

Índice

Resumo	3
Abstract	4
Introdução.....	5
O princípio... e os princípios	8
Sobre os efeitos imunomoduladores das MSCs	12
Aplicação das MSCs nas Doenças do Envelhecimento	17
Patologia cardiovascular	18
Coração.....	21
Vasos periféricos	24
Reperusão	27
Neurodegenerativas	28
Doença de Alzheimer	30
Doença de Parkinson.....	32
Isquemia cerebral	36
Outras doenças neurodegenerativas	40
Marcação com radioisótopos, pré-condicionamento e modificação genética	43
Diabetes	45

Tratamento das complicações.....	52
Oncologia.....	54
Glioblastoma.....	57
Células estaminais cancerígenas vs mesenquimatosas.....	60
Outros.....	62
Discussão e Conclusão.....	65
Agradecimentos.....	68
Referências bibliográficas.....	69
Índice de ilustrações.....	79

Resumo

O envelhecimento demográfico resulta da diminuição da taxa de natalidade a par do aumento da esperança média de vida. Evidentemente, a situação sem precedentes que estamos a viver presentemente representa um desafio no sentido de atenuar a morbilidade nos idosos, retardando, tratando ou curando as doenças sempre que possível. Uma das respostas é a terapia celular, particularmente a baseada em células estaminais mesenquimatosas (MSCs) – dada a sua acessibilidade, facilidade de cultura e versatilidade. Este trabalho pretendeu localizar-nos no estado da arte dos estudos com MSCs no âmbito de algumas doenças do envelhecimento, salientar as suas problemáticas mais importantes e eventuais limitações. Foram introduzidas as potencialidades das tecnologias emergentes, como os nanotubos, o pré-condicionamento e a terapia génica. Para a pesquisa bibliográfica utilizaram-se os termos “*mesenchymal+stem+cells*”, “*bone+marrow+stromal+cells*”, “*multipotent+stem+cells*” e “*multipotent+stromal+cells*”, na base de dados PubMed. Embora numa etapa preliminar de investigação, o uso das MSCs nas doenças do envelhecimento apresenta-se promissor, principalmente com base na aplicação das suas propriedades de tropismo para locais de lesão, imunomodulação e libertação de factores bioactivos. Hoje já existem alguns trabalhos impressionantes, ao nível da clínica, protagonizados pelas MSCs aplicadas à doença crónica. Gerou-se, portanto, uma grande expectativa no sentido de melhorar, ou quem sabe, reescrever a história natural das doenças do envelhecimento.

Abstract

The current demographic ageing results from the decreasing birth rate in addition to the increasing of average life expectancy. Evidently, this unprecedented situation represents a challenge in lessening the morbidity in old age, postponing, treating or curing illnesses whenever possible. One such path is Cellular Therapy, particularly the one based on mesenchymal stem cells (MSCs) given its accessibility, easiness of cell culture and versatility. The purpose of this essay was to point out where we are in regard to the state of the art on the studies with MSCs concerning ageing diseases, underlining its most important problematics and eventual limitations. Focus was given to the potential of emerging technologies such as nanotubes, preconditioning and gene therapy. For the bibliographic literature, the searched keywords were “mesenchymal+stem+cells”, “bone+marrow+stromal+cells”, “multipotent+stem+cells” and “multipotent+stromal+cells” within the PubMed database. Even though they are at a preliminary investigation stage, the use of MSCs on ageing diseases has shown promise, especially when it comes to its tropism properties, immunomodulation and the releasing of bioactive factors. There are already some impressive reports concerning clinical results of the applications of MSCs on chronic diseases. A great expectancy has arisen on the pursuit to improve or, perhaps, rewrite the natural progression of ageing diseases.

Introdução

O Envelhecimento é um processo natural de declínio das capacidades física, mental e social, que culmina, irremediavelmente, na morte do indivíduo. De acordo com as Teorias em voga, o envelhecimento, ou melhor dizendo, a senescência (deterioração do organismo, relacionada com a passagem do tempo) resulta de vários factores, sendo que nenhum a explica integralmente [1].

Em 2003, Weinert e Timira discriminaram quase uma dúzia de teorias, divididas entre **evolutivas**, **moleculares-celulares** e **sistémicas**, entre as quais merecem destaque: a senescência celular e dos telómeros, a agressão de proteínas e DNA por radicais livres (incluindo mDNA) e o acumular de mutações, resultado de uma selecção natural que se torna mais “exigente” acompanhando o avançar da idade. É interessante confrontar este conjunto de teorias com a proposta mais sofisticada que cataloga as causas da senescência em dois grandes grupos: as **programadas** e as de **dano ou erro** [1, 2]. No primeiro grupo, prevê-se a existência de factores genéticos, endócrinos e imunológicos que funcionam como um relógio biológico, determinando a manifestação dos défices através de disfunções orgânicas. No segundo, abordam-se os danos oxidativos e de falhas na reparação genómica... e é interessante verificar como estas teorias podem, evidentemente, interagir entre si, sem se excluírem (figura 1).

