 12 e Tabela 5).

Os percentuais de monócitos, linfócitos B, NK e eritroblastos não apresentaram diferenças significativas quando os comparamos entre pacientes e doadores sadios (Figura 12). O mesmo não ocorre para a população de linfócitos T, onde as CMMO de pacientes cirróticos encontram-se diminuídas significativamente em relação ao grupo normal ($P < 0.01$).

A infecção crônica por HCV caracteriza-se por apresentar uma fraca resposta mediada por células T. Este fato pode ser atribuído a uma exaustão das células T

provocada por uma alta carga viral contínua. Assim, a diminuição no percentual de linfócitos T observada em nossos experimentos em pacientes cirróticos talvez possa ser atribuída a uma característica específica da doença (MYRMEL et al, 2009).

Também não foram observadas diferenças percentuais significativas entre os pacientes e doadores sadios em relação às células-tronco/ precursoras avaliadas (MSC e HSC) conforme demonstrado nas Figura 12. Estes dados corroboram com dados da literatura onde também não foram observadas diferenças quantitativas destas células entre células provenientes de pacientes com infarto crônico e doadores normais (DIMMELER et al, 2004).

O processo de isolamento de CMMO por Ficoll-Plus é um processo onde enriquecemos a fração celular obtida em CMMO, o que não significa que esta fração esteja isenta de outros tipos celulares. Assim, em nosso estudo, tivemos o cuidado de também identificar e quantificar possíveis polimorfonucleares, contaminantes do nosso processo de isolamento. Como comparamos os percentuais dos diversos tipos celulares encontrados nas CMMO provenientes de pacientes e doadores saudáveis, consideramos necessário verificar se os níveis de contaminação por polimorfonucleares (neutrófilos, em nosso estudo) eram equivalentes. Sendo assim, julgamos ser este passo importante para realizarmos uma comparação real entre as diferentes amostras. Não observamos diferenças significativas entre o percentual de neutrófilos encontrado nas amostras analisadas, validando nosso estudo percentual comparativo dos outros tipos celulares.

Como ainda não sabemos se existe um tipo ou fração celular mais apropriada para tratar cada enfermidade, outros tipos celulares (como células-tronco residentes nos tecidos adultos, células-tronco mesenquimais, células progenitoras endoteliais) também estão sendo utilizados em protocolos clínicos (NIH,2009). Pensando já

nesta proposta futura de terapia celular e buscando esclarecer qual o papel benéfico às MSC injetadas nos pacientes do estudo podem exercer de continuidade aos nossos estudos com este tipo celular *in vitro*.

As células cultivadas *in vitro* apresentaram aderência à placa de cultura e não apresentaram alterações morfológicas entre células de diferentes doenças e doadores saudáveis, como observado na Figura 13, atendendo ao primeiro critério de classificação de MSC publicado pela Sociedade Internacional de Terapia Celular (SITC) (HORWITZ et al, 2005).

Seguindo as determinações da SITC, que propõe critérios para determinação da presença de células-tronco mesenquimais de células humanas derivadas de medula óssea, realizamos a identificação imunofenotípica das células cultivadas *in vitro*. As células cultivadas apresentaram o perfil fenotípico CD34-, CD45-, CD73+, CD90+, CD105+, (Tabela 6 e Figuras 14 e 15) em concordância com os dados publicados por esta Sociedade (HORWITZ et al, 2005). Não observamos significância estatística quando comparamos o percentual de expressão das proteínas descritas acima entre MSC derivadas dos pacientes em relação às aquelas provenientes de doadores saudáveis (Figura 16).

Uma vez que conseguimos identificar a presença de MSC na fração enriquecida em CMMO, conseguimos cultivá-las e expandí-las *in vitro* mantendo suas características imunofenotípicas nos deparamos com outra pergunta. Será que as MSC cultivadas *in vitro* estão funcionalmente ativas? Será que existem diferenças entre a capacidade funcional de MSC derivadas de pacientes e doadores normais?

Buscando estas respostas tratamos as células com meios de indução de diferenciação osteogênico e adipogênico. Após o tratamento observamos que todas as MSC tratadas, independente da origem, apresentaram depósitos de cálcio em

seu citoplasma quando induzidas com meio de diferenciação osteogênico, assim como o fazem os osteócitos. Quando tratadas com meio de indução adipogênico, as células apresentaram vacúolos lipídicos em seu citoplasma, assim como o observado em adipócitos. (Figura 17) Estes dados sugerem que as MSC mantidas em cultivo mantêm sua capacidade de diferenciação quando estimuladas. Porém, como nossos dados são qualitativos não podemos sugerir se há alteração deste potencial de diferenciação induzida em MSC de pacientes em relação às células de doadores normais. Esses dados só permitem inferir que o potencial de diferenciação em cultura é mantido sob nossas condições de cultivo, mais uma vez nossos dados encontram-se em consonância com os dados da SITC (HORWITZ et al, 2005).

Um método para avaliar quantitativamente o percentual de diferenciação das mesenquimais cultivadas sob meio de indução adipogênico e osteogênico, seria por RT-PCR para genes específicos destes tipos celulares. Este ensaio não foi realizado neste estudo.

Ainda analisando a resposta funcional das MSC em cultura em resposta à estímulos específicos também foram realizados ensaios com formação de colônias de fibroblastos (CFU-F). A SITC sugere que este ensaio seja realizado para estimar a capacidade funcional das MSC uma vez que esta população pode apresentar-se funcionalmente muito heterogênea (DOMINICI et al, 2006). Uma alta eficiência na formação de colônias está correlacionada com a alta capacidade de expansão das MSC (MEULEMAN et al, 2006). Na Figura 18 observamos colônias coradas com Giensa. Como observado na Figura 19 , todas as amostras analisadas geraram colônias de CFU-F o que sugere a presença de MSC nas amostras, com conseqüente potencial gerador de colônias de fibroblastos.

Quando comparamos o número de colônias de CFU-F formadas por células derivadas dos pacientes das 3 enfermidades do estudo não encontramos significância estatística. Porém, quando confrontamos tais dados com dados de doadores normais obtidos da literatura (DIMMELER et al, 2004), observamos que a capacidade de gerar colônias de fibroblastos das MSC derivadas de pacientes das 3 enfermidades estudadas encontra-se significativamente diminuída (Figura 19).

Dimmeler e colaboradores observaram o mesmo efeito em células de pacientes com infarto crônico. O grupo demonstrou que as células dos pacientes infartados crônicos apresentavam uma capacidade de formar colônias diminuída em relação aos doadores saudáveis. Observaram ainda que a capacidade de neovascularização das células de pacientes infartados estava também comprometida. Para isso realizaram injeções de CMMO em modelo de isquemia de pata em murinos, de forma que os animais receberam na pata direita CMMO de doadores saudáveis e na esquerda CMMO de pacientes infartados crônicos. O percentual de novos vasos formados com incorporação das CMMO foi significativamente maior na pata que recebeu CMMO de doadores saudáveis em detrimento daquela que recebeu CMMO dos pacientes infartados (DIMMELER et al, 2004).

Pouco sabemos ainda sobre a influência da doença na capacidade de migração e integração das células injetadas em resposta às complexas interações que ocorrem entre as células e o tecido/órgão lesado. Alterações neste microambiente podem reduzir a capacidade das células transplantadas em contribuir com o reparo funcional do tecido-alvo. Alguns estudos sugerem que determinadas doenças podem comprometer a sinalização que envolve a migração celular das células transplantadas prejudicando a resposta clínica (TERPER et al, 2002).

Outro fator que interfere na capacidade funcional das células progenitoras de medula óssea é a idade. A primeira evidência de que a idade afeta diretamente a neovascularização mediada por células, por exemplo, foi demonstrada por Edelberg e colaboradores. Este grupo demonstrou que células de medula óssea de ratos jovens eram capazes de se incorporar a novos vasos e restaurar a função cardíaca angiogênica ao contrário da medula de ratos idosos (EDELBERG et al, 2002). Assim, corroborando com dados da literatura (BELLANTUONO et al, 2007; CHAMBERS et al, 2007), nossos dados sugerem uma correlação negativa entre idade e potencial de gerar colônias de fibroblastos conforme apresentado na Figura 20.

Vimos que as MSC derivadas de pacientes têm sua capacidade funcional de gerar unidades formadoras de colônias de fibroblatos comprometida. Diante desse dado nos perguntamos se as doenças poderiam alterar também a expressão de proteínas tecido-específicas. Para responder essa pergunta, avaliamos por ensaios de imunofluorescência se as MSC em cultura apresentavam duas proteínas conhecidas como proteínas de pluripotência presentes em células-tronco embrionárias, SSEA-4 e TRA1-60. Esta busca foi motivada por relatos na literatura de que células-tronco mesenquimais de outras origens, como as derivadas de líquido amniótico, expressam tais proteínas (YOU et al,2007).