O consensual é que a população mundial está a envelhecer. Uma pesquisa rápida no *website* da *World Health Organization* é suficiente para apurar que a tendência é para que duplique a proporção de pessoas com mais de 60 anos entre 2000 e 2050 – contando também com o aumento substancial da esperança de vida nos países em vias de desenvolvimento [3]. Será cada vez mais comum conviverem quatro gerações em simultâneo... É claro que este panorama faz prever um aumento da morbidade. Tanto nos países desenvolvidos como em vias de desenvolvimento, os idosos morrem principalmente por patologias não contagiosas, como a doença cardiovascular ou o acidente vascular cerebral (AVC).

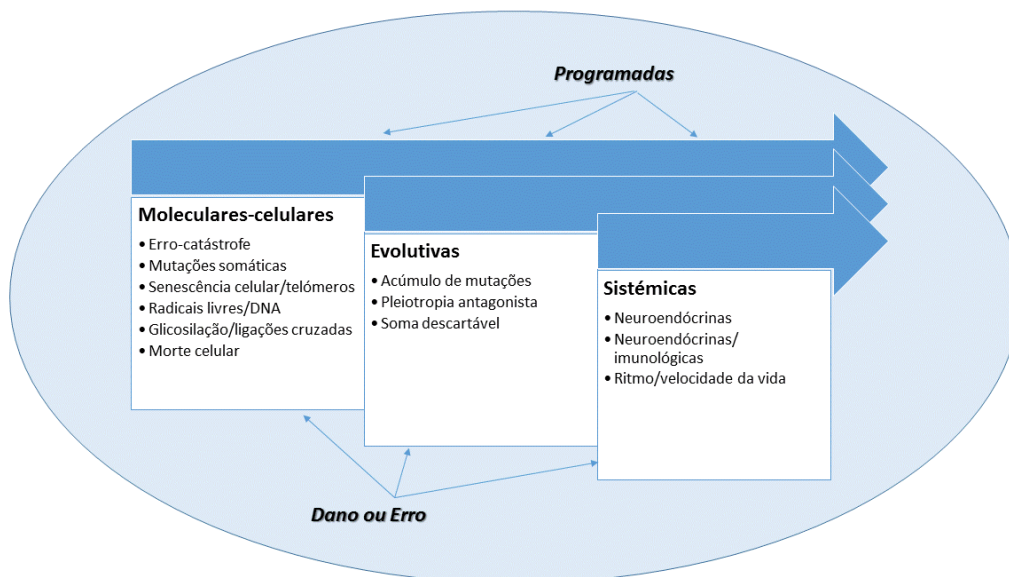


Figura 1 Teorias do envelhecimento de acordo com Weinert e Timira, intersectadas com as teorias biológicas modernas do envelhecimento.

Em 1986, Brody e Schneider dividiram as doenças associadas ao envelhecimento em *doenças relacionadas com o envelhecimento* e *doenças dependentes do envelhecimento*, de forma a separar aquelas cuja prevalência acompanha a progressão da idade, não se

relacionando necessariamente com o envelhecer normal, e as outras cuja patogénese deriva do processo de senectude normal [4].

De facto, espera-se, com o envelhecimento, um declínio nas funções hepática, renal e gonadal, e alterações do padrão do sono bem como da constituição corporal, com **aumento da respectiva percentagem lipídica**. O idoso sujeita-se por conseguinte a um agravamento da incidência de **doenças crónicas**, sejam artroses, osteoporose, doenças cardiovasculares, Alzheimer, diabetes ou cancro; assim como de **problemas agudos**, e.g., o AVC e o enfarte agudo do miocárdio [5].

Por todas estas razões, o envelhecimento saudável tem sido apontado como “a próxima fronteira” para a investigação médica, oferecendo frutos aliciantes no que diz respeito à Economia, à Saúde Pública e ao bem-estar geral [6].

Torna-se pertinente referir o conceito de **senectude bem-sucedida**, introduzido por Cícero. Cícero foi um distinto político e filósofo romano, que defendia num dos seus últimos ensaios que a senectude não é senão o período mais produtivo da vida do Homem, pois finalmente poderia usufruir da sua mente sem as persuadições indisciplinadas do corpo. Revigorando a concepção estoicista de Cícero, a Medicina propõe-se portanto, e para já, a proporcionar ao idoso a melhor qualidade de vida possível, retardando, tratando ou possivelmente até curando as doenças relacionadas com o envelhecimento.

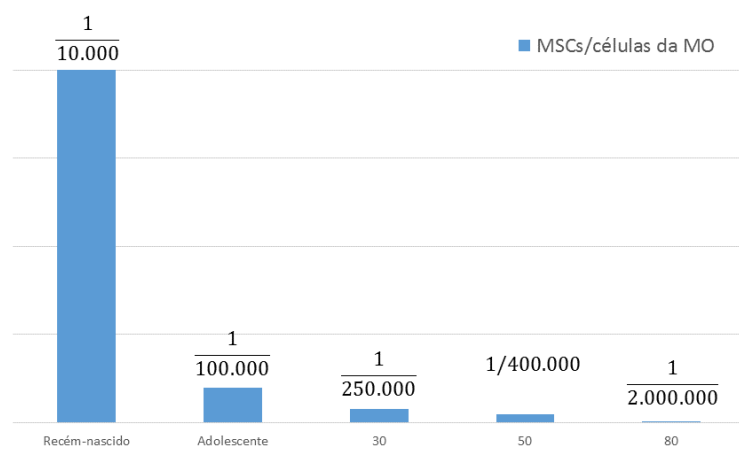
Uma das respostas que se tem apresentado promissora no âmbito deste desafio está relacionada com a exploração de um determinado grupo de células estaminais pós-natais, virtualmente ubiqüitárias dentro do organismo, cujo propósito original é precisamente o suporte e reparação de tecidos. Têm, com efeito, capacidade de amplificação da

capacidade regenerativa dos tecidos, inibir a apoptose, limitar a remodelação fibrótica patológica, estimular a proliferação de progenitores endógenos *stem-like*, minimizar o *stress* oxidativo de origem inflamatória e modular a resposta imunitária [7]. Como podemos aplicar estas propriedades para controlar as doenças relacionadas com o envelhecimento? Tomaremos essa questão, pois, depois de nos debruçarmos um pouco mais sobre as **células estaminais mesenquimatosas (MSCs)**.

O princípio... e os princípios

É do conhecimento geral que a cura dos ferimentos se dá mais expedita e eficientemente quanto mais jovem for o indivíduo [8, 9]. Um dos factores que parece fundamentá-lo é a escassez relativa de células estaminais e progenitoras no adulto (figura 2), que, passado o

período do crescimento mais intenso, se vieram a **diferenciar**, em vez de se conservarem como **residentes**, nos tecidos adultos [8]. A depleção destas células residentes



também ocorre, gradualmente, à medida que

Figura 2 Declínio das MSCs com a idade, estimado com ensaio de CFU-F (colony forming units – fibroblast). Adaptado de Caplan, 2007.

são recrutadas para reparação e manutenção homeostática de tecidos, à custa das suas propriedades **pro-angiogénica**, **imunomoduladora** e **pro-regenerativa** [10]. Um

exemplo destas células estaminais do adulto são as **células estaminais mesenquimatosas** (MSCs), e podendo ser encontradas em inúmeros tecidos (adiposo, hepático, sistema nervoso central, membranas sinoviais, sangue, tecido dentário...), é na medula óssea que são mais frequentes. Em 2006, a *International Society for Cellular Therapy* criou uma definição para as MSCs, baseada em 3 critérios [11]:

1. Aderência a superfícies plásticas e formação de colónias, sob condições de cultura standardizadas;
2. Apresentação dos marcadores de superfície CD105, CD73 e CD90, e ausência daqueles característicos das células estaminais hematopoiéticas (CD34, CD45, CD11a, CD19 ou CD79a, CD11b ou CD14 ou HLA-DR);
3. Possibilidade de diferenciação em osteoblastos, adipócitos ou condrócitos, após estímulo apropriado.

Com efeito, apenas parcialmente condicionadas pela sua proveniência¹ [10], estas são capazes de se converter (*in vivo* e *in vitro*) em todos os seguintes tecidos mesodérmicos: ósseo, cartilaginoso, muscular (também cardíaco), estromal medular, tendinoso e

¹ Ainda que não esteja totalmente esclarecida a origem das MSCs, a hipótese mais consensual é que terão essencialmente duas fontes: a região perivascular (nos tecidos periféricos, como remanescentes embriológicos) e a medula óssea. Crê-se que é aqui que se enconde a explicação para a variação das propriedades das células dos diferentes tecidos.

conjuntivo (adipócitos, dermócitos, e outras...), conforme ilustrado pela figura 3 [12]. À parte da linhagem mesenquimatosa, conhece-se também a capacidade das MSCs de se converterem em neurónios, ilhéus pancreáticos, hepatócitos, endotélio e epitélio, pelo menos *in vitro* [13-18]. Em virtude desta propriedade, as MSCs ganharam a designação de **células estromais mesenquimatosas multipotentes** [19].