SSEA-3 e SSEA-4 são proteínas sintetizadas durante a oogênese e estão presentes no oócito, zigoto e nos estágios recentes de clivagem das membranas embrionárias. Células-tronco embrionárias humanas expressam SSEA-3 e SSEA-4 e a diferenciação é acompanhada de uma regulação positiva de SSEA-1 e regulação negativa de SSEA-3 e SSEA-4. Desta forma, anticorpos monoclonais anti-SSEAs são utilizados como macadores de diferenciação de células-tronco humanas. TRA-1-

60 é expresso na superfície de células-tronco de teratocarcinomas, células-tronco embrionárias humanas e células embrionárias germinativas (YOU et al,2007)..

Conforme demonstrado nas Figuras 21 e 22, as MSC, sejam elas provenientes de doadores saudáveis ou de pacientes, não expressam TRA1-60 e SSEA-4 corroborando com dados da literatura de que as MSC de medula óssea são células multipotentes (WAGERS et al, 2002) e que as 3 doenças deste estudo não induzem a expressão destas proteínas.

Além de anticorpos para células indiferenciadas realizamos também ensaios de imunofluorescência para a vimentina A vimentina é expressa, embora não exclusivamente, em células de origem mesenquimal (MIDDLETON et al,2007). Seus filamentos estão associados às membranas nuclear e plasmática mantendo a posição do núcleo e do fuso mitótico durante a vida da célula.

A presença da vimentina em todas as MSC sugere que as células dos pacientes não apresentam diferenças em relação à de doadores sãos. Este dado sugere que a expressão de vimentina, constitutiva de células mesenquimais, não é alterada qualitativamente pelas 3 doenças estudadas.(Figura 23)

O comprometimento da função celular na doença e no envelhecimento exige o desenvolvimento de estratégias para superar tais limitações. A comunidade científica já desenvolve algumas pesquisas no intuito de superar estas barreiras. Para tal, dirige seu trabalho para três tendências diferentes: transplante heterólogo, pré-tratamento do órgão-alvo e pré-tratamento das células dos pacientes.

O uso de CMMO heterólogas derivadas de doadores saudáveis pode ser uma opção para compensar a redução nas funções celulares. No entanto, essa estratégia também engloba certos riscos adicionais. Se as células heterólogas se diferenciarem funcionalmente em células do órgão lesado, podem provocar ativação da resposta

imune ou até mesmo rejeição das células significando um alto risco para os pacientes tratados desta forma.

O pré-tratamento das próprias células dos pacientes para reativar suas funções ou direcionar sua diferenciação pode ser uma alternativa para melhorar a eficiência da terapia celular nos doentes crônicos (MURASAWA et al, 2002; MANGI et al, 2003). Adicionalmente, pode ser considerado o tratamento do tecido-alvo a fim de fornecer as citocinas e fatores quimioatrativos para estimular a incorporação das células transplantadas ou para reativar reparo endógeno (SASAKI et al, 2006).

Outra alternativa interessante consiste no transplante heterólogo de MSC derivadas de doadores saudáveis. Visto a importância crescente que as células-tronco mesenquimais derivadas de diferentes origens (Figura 4) representam nos ensaios clínicos registrados no NIH, o seu possível potencial imunomodulatório e a trabalhos pioneiros que já realizaram o transplante heterólogo deste tipo celular sem relatos de imunorejeição, a infusão de MSC de origem heteróloga torna-se uma alternativa terapêutica promissora e exequível em curto prazo.

Resumidamente, acreditamos que as CMMO, utilizadas nos protocolos clínicos avaliados, apesar de possuírem igual representação dos tipos celulares enriquecidos no procedimento de isolamento do que à encontrada em doadores sãos, sugerem apresentar um comprometimento funcional. Assim, para driblarmos os prejuízos causados as CMMO dos pacientes acometidos por tais doenças uma ou a combinação de algumas das estratégias descritas devem ser utilizadas para ensaios futuros.

6 Conclusão

- Nas frações de CMMO isoladas de pacientes com cirrose hepática, AVC isquêmico, cardiomiopatia chagásica e doadores saudáveis, não foram observadas diferenças percentuais significativas entre os tipos celulares encontrados.
- Nossos dados sugerem um comprometimento da capacidade funcional das MSC provenientes de pacientes acometidos pelas três doenças do estudo.
- Nossos dados sugerem uma correlação negativa entre idade e formação de colônias de fibroblastos.
- As células mesnquimais de medula ósea quando submetidas as condições de cultivo deste estudo não apresentam as proteínas de pluripotência TRA1-60 e SSEA-4.
- Nossos dados sugerem que o comprometimento da função celular - envolvendo idade dos pacientes e as doenças deste estudo - demandam novas estratégias para que estas células possam ser utilizadas com maior eficácia em novos protocolos clínicos.

Bibliografia

AGGARWAL, S. AND M. F. PITTENGER. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. **Blood** 105(4): 1815-22. 2005.

AL-KHALDI, A., N. ELIOPOULOS, et al. Postnatal bone marrow stromal cells elicit a potent VEGF-dependent neoangiogenic response in vivo. **Gene Ther** 10(8): 621-9. 2003.

ALVAREZ-DOLADO, M., R. PARDAL, et al. Fusion of bone-marrow-derived cells with Purkinje neurons, cardiomyocytes and hepatocytes. **Nature** 425(6961): 968-73. 2003.

ANDRE, C. Epidemiologia e fatores de risco. **Manual de AVC**. 2ª ed, Revinter. 2006.

ASAHARA, T., C. KALKA, et al. Stem cell therapy and gene transfer for regeneration. **Gene Ther** 7(6): 451-7. 2000.

ASSMUS, B., V. SCHACHINGER, et al. Transplantation of Progenitor Cells and Regeneration Enhancement in Acute Myocardial Infarction (TOPCARE-AMI). **Circulation** 106(24): 3009-17. 2002.

BELLANTUONO, I.; KEITH, W.N. Stem cell ageing: does it happen and can we intervene? **Expert Rev. Mol. Med.** 9:1-20. 2007.

BJORNSON, C. R., R. L. RIETZE, et al. Turning brain into blood: a hematopoietic fate adopted by adult neural stem cells in vivo. **Science** 283(5401): 534-7. 1999.

BRENER, Z. A., BARRAL-NETO, M. **Trypanosoma cruzi e doença de Chagas**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2000.

CHAMBERS, S.M.; GOODELL, M.A. Hematopoietic stem cell aging: wrinkles in stem cell potential. **Stem Cell Rev.** 3:201-211. 2007.

CHEN, X., M. A. ARMSTRONG, et al. Mesenchymal stem cells in immunoregulation. **Immunol Cell Biol** 84(5): 413-21. 2006.

CHOPP, M. and Y. LI. Treatment of neural injury with marrow stromal cells. **Lancet Neurol** 1(2): 92-100. 2002.

CUBILLOS-GARZON, L. A., J. P. CASAS, et al. Congestive heart failure in Latin America: the next epidemic. **Am Heart J** 147(3): 412-7. 2004.

DEANS, R. J. AND MOSELEY, A.B. Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses. **Exp Hematol** 28(8): 875-84. 2000.

DI NICOLA, M., C. CARLO-STELLA, et al. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. **Blood** 99(10): 3838-43. 2000.

DIAS, J. C., A. C. SILVEIRA, et al. The impact of Chagas disease control in Latin America: a review. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 97(5): 603-12. 2002.

DIMMELER, S & LERI, A. Aging and disease as modifiers of efficacy of cell therapy. *Circulation* 102: 1319-1330. 2008.

DIMMELER, S et al. Cell isolation procedures matter: a comparison of different isolation protocols of bone marrow mononuclear cells used for cell therapy in patients with acute myocardial infarction. **European Heart Journal** 28: 766-772. 2004.

DOMINICI, M., K. LE BLANC, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy** 8(4): 315-7. 2006.

EDELBERG, J.M.; TANG, L. Et al. Young adult bone marrow derived endothelial precursor cells restore aging-impaired cardiac angiogenic function. **Circ Res.** 90:e89-e93. 2002.

EVANS, M. J.; KAUFMAN, M. H. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. **Nature** 292 (5819), 154-156;1981.

FRIEDENSTEIN, A. J., J. F. GORSKAJA, et al. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. **Exp Hematol** 4(5): 267-74. 1976.