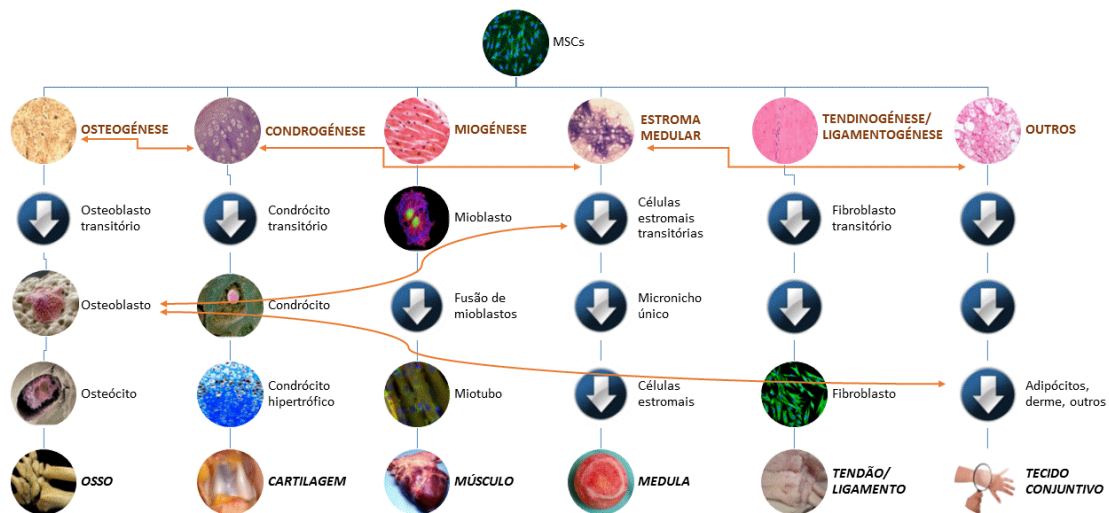


Figura 3 As setas cor-de-laranja e azuis representam a plasticidade das MSCs e de alguns dos seus derivados mais diferenciados. Baseado em Caplan, 2007.

Para além de atractivas como fonte de células maduras virtualmente inesgotáveis, as MSCs também são capazes de produzir **agentes tróficos** com os mais diversos propósitos (figura 4). Estas biomoléculas são capazes de actuar de forma autócrina, parácrina, justácrina, endócrina e intrácrina, ou seja, na própria célula, directamente nas células adjacentes, nas células próximas através do espaço extracelular, em locais afastados (via corrente sanguínea), e por interacção com proteínas da matriz extracelular, respectivamente [7]. Estão perfeitamente estabelecidos os papéis de alguns dos factores de crescimentos emitidos pelas MSCs. Contam-se entre eles: indução da mitose,

regulação do desenvolvimento embrionário, reparação de lesões, diferenciação celular, prevenção da fibrose e imunomodulação, suporte à sobrevivência neuronal e regeneração nervosa, manutenção dos nichos estaminais, metabolismo ósseo, propriedades anti-apoptóticas, angiogénese e permeabilização dos vasos às células recrutadas para reparar os tecidos... até actividade antimicrobiana, através de catelicidinas que violam a membrana bacteriana [7, 20].

Esta propriedade é de tal forma importante que o antigo paradigma de ser recorrer às MSCs para substituir células disfuncionais – por **diferenciação** celular – mudou para usufruir dos seus mecanismos parácrinos no suporte das células residentes. Estes potenciais recursos terapêuticos inspiraram Caplan, que originalmente baptizou as MSCs (de *marrow stromal cells*), a reciclar recentemente o acrónimo para o definir como “*medicinal signaling cells*” [21].


Efeito imunomodulador	Efeito trófico (ambiente regenerativo)					
	Anti-apoptótico	Anti-fibrótico	Suporte	Angiogénico	Quimioatração	Anti-microbiano
PGE-2	VEGF	bFGF	SCF	bFGF	CCL2 (MCP-1)	LL37 (catelicidinas)
TGF- β	HGF	HGF	LIF	VEGF	CCL3 (MIP-1a)	
HGF	IGF-I	Adrenomedulina	IL-6	PIGF	CCL4 (MIP-1b)	
mpCCL2	Estaniocalcina-1		M-CSF	MCP-1	CCL5 (RANTES)	
IDO	TGF- β		SDF-1	IL-6	CCL7 (MCP-3)	
iNOS	bFGF		Angiopietina-1	Moléculas da matriz extracelular	CCL20 (MIP-3a)	
HLA-G5	GM-CSF				CCL26 (eotaxina-3)	
LIF					CX3CL1 (fractalquina)	
					CXCL5 (ENA-78)	
Actua nos:					CXCL11 (i-TAC)	
<i>Linfócitos T</i>					CXCL1 (GRO α)	
<i>Linfócitos B</i>					CXCL2 (GRO β)	
<i>Células Dendríticas</i>					CXCL8 (IL-8)	
<i>Tregs</i>					CCL10 (IP-10)	
<i>Outros...</i>					CXCL12 (SDF-1)	

Figura 4 Principais mecanismos de acção das MSCs, e respectivos agentes bioactivos. Baseado em Meirelles, 2009.