FRIEDMAN, S.L.; SCHIANO, T.D. **Cirrhosis and Its Sequelae** in GOLDMAN, L.; AUSIELLO, D. Cecil Textbook of Medicine. Saunders 2004, 22th edition, pp. 936 – 944.

- HORWITZ, E. M., K. LE BLANC, et al. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy** 7(5): 393-5. 2005.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). População/ Estimativas e taxas 1980-2050. 2000. Disponível em <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/pesquisas> Acesso realizado em 15 de maio de 2009.
- JIANG, X. X., Y. ZHANG, et al. Human mesenchymal stem cells inhibit differentiation and function of monocyte-derived dendritic cells. **Blood** 105(10): 4120-6. 2005.
- JIANG, Y., B. N. JAHAGIRDAR, et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. **Nature** 418(6893): 41-9. 2002.
- JOHNSON, A., L. RAFF, et al. Development of Multicellular Organisms. **Molecular Biology of the Cell**. 4th ed., Artmed. 2004.
- JOHNSON, A., L. RAFF, et al. Histology: The Lives and Deaths of Cells in Tissues. **Molecular Biology of the Cell**. 4th ed, Artmed. 2004.
- JUNQUEIRA, L.C., CARNEIRO, J.. **Histologia Básica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 9^a edição, pp 206-220, 1999.
- KRAMPERA, M., S. GLENNIE, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells inhibit the response of naive and memory antigen-specific T cells to their cognate peptide. **Blood** 101(9): 3722-9. 2003.
- LE BLANC, K., C. TAMMIK, et al. HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells. **Exp Hematol** 31(10): 890-6. 2003.
- LEBLOND, C.P. Classification of cell populations on the basis of their proliferative behavior. **Natl Cancer Inst Monogr** 14, 119-150; 1964.
- MANGI AA, NOISEUX N, KONG D, HE HE, REZVANI M, ING WALL JS, DZAU VJ. Mesenchymal stem cells modified with Akt prevent remodeling and restore performance of infarcted hearts. **Nat Med**. 9: 1195-1201. 2003.

- MARTIN, G.R. Isolation of pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. **Proc Natl Acad Sci USA** 78 (12), 7634-7638; 1981.
- MENDONCA, M. L., G. R. FREITAS, et al. Safety of intra-arterial autologous bone marrow mononuclear cell transplantation for acute ischemic stroke]. **Arq Bras Cardiol** 86(1): 52-5. 2006.
- MESQUITA ET, BOCCHI EA, VILAS-BOAS F, BATLOUNI M. Revisão das II Diretrizes da Sociedade Brasileira de Cardiologia para o Diagnóstico e Tratamento da Insuficiência Cardíaca. **Arq Bras Cardiol** 79: S-IV. 2002.
- MEULEMAN, N., T. TONDREAU, et al. Human marrow mesenchymal stem cell culture: serum-free medium allows better expansion than classical alpha-MEM medium. **Eur J Haematol** 76(4): 309-16. 2006.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Morbidade Hospitalar do SUS – Por Local de Internação – Brasil. **Sistema Único de Saúde** 2009. Disponível em <http://www.datasus.gov.br> Acesso realizado em 23 de junho de 2009.
- MULLER, I., S. KORDOWICH, et al. Animal serum-free culture conditions for isolation and expansion of multipotent mesenchymal stromal cells from human BM. **Cytotherapy** 8(5): 437-44. 2006.
- MURASAWA S, LLEAVADOT J, SILVER M, ISNER JM, LOSORDO DW, ASAHARA T. Constitutive human telomerase reverse transcriptase expression enhances regenerative properties of endothelial progenitor cells. **Circulation**. 106: 1133-1139. 2002.
- MYRMEL, H; ULVESTAD, E.; ASJO, B. The hepatitis C virus enigma. **APMIS** 117: 427-39. 2009.
- NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH. Disponível em www.nih.gov. Acesso realizado em 15 de maio de 2009. NIH 2009
- PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION (PAHO). Chronic Disease Prevention & Control in the Americas. 2007. Disponível em <http://www.paho.org>. Acesso realizado em 16 de maio de 2009.

PERIN, E. C., H. F. DOHMANN, et al. Transendocardial, autologous bone marrow cell transplantation for severe, chronic ischemic heart failure. **Circulation** 107(18): 2294-302. 2003.

PITTENGER, M. F., A. M. MACKAY, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. **Science** 284(5411): 143-7. 1999

ROBERTSON, J.A. Human embryonic stem cell research:ethical and legal issues. **Nat Rev Genet** 2 (1), 74-78;2001.

ROJKIND, M. AND P. GREENWEL. Pathophysiology of Liver Fibrosis **The Liver Biology and Pathobiology**. L. W. Wilkins: 721 - 738. 2001.

SASAKI K, HEESCHEN C, AICHER A, ZIEBART T, HONOLD J, URBICH C, ROSSING L, KOEHL U, KOYANAGI M, MOHAMED A, BRANDES RP, MARTIN H, ZEIHNER AM, DIMMELER S. Ex vivo pretreatment of bone marrow mononuclear cells with endothelial NO synthase enhancer AVE948 enhances their functional activity for cell therapy. **Proc Natl Acad Sci USA**. 103: 14537-14541. 2006.

SHORT, B., N. BROUARD, et al. Mesenchymal stem cells. **Arch Med Res** 34(6): 565-71. 2003.

STAMM, C., B. WESTPHAL, et al. Autologous bone-marrow stem-cell transplantation for myocardial regeneration. **Lancet** 361(9351): 45-6. 2003.

TEIXEIRA, A. R., G. TEIXEIRA, et al. Acquired cell-mediated immunodepression in acute Chagas' disease. **J Clin Invest** 62(6): 1132-41. 1978.

TEIXEIRA, A. R., M. L. TEIXEIRA, et al. The immunology of experimental Chagas' disease. IV. Production of lesions in rabbits similar to those of chronic Chagas' disease in man. **Am J Pathol** 80(1): 163-80. 1975.

TEIXEIRA, A. R., R. J. NASCIMENTO, et al. Evolution and pathology in chagas disease--a review. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 101(5): 463-91. 2006.

TERAI, S., T. ISHIKAWA, et al. Improved liver function in patients with liver cirrhosis after autologous bone marrow cell infusion therapy. **Stem Cells** 24(10): 2292-8. 2006.

TERPER, O.M.; GALIANO, R.D. et al. Human endotelial progenitor cells from type II diabetics exhibit impaired proliferation, adhesion, and incorporation into vascular structures. **Circulation**. 106:2781-2786. 2002.

THOMAS, E. D. Bone marrow transplantation: a historical review. **Seminars in Hematology**, vol.36, n.4,suppl 7,pp 95-103.1999.

THOMSON, J. A., J. ITSKOVITZ-ELDOR, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. **Science** 282(5391): 1145-7. 1998.

VILAS-BOAS, F., G. S. FEITOSA, et al. [Early results of bone marrow cell transplantation to the myocardium of patients with heart failure due to Chagas disease]. **Arq Bras Cardiol** 87(2): 159-66. 2006.

VILAS-BOAS, F., G. S. FEITOSA, et al. Bone marrow cell transplantation to the myocardium of a patient with heart failure due to Chagas' disease. **Arq Bras Cardiol** 82(2): 185-7, 181-4. 2004.

WAGERS, A. J., R. I. SHERWOOD, et al. Little evidence for developmental plasticity of adult hematopoietic stem cells. **Science** 297(5590): 2256-9. 2002.

WANG, G., B. A. BUNNELL, et al. Adult stem cells from bone marrow stroma differentiate into airway epithelial cells: potential therapy for cystic fibrosis. **Proc Natl Acad Sci U S A** 102(1): 186-91. 2005.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases: report of a joint WHO/FAO expert consultation. 2002. Disponível em <http://www.who.int> Acesso realizado em 5 de dezembro de 2008.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Facts Related to chronic diseases. 2005. Disponível em <http://www.who.int> Acesso realizado em 15 de maio de 2009.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Global Report. Preventing chronic diseases: a vital investment. 2005. Disponível em <http://www.who.int> Acesso realizado em 15 de maio de 2009.

YOU,J. KIM,J. et al. Human amniotic fluid-derived stem cells have characteristics of multipotent stem cells. **Cell Prolif** 40:75-90.2007.