Acresce às propriedades mencionadas a capacidade de migração/**tropismo** para locais de lesão e inflamação tecidual, quer seja instilado via intramuscular, subcutânea ou

intravenosa [22]. Os mecanismos para a migração *in vivo* são complexos, pelo que presentemente é mais conhecida a mecânica *in vitro*. O princípio é simples: a libertação de factores quimiotácticos de diversas proveniências (factor de crescimento AB derivado das plaquetas, quimiocina derivada dos macrófagos, factor-1 derivado das células estromais, factor de crescimento *insulin-like-1*, quimiocinas RANTES...) induz uma resposta de mobilização por parte das MSCs. *In vivo*, foram propostas duas vias de recrutamento das MSCs endógenas, ora através da libertação de factores de crescimento na circulação sistémica, ora dentro do próprio tecido afectado. Quanto à migração de MSCs exógenas *in vivo*, estão também na dependência dos sinais quimiotácticos (como o CXCR4) originados pela inflamação ou lesão tecidular. A via de administração parece porém ser uma variável importante, limitando a viabilidade das células e a sua capacidade de regeneração [22].

Sobre os efeitos imunomoduladores das MSCs

A natureza imunomoduladora é talvez a propriedade mais multifuncional e de aplicação mais extensa das MSCs. Na realidade, foi mesmo proposto que a função imunossupressora das MSCs é estimulada exactamente pelo microambiente intensamente inflamatório (rico em $IFN\gamma$ e $TNF\alpha/IL-1\alpha/IL-1\beta$), como ocorre na doença do enxerto vs hospedeiro, ou no lúpus eritematoso sistémico [23].

Sinteticamente, as características

imunomoduladoras das MSCs resultam de dois tipos de interacção: célula-célula e parácrina.

A actividade parácrina é mediada por factores variáveis entre espécies (figura 5) [23], como o óxido nítrico nos ratos, a indoleamina 2,3 dioxigenase (IDO) nos humanos, e prostaglandina-E2 (PGE2), IL-10, IL-6, heme-oxigenase-1 (HO-1) e outros, comuns a ambos.

Merecem destaque, pela sua importância, a IDO e a

Factor imunomodulador	Papel na imunossupressão mediada por MSCs
IDO	Inibe proliferação de células T Promove diferenciação em macrófago tipo II Suprime actividade das NK
Semaforina-3A	Inibe proliferação de células T
B7-H4	Inibe activação e proliferação de células T
HLA-G	Inibe resposta das células periféricas mononucleares
LIF	Inibe proliferação de células T
TSG6	Regula os macrófagos, inibe inflamação
Galectina(s)	Inibe proliferação de células T
HO-1	Inibe resposta das células T Induz Tregs Tr1 IL-10 mediadas e Th3 TGF-β mediadas
IL-6	Inibe diferenciação de células dendríticas Inibe proliferação de células T
TGF-β	Induz Tregs Inibe activação e função de NK
IL-10	Inibe resposta da célula T, diminui diferenciação Th17
PGE-2	Induz Foxp3 das Tregs Inibe a função das NK cell function Induz macrófagos tipo II Inibe maturação de células dendríticas
PD-L1/2	Inibe células Th17 Inibe proliferação de células T
FasL	Induz apoptose de células T

Figura 5 Factores envolvidos na imunossupressão MSCs-mediada, e respectivos alvos. Baseado em Ma, 2013.

PGE-2. A IDO actua como catalisador da degradação do triptofano a quinurenina, sendo que a menor concentração de triptofano corresponde uma maior imunossupressão [23].

De facto, a IDO inibe a proliferação das células T, promove a diferenciação dos

macrófagos para o tipo II e sabota a actuação das células *natural killers* (NK). Quanto à PGE2, é sabido que a sua libertação é capaz de reprogramar os macrófagos para produzir mais IL-10, inibir a maturação das células dendríticas (*dendritic cells*, DC) e influenciar o equilíbrio entre Th1 e Th2 [23]. Finalmente, na presença de PGE2 aIDO vê a sua actividade amplificada, nomeadamente face às células T e NK [23].

Falemos agora um pouco sobre as interacções célula-a-célula, que se caracterizam por níveis baixos ou intermédios de expressão de antígenos do complexo de histocompatibilidade major (*major histocompatibility complex*, MHC) classe II e ausência de expressão dos antígenos do MHC classe I. Adicionalmente, é própria a ausência de co-estimulação pelas moléculas B7-1 (CD80), B7-2 (CD86), CD40 e ligando (CD40L), e ligando da Fas (FasL) [24, 25]. Também intervêm na imunomodulação os receptores *toll-like* (TLR, *toll-like receptors*), que integram igualmente as MSCs [24].

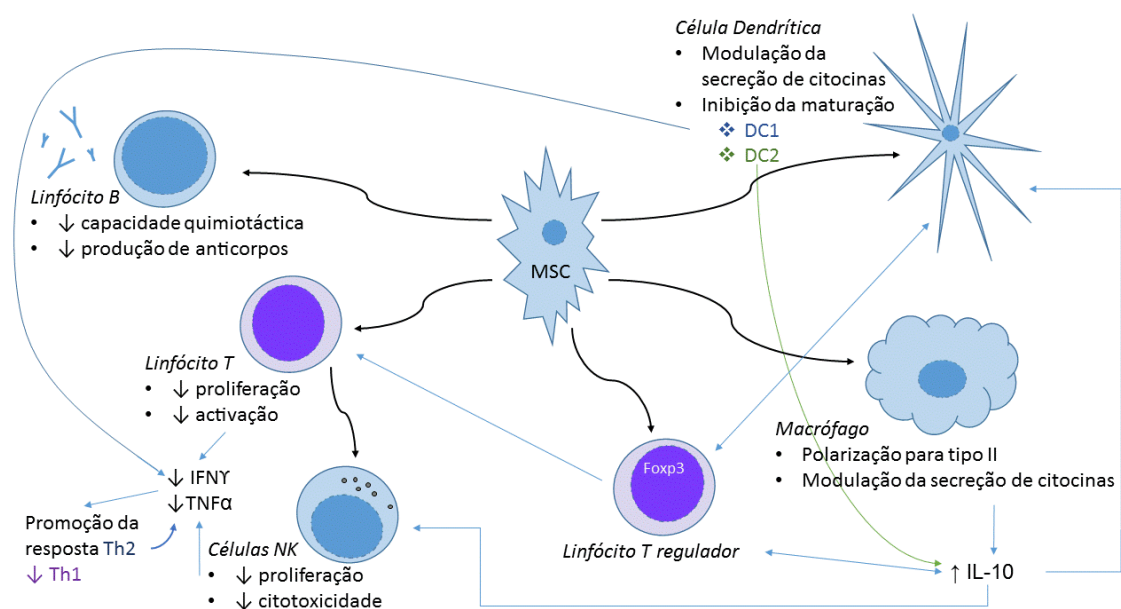


Figura 6 Actividade parácrina das MSCs como imunomoduladoras.

Pelas vias acima explanadas, as MSCs actuam essencialmente a 3 níveis: nas DC, nos macrófagos e nos linfócitos (figura 6). O efeito das MCSs nas DC é produto da inibição das citocinas pró-inflamatórias e da inibição da expressão de MCH classe II, CD1- α , CD40, CD80 e CD 86. Consequentemente, as **DC** ficam retidas num estadio de imaturidade e/ou não-funcionamento [23, 24]. Relativamente aos **macrófagos**, as MSCs favorecem a diferenciação dos macrófagos para o tipo II [23]. O macrófago tipo II activado (M2) é reconhecido como célula anti-inflamatória; ao gerar uma resposta do tipo-Th2 depois de activação em ambiente tipo-Th1, o M2 frena a produção da citocina promotora de Th1, a IL-12, e aumenta a produção da IL-10, anti-inflamatória. Entre os **linfócitos**, as MSCs interagem com as células NK, linfócitos T e B. Por um lado, a acção das células NK pode ser cessada por acção dos factores solúveis já apresentados; por outro, a sua proliferação IL-2 ou IL-15-dependentes também é inibida [23]. Também a produção e proliferação das células T e B são travadas – no caso das células B, junto com queda da produção de imunoglobulinas (principalmente A, G e M) e da sua capacidade quimiotáctica (por diminuição da CXCR5) [24]. A diminuição da produção de IFN γ também é um factor importante, uma vez que regula vários aspectos da resposta imune: desde as células *T-helper* 1 (Th1), passando pela diminuição da secreção de IL-4, resultando na regulação inibitória da resposta imune das células Th2 [26]. Paralelamente, observa-se indução da actividade de algumas células **T reguladoras** (Treg) na presença de citocinas pró-inflamatórias.

As MSCs têm sido apelidadas de “imunoprevilegiadas” [20]. Porém, esta imunossupressão encontra-se vincadamente dependente das condições de cultura,

apresentando variações de enorme relevo de acordo com a fonte de isolamento utilizada, o número de passagens em cultura e naturalmente com o ambiente interno do recipiente [23].