Anexo I- Principais características das Moléculas CD

CD	Sinônimos comuns	Estrutura molecular, Família	Reatividade	Funções conhecidas ou propostas
CD3	T3; Leu-4	20-28kD; associação das cadeias γ , δ , ϵ no complexo TCR; Superfamília Ig; ITAM na cauda citoplasmática	Linfócitos T, tímocitos	Expressão na superfície celular e transdução de sinal pelo receptor antigênico dos linfócitos T
CD4	T4; Leu-3; L3T4	55kD; superfamília Ig	Linfócitos T restritos ao MHC da classe II, subconjuntos de tímocitos, monócitos e macrófagos	Sinalização e co-receptor da adesão na ativação de linfócitos T induzida por antígeno restrita ao MHC da classe II ; desenvolvimento dos tímocitos; receptor primário para retrovírus HIV
CD8	T8; Leu-2; Lyt2	34kD; expressa como homodímero (CD8 α) ou heterodímero com CD8 β ; superfamília Ig	Linfócitos T restritos ao MHC da classe I, subconjuntos de tímocitos	Sinalização e co-receptor de adesão na ativação de linfócitos T induzida por antígeno restrito ao MHC da classe I (liga-se a moléculas da classe I do MHC); desenvolvimento de tímocitos
CD14	Mo2; receptor LPS	53kD; ligada a PI	Monócitos, macrófagos, granulócitos, forma solúvel no soro	Liga-se a complexo de LPS e proteína de ligação a LPS; necessária para ativação macrófagos induzida por LPS
CD19	B4	95kD; superfamília Ig	Maioria dos linfócitos B	Ativação de linfócitos B; forma um complexo co-receptor com CD21 e CD81, transmitindo sinais que sinergizam com os sinais do complexo do receptor antigênico dos linfócitos B
CD31	PECAM-1; GPIIa plaquetária	130-140 kD; superfamília Ig	Plaquetas, monócitos, granulócitos, linfócitos B, células endoteliais	Molécula de adesão envolvida na diapedese de leucócitos

CD	Sinônimos comuns	Estrutura molecular, Família	Reatividade	Funções conhecidas ou propostas
CD33	Sialoadesina; molécula de citoadesão dependente do ácido siálico	67kD; superfamília Ig; família das lecitinas semelhantes à Ig de ligação com o ácido siálico; ITIMs na cauda citoplasmática	Monócitos, células progenitoras mielóides	Liga-se ao ácido siálico; regulação da sinalização nas células mielóides (?)
CD34	gp 105-120	116kD; sialomucina	Precusores das células hematopoéticas, células endoteliais em vênulas endoteliais altas	Adesão e células com célula; liga-se a CD62L (L-selectina)
CD45	Antígeno comum dos leucócitos (LCA); T200; B220	Múltiplas isoformas, 180-220 kD; família dos receptores da proteína tirosina fosfatase; família da fibronectina tipo III	Células hematopoéticas	Tirosina fosfatase desempenha papel crítico na sinalização mediada pelo receptor antigênico de linfócitos T e B
CD56	Leu-19; NKH1	175-220 kD; isoforma de molécula de adesão celular neural (N-CAM); superfamília Ig	Células NK, subconjunto de linfócitos T e B, cérebro	Adesão homotípica
CD61	Subunidade β_3 da integrina; cadeia β do receptor de vitronectina; componente GPIIa da integrina GPIIb/GPIIa	110kD; ligada não covalentemente a CD51 para formar receptor de vitronectina (integrina); ligada não covalentemente a CD41 para formar GPIIb/GPIIa (integrina)	Plaquetas, megacariócitos, células endoteliais, leucócitos	Ver CD51
CD64	Fc γ RI	75 kD; superfamília Ig; associada não covalentemente à cadeia Fc γ RI comum	Monócitos, macrófagos, neutrófilos ativados	Receptor Fc γ com alta afinidade; papel na fagocitose, ADCC e ativação dos macrófagos

CD	Sinônimos comuns	Estrutura molecular, Família	Reatividade	Funções conhecidas ou propostas
CD73	Ecto-5'-nucleotidase	69-70kD; ligada a PI	Subconjuntos de linfócitos Te B, células dendríticas foliculares do centro germinativo, mesenquimal, precursor endotelial	Ecto-5'-nucleotidase; sinalização nos linfócitos T
CD90	Thy-1	25-35- Kd; ligada a PI; superfamília Ig	Timócitos, linfócitos T periféricos, (camundongos), neurônios, mesenquimal, precursor endotelial	Linfócito T; papel na ativação de linfócitos T (?)
CD105	Endogлина	Homodímero de subunidades com 90 kD	Células endoteliais, macrófagos ativados, mesenquimais e endoteliais	Liga-se a TGF- β ; modula respostas celulares a TGF- β
CD117	c-Kit, receptor do fator de células-tronco	145 kD; superfamília Ig; família dos receptores de tirosina cinase	Células-tronco e progenitoras hematopoéticas, mastócitos teciduais	Liga-se ao ligante de c-Kit e medeia seus efeitos biológicos

Adaptado de ABBAS, A.K; LICHTMAN, A.H. **Imunologia Celular e Molecular**; tradução de Claudia Reali. – Rio de Janeiro: Elsevier, 2005, 5ª edição, pp. 523-38.

Anexo II- Análise celular multiparamétrica por citometria de fluxo

Os tipos celulares presentes nas amostras de medula óssea analisadas foram identificados pela análise multiparamétrica por citometria de fluxo com auxílio do software Paint-a-Gate (BD Biosciences).

Assim, seguimos os seguintes passos para realizar a análise:

- *Identificação da população de Monócitos (Figura 24):*
 - Selecionamos as células CD45+ e excluímos o restante.
 - Dentro da população CD45+ selecionamos as células CD14+.
 - Na população CD45+CD14+ identificamos as células HLA-DR+.
 - Dentro da população CD45+CD14+HLA-DR+ selecionamos as células CD64+.
 - Na população CD45+CD14+HLA-DR +CD64+ conferimos se esta população possui as características morfológicas condizentes com a população de monócitos no histograma de morfologia (FSC X SSC).
 - Finalmente retornamos com todas as células excluídas anteriormente e verificamos o percentual relativo ao total da amostra analisada que corresponde à monócitos maduros.

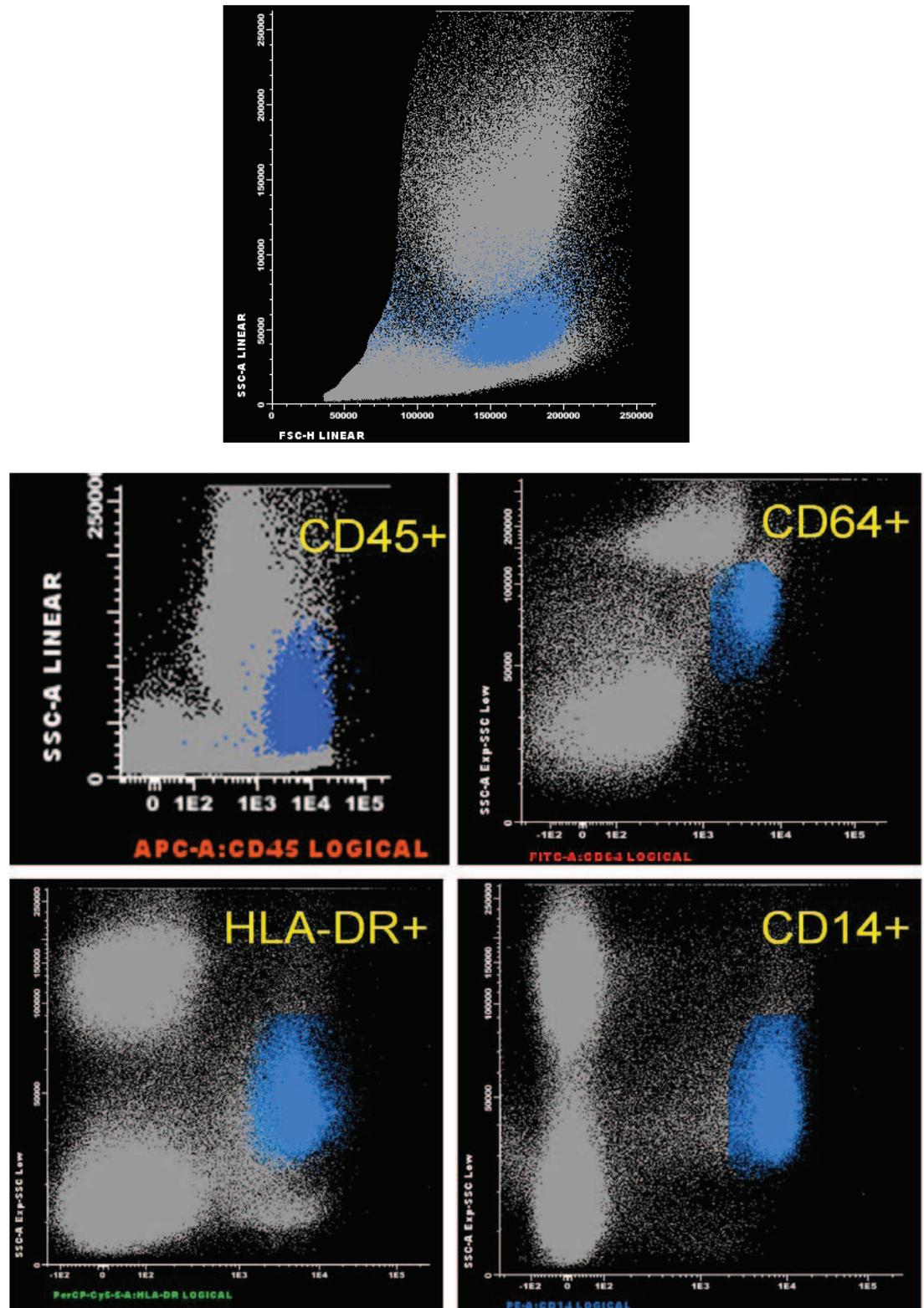


Figura 24: Histogramas de citometria de fluxo representativos da identificação da população de monócitos, destacados em azul. Perfil imunofenotípico encontrado: mononuclear, CD45+CD14+CD64+HLA-DR+

- *Identificação da população de Natural Killer (Figura 25):*
 - Seleccionamos as células CD45+ e excluimos o restante.
 - Dentro da população CD45+ seleccionamos as células CD56+.
 - Na população CD45+CD56+ conferimos se esta população possui as características morfológicas condizentes com a população de natural killer no histograma de morfologia (FSC X SSC).
 - Finalmente retornamos com todas as células excluídas anteriormente e verificamos o percentual relativo ao total da amostra analisada que corresponde a natural killer (localizam-se logo acima dos linfócitos no eixo de granulosidade SSC).

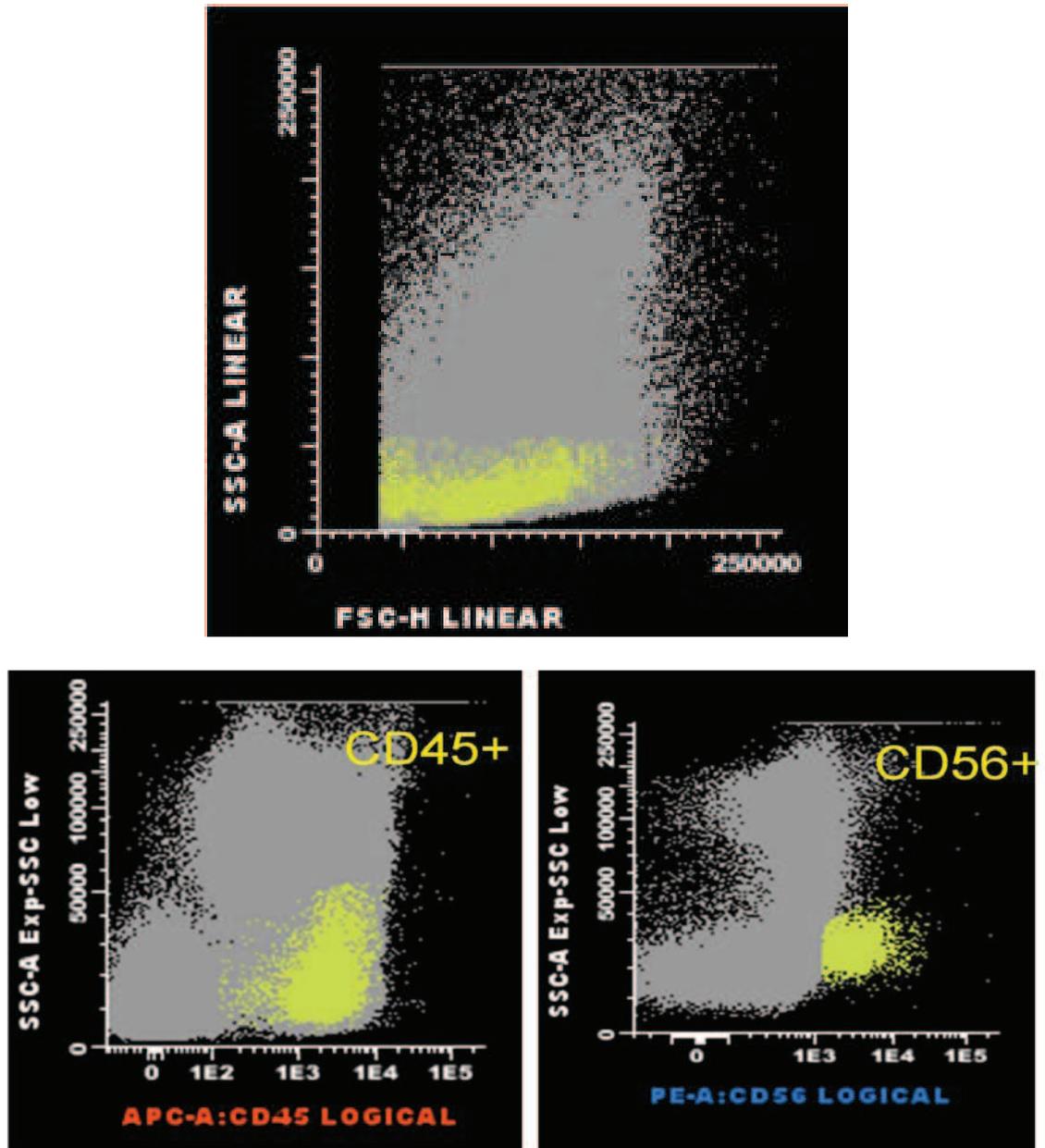


Figura 25: Histogramas de citometria de fluxo representativos da identificação da população de natural killer, destacados em verde claro. Perfil imunofenotípico encontrado: mononuclear, CD45+CD56+

- *Identificação da população de Linfócitos T (Figura 26):*
 - Selecionamos as células CD45+ e excluimos o restante.
 - Dentro da população CD45+ selecionamos as células CD3+.
 - Na população CD45+CD3+ identificamos duas subpopulações: linfócitos T helper (CD45+CD3+CD4+CD8-) e linfócitos T citotóxicos (CD45+CD3+CD8+CD4-).
 - Na população CD45+CD3+CD4 OU CD8+ conferimos se esta população possui as características morfológicas condizentes com a população de linfócitos no histograma de morfologia (FSC X SSC).
 - Finalmente retornamos com todas as células excluídas anteriormente e verificamos o percentual relativo ao total da amostra analisada que corresponde a linfócitos.