Aplicação das MSCs nas Doenças do Envelhecimento

Não há dúvida que as propriedades mencionadas se insinuam promissoras como terapêutica para várias doenças – e as relacionadas com o envelhecimento não são excepção. No website <https://clinicaltrials.gov> é possível acompanhar o brotar de alguns ensaios clínicos envolvendo MSCs, inclusive no âmbito da **doença cardiovascular**, da **diabetes mellitus** e suas complicações, das **doenças neurodegenerativas** e do domínio da **oncologia** (figura 7). A abundância de resultados no que concerne a MSCs deixa adivinhar que muito trabalho tem sido feito neste campo. Cria-se portanto a necessidade

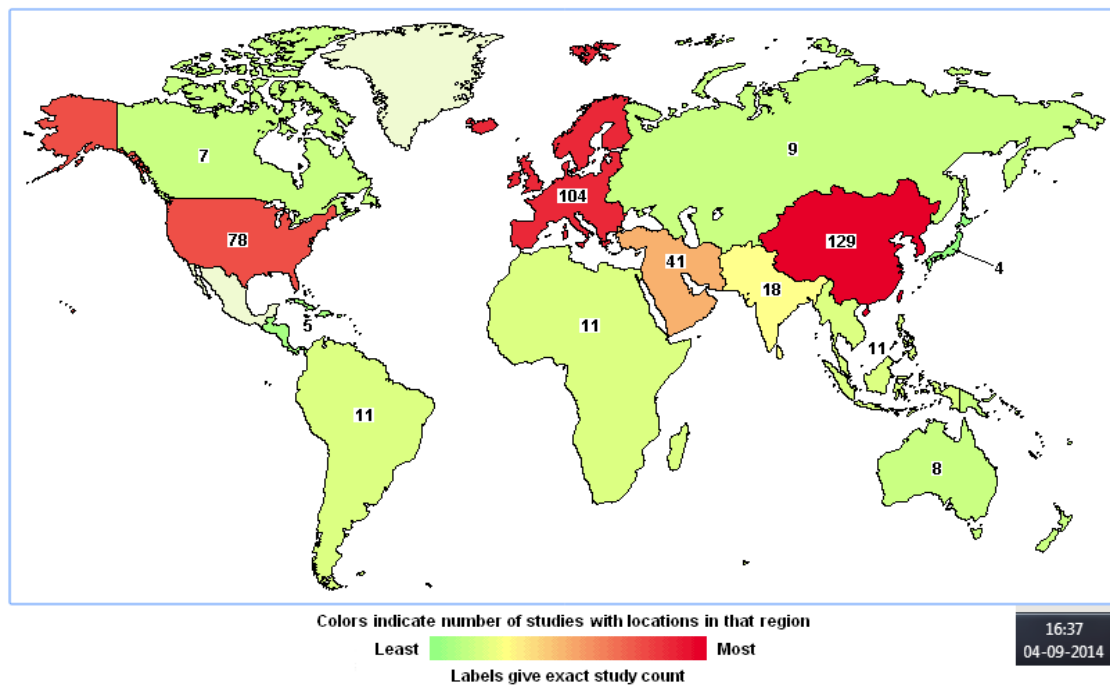


Figura 7 Mapa extraído de clinicaltrials.gov, gerado automaticamente à pesquisa pelas palavras-chave “*mesenchymal+stem+cells*”.

de nos cingirmos a alguns marcos mais representativos. Procedamos assim para o próximo subtítulo.

Patologia cardiovascular

A senescência acarreta **alterações progressivas nos cardiomiócitos** – estruturais e finalmente funcionais. Presume-se que sejam, portanto, estas células as culpadas em última instância no que é de facto o conjunto de doenças que representa a causa número 1 de morte no Planeta (figura 8).

Como é consensual, o músculo cardíaco tem uma capacidade regenerativa francamente inferior à do esquelético, sendo considerado que os cardiomiócitos são uma população estática, sem capacidade de proliferação [27]. O “fenótipo cardíaco senescente” [28], designadamente os insultos isquémicos, as hipertensões, os diabetes, etc. tornam-se assim decisivos na formação de lesões cardíacas.

Efectivamente, ao fluxo sanguíneo insuficiente, sucede-se acumulação rápida de metabolitos ácidos nocivos, radicais livres e dano celular.

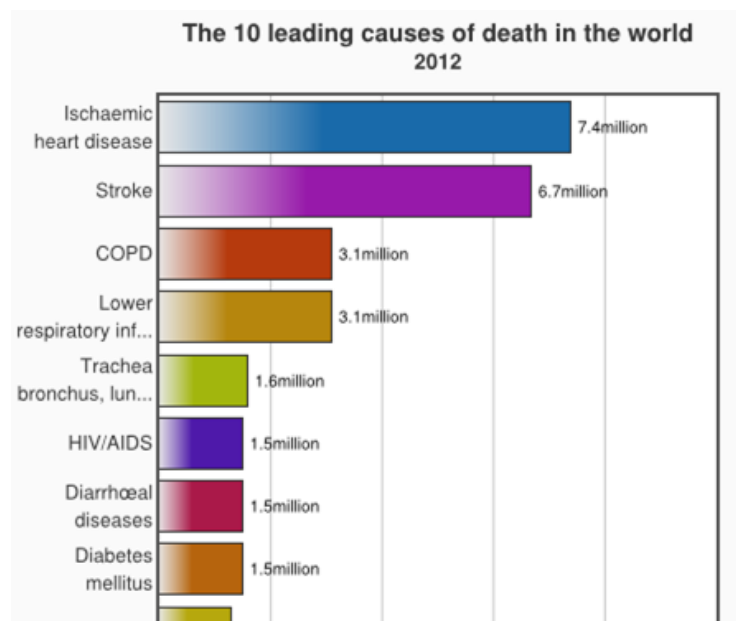


Figura 8 Imagem produzida pela World Health Organization, onde se evidenciam as principais causas de morte globalmente.

Logicamente, ocorre perda de miócitos, e, na ausência de mecanismos de reparação endógenos, segue-se remodelação patológica e fibrose ventricular. A sequência é lógica: assim se criam **disfunção sistólica** e **insuficiência cardíaca**.

Presentemente, apesar dos progressos consideráveis no tratamento de **enfarte agudo do miocárdio**, as terapêuticas disponíveis negligenciam o problema central – **perda de miocárdio funcional**. São, na realidade, paliativas – mantendo-se uma população imensa que acaba por desenvolver **insuficiência cardíaca** e, por conseguinte, morre prematuramente. Neste ponto, da falência cardíaca, as únicas opções restantes são os dispositivos de apoio ao ventrículo esquerdo (*left ventricular assist device*, LVADs) e a transplantação cardíaca [27]. Os inconvenientes do LVAD são vários, incluindo uma mortalidade importante aos 6 anos e um risco muito relevante de falência ventricular direita. Quanto à transplantação cardíaca, tem inúmeras contra-indicações (entre as quais a idade), e, realizando-se, mantém-se a possibilidade de rejeição (imediate ou crónica) do órgão – apesar (e para além dos inconvenientes resultantes) da imunossupressão pesada e vitalícia obrigatória.

Outras condições passíveis de agravamento com o envelhecimento são a **aterosclerose** – uma condição com forte componente inflamatória – e o **aneurisma aórtico**. Os tratamentos preconizados são essencialmente preventivos, no caso da aterosclerose, com medidas farmacológicas ou não farmacológicas de eficácia limitada, ou, em ambas, com correcção endovascular. Estes procedimentos devem ser extremamente selectivos quanto à clínica e às anomalias anatómicas operadas – tanto por representarem uma avultada taxa de morbilidade e mortalidade, como de complicações. A descoberta da **componente**

inflamatória subjacente ao aneurisma inspirou ensaios clínicos com inibidores da enzima de conversão da angiotensina (IECAs) e estatinas, com doxiciclina e posteriormente com anti-inflamatórios não-esteróides (AINEs), verificando-se menos rupturas de AAs e diminuição da sua velocidade de expansão [26]. Ainda que sedutoras, estas terapêuticas têm efeitos secundários, sistémicos, e por isso não estão preconizadas para administração em AA (para além de requererem equipamento especial para actuarem no local mais favorável).

Se os cardiomiócitos são células estáticas, no coração, porém, há uma pequena população de células que parecem prevalecer entre os indivíduos centenários – existindo neles em maior quantidade, com telómeros mais longos e uma reserva de crescimento (quiescente) mais numerosa [28]. Designadas de **células estaminais cardíacas** (*cardiac stem cells*, CSCs), sabe-se que são estas células indiferenciadas as responsáveis pela renovação e manutenção cardíaca. Ainda hoje não está esclarecido se estas células serão originárias do coração, da medula óssea, ou provirão da medula óssea para se tornarem residentes no coração, onde vêm a perder alguns marcadores de superfície [27]. Mas é, em geral, o seu efeito que se pretende amplificar através da suplementação com MSCs, como veremos adiante.

Nesta secção abordarei brevemente as estratégias propostas para enfarte agudo do miocárdio, insuficiência cardíaca, aterosclerose, aneurisma e insuficiência venosa profunda. É notável como poucas ideias em Medicina tiveram uma tradução tão rápida do laboratório experimental para a arena clínica como o uso de células estaminais para a

doença cardíaca. A verdade é que quando foi constatada a anergia imunológica face a alo-enxertos de MSC, foi principiada uma sucessão de ensaios em modelos animais com enfartes do miocárdio, em que se averiguou a adaptação favorável da função ventricular, sem que se verificasse rejeição imunitária (inclusive com xeno-enxertos) ou infiltração linfocítica [29].

Coração

Ao nível da bomba principal do sistema circulatório, as MSCs exógenas têm efeitos diversos. Já foi mencionada a sua **capacidade de diferenciação em cardiomiócitos** – que acaba por ser um dos seus efeitos mais modestos. Por outro lado, as MSCs promovem a **neovascularização** em resposta à hipoxémia, mediadas pela emissão das proteínas: SDF-1 (*stromal cell-derived factor 1*), HGF (*hepatocyte growth factor*), IGF (*insulin-like growth factor*), TGF- β (*transforming growth factor β*) e angiopoetina-1 (Ang-1) [27]. Serão estes factores de crescimento, por sua vez, a provocar