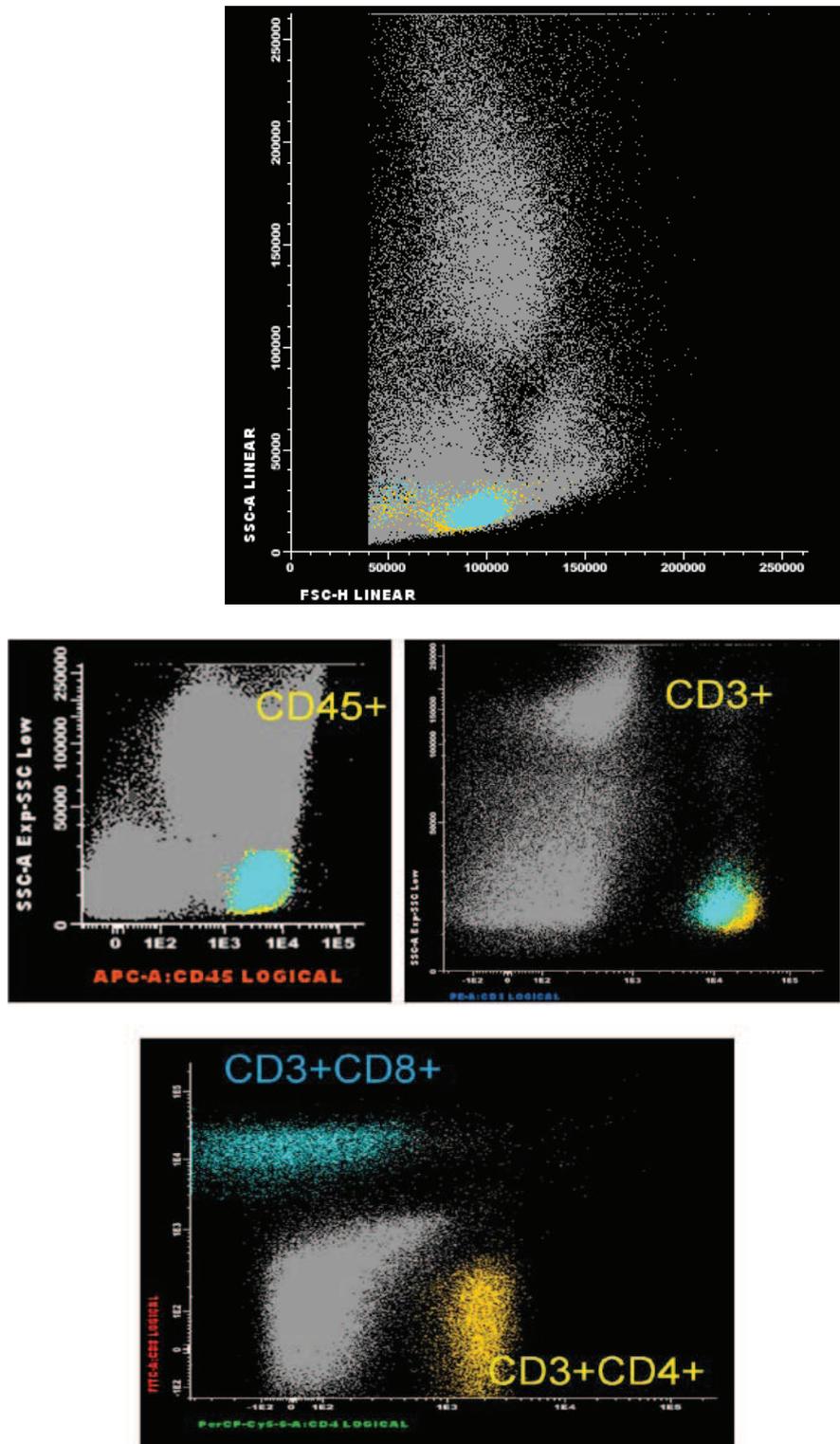


Figura 26: Histogramas de citometria de fluxo representativos da identificação da população de linfócitos T e suas sub-populações: Linfócitos T helper (CD45+CD3+CD4+) em amarelo e linfócitos T citotóxicos (CD45+, CD3+, CD8+) em azul ciano.

- *Identificação da população de Linfócitos B (Figura 27):*
 - Seleccionamos as células CD45+ e excluímos o restante.
 - Dentro da população CD45+ seleccionamos as células CD19+.
 - Na população CD45+CD19+ conferimos se esta população possui as características morfológicas condizentes com a população de linfócitos no histograma de morfologia (FSC X SSC).
 - Finalmente retornamos com todas as células excluídas anteriormente e verificamos o percentual relativo ao total da amostra analisada que corresponde a linfócitos.

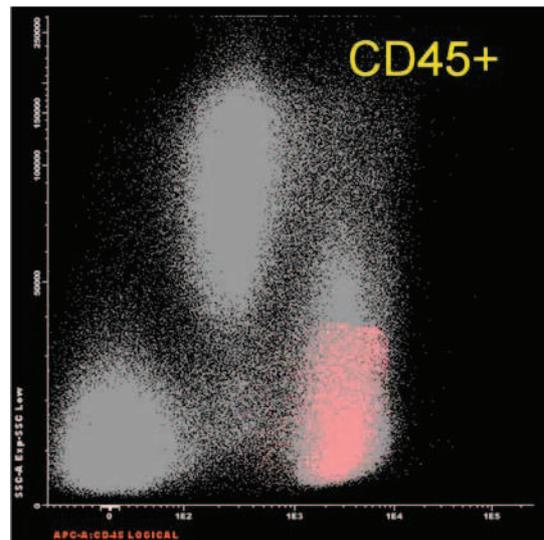
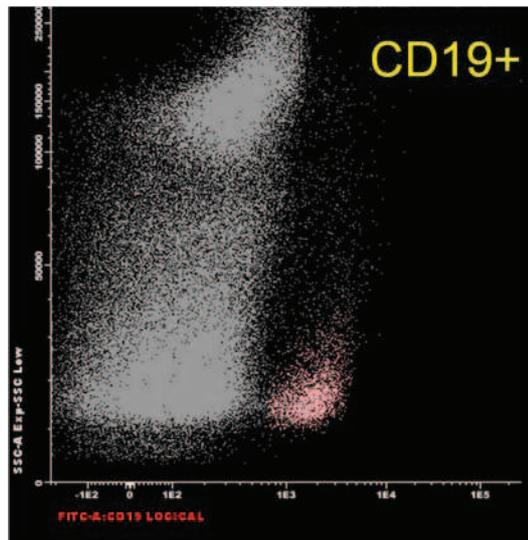
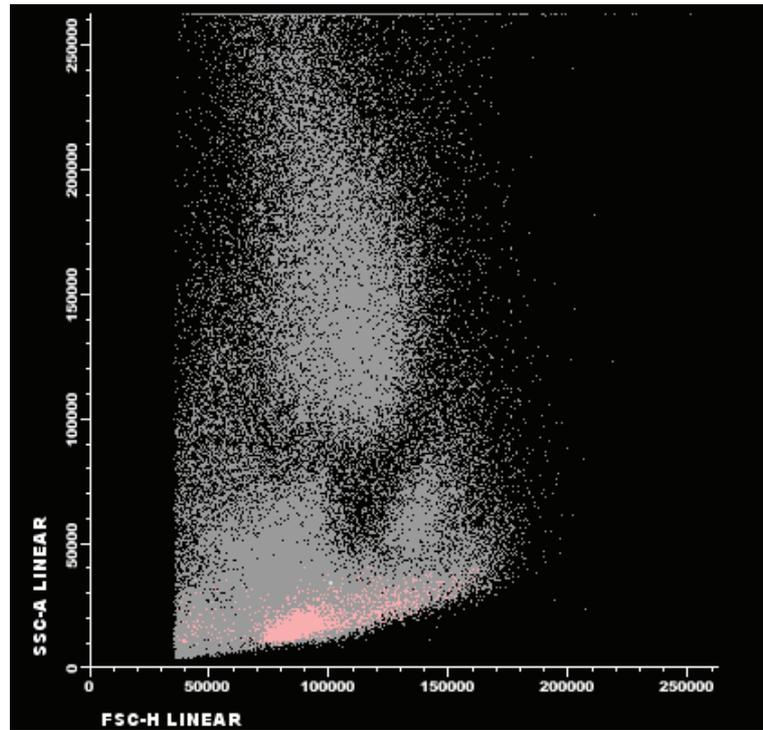


Figura 27: Histogramas de citometria de fluxo representativos da identificação da população de linfócitos B, destacada em rosa claro. Perfil imunofenotípico encontrado: mononuclear, CD45+CD19+

- *Identificação da população de Neutrófilos (Figura 28):*
 - Selecionamos as células CD45+ e excluimos o restante.
 - Dentro da população CD45+ selecionamos as células granulares (SSC).
 - Na população CD45+SSC \uparrow identificamos as células CD31+.
 - Dentro da população CD45+SSC \uparrow CD31+ selecionamos as células CD33+ e CD34-.
 - Na população CD45+SSC \uparrow CD31+CD33+CD34- conferimos se esta população possui as características morfológicas condizentes com a população de neutrófilos no histograma de morfologia (FSC X SSC).
 - Finalmente retornamos com todas as células excluídas anteriormente e verificamos o percentual relativo ao total da amostra analisada que corresponde neutrófilos.

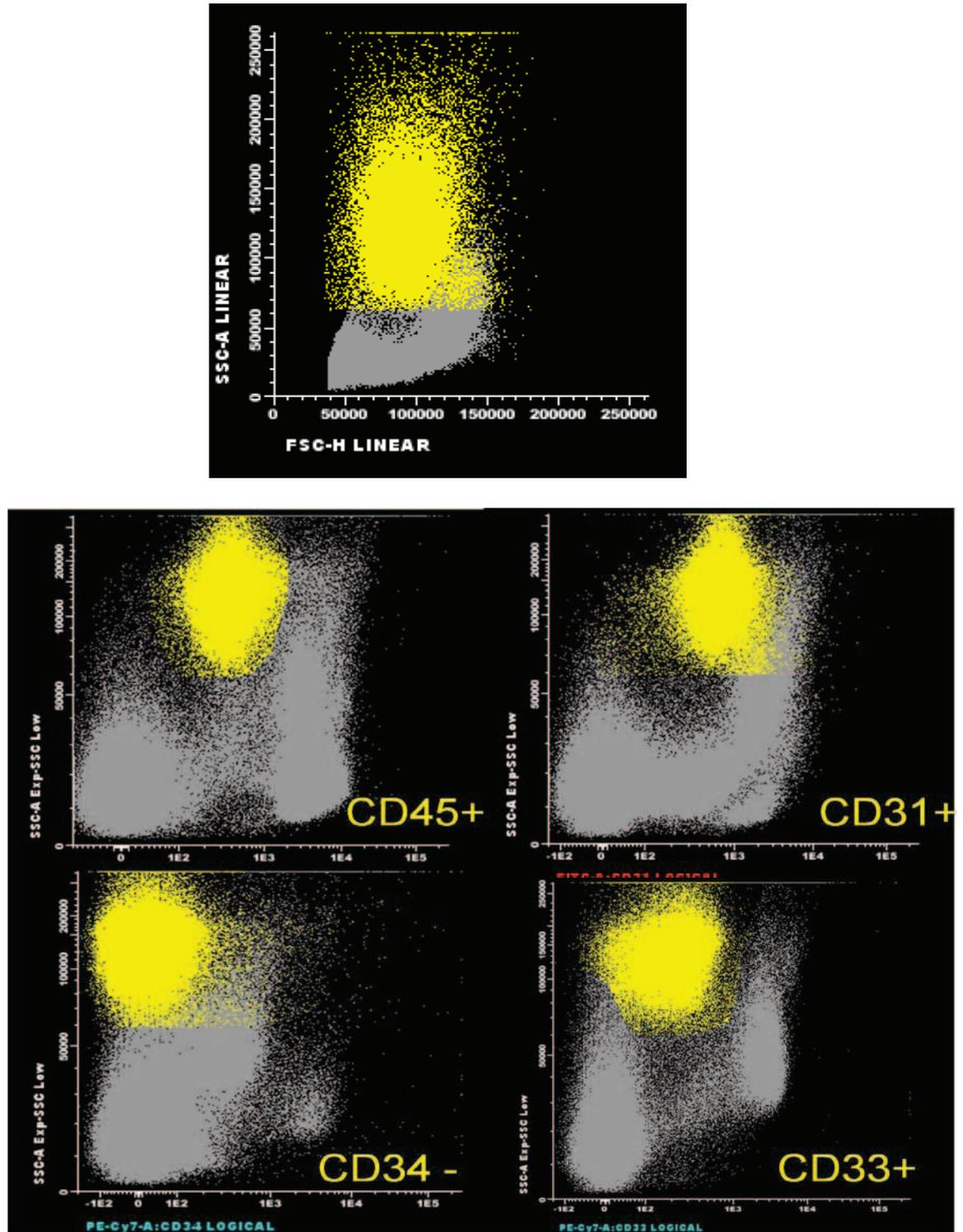


Figura 28: Histogramas de citometria de fluxo representativos da identificação da população de neutrófilos, destacada em amarelo. Perfil imunofenotípico encontrado: polimorfonuclear, CD45+CD33+CD31+CD34-

- *Identificação da população de células-tronco hematopoiéticas (HSC)*

(Figura 29):

- Seleccionamos as células CD45- e excluimos o restante.
- Dentro da população CD45- seleccionamos as células CD34+↑.
- Na população CD45-CD34+↑ conferimos se esta população possui as características morfológicas condizentes com a população de HSC no histograma de morfologia (FSC X SSC).
- Finalmente retornamos com todas as células excluídas anteriormente e verificamos o percentual relativo ao total da amostra analisada que corresponde à HSC.

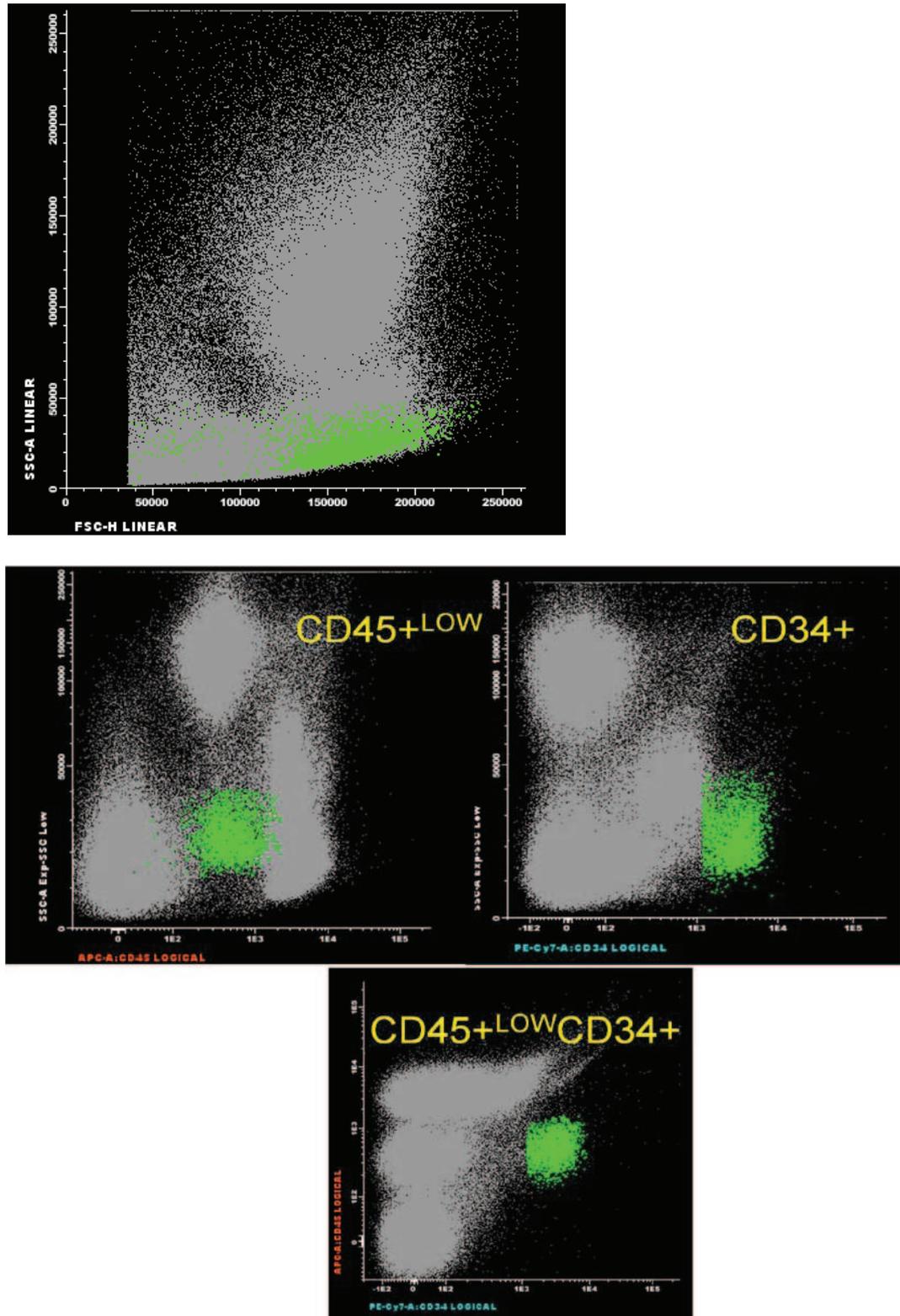


Figura 29: Histogramas de citometria de fluxo representativos da identificação da população de HSC, destacada em verde. Perfil imunofenotípico encontrado: mononuclear, CD45+low, CD34+high.

- *Identificação da população de células-tronco mesenquimais (MSC) (Figura 30)*
 - Selecionamos as células CD45- e excluimos o restante.
 - Dentro da população CD45- selecionamos as células CD34-.
 - Na população CD45-CD34- identificamos a população CD90+.
 - Na população CD45-CD34-CD90+ selecionamos as células CD105+.
 - Dentro da população CD45-CD34-CD90+CD105+ selecionamos as células CD73+.
 - Observamos ainda se as células CD45-CD34-CD90+CD105+CD73+ eram negativas para HLA-DR e CD19.
 - Assim, conferimos se a população CD45-CD34-CD90+CD105+CD73+ HLA-DR-CD19- possui as características morfológicas condizentes com a população de MSC no histograma de morfologia (FSC X SSC).
 - Finalmente retornamos com todas as células excluídas anteriormente e verificamos o percentual relativo ao total da amostra analisada que corresponde à MSC.

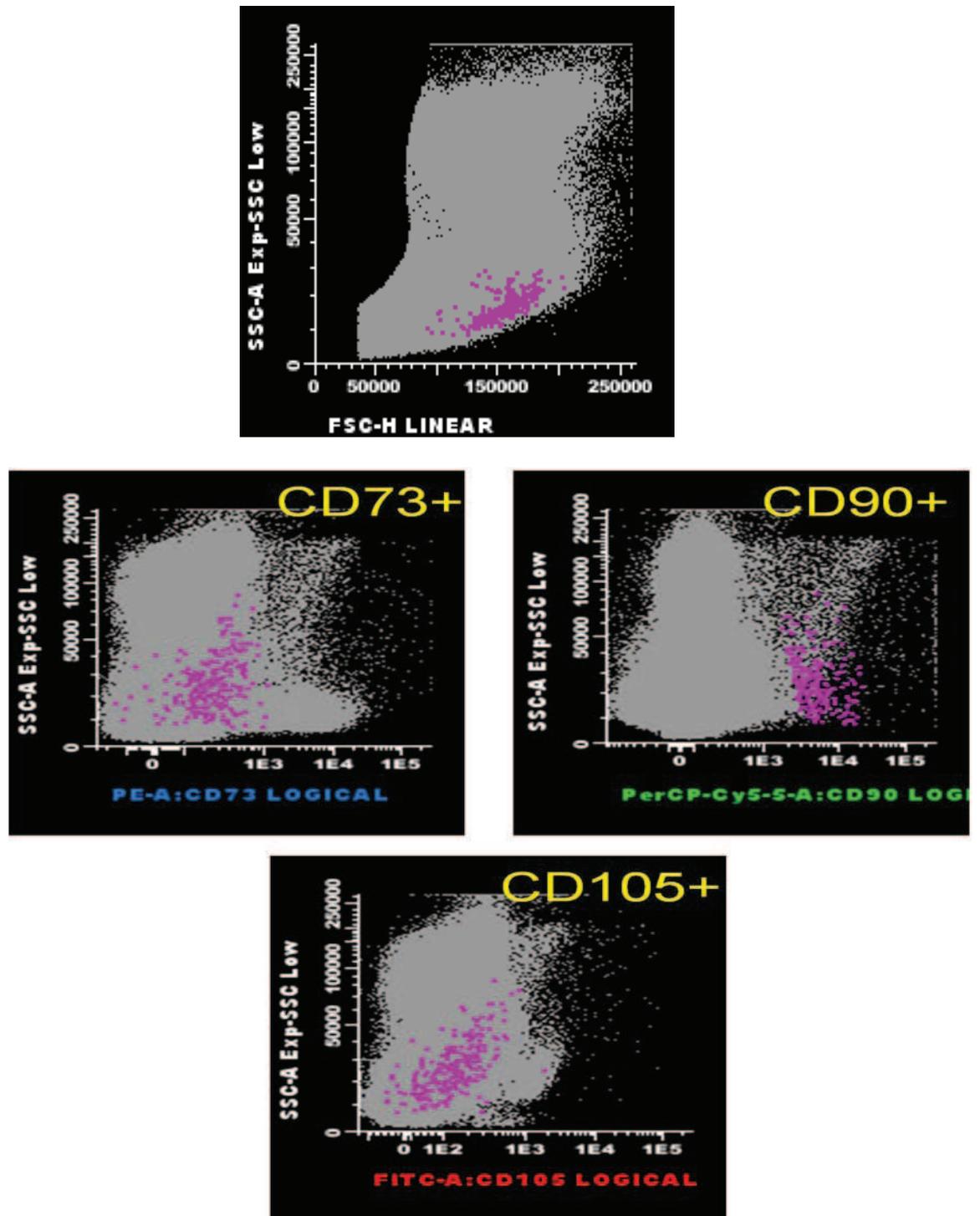


Figura 30: Histogramas de citometria de fluxo representativos da identificação da população de MSC, destacada em roxo. Perfil imunofenotípico encontrado: mononuclear, CD45-, CD34-, CD105+, CD73+, CD90+.

- *Identificação da população de eritroblastos (Figura 31):*
 - A análise de eritroblastos foi realizada por seleção negativa. Excluimos todos os tipos celulares já previamente identificados.
 - Seleccionamos as células CD45- e conferimos se esta população possuía as características morfológicas condizentes com a população de eritroblastos (FSC↓) no histograma de morfologia (FSC X SSC).
 - Finalmente retornamos com todas as células excluídas anteriormente e verificamos o percentual relativo ao total da amostra analisada que corresponde aos eritroblastos.

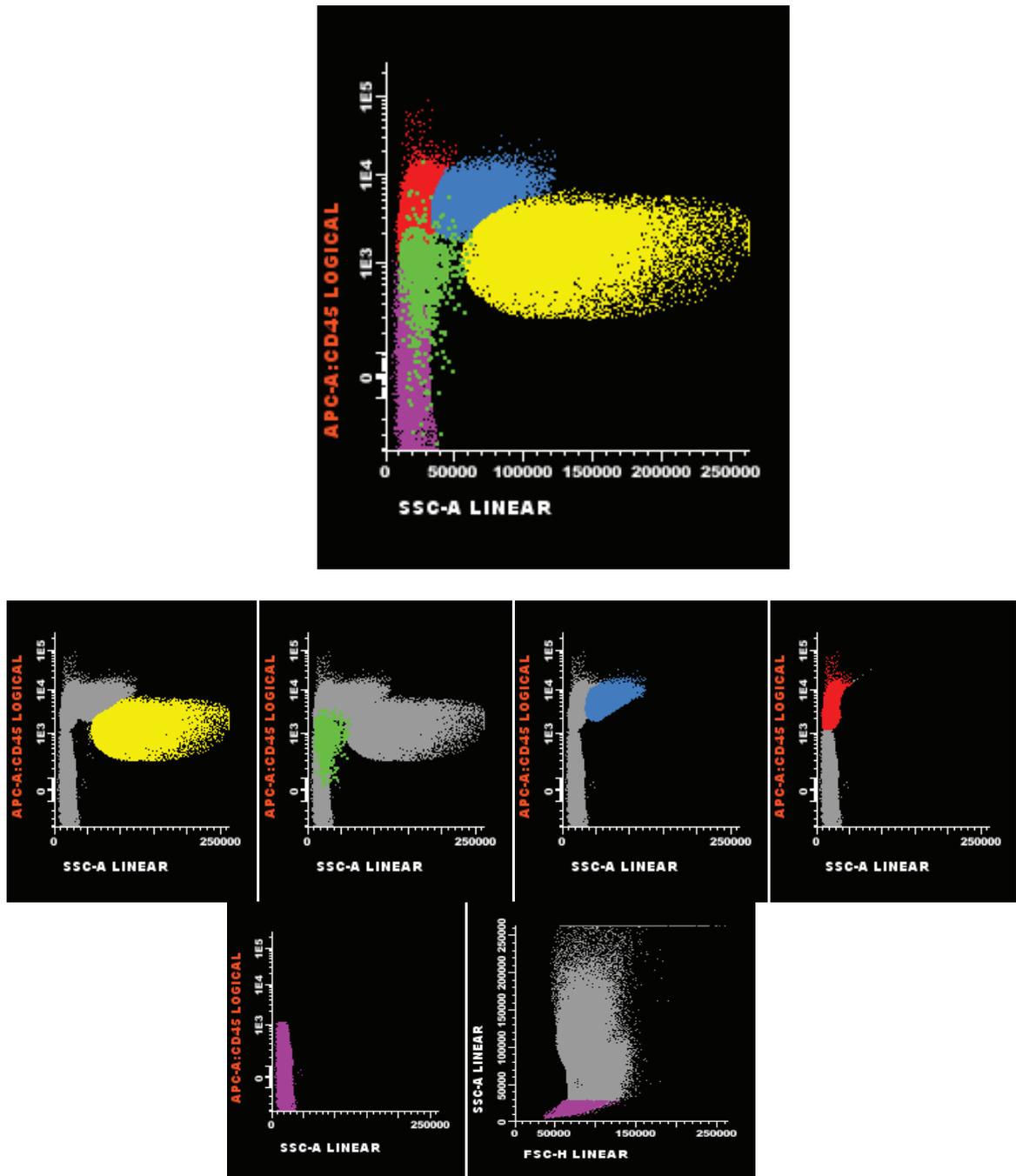


Figura 31: Histogramas de citometria de fluxo representativos da identificação da população de eritroblastos, destacada em roxo. Análise feita por seleção negativa, Perfil imunofenotípico encontrado: mononuclear, CD45-, CD34-, HLA-DR-, CD31-, CD33-, CD3-,CD4-, CD8-, CD19-, CD56-, CD90-,CD73-.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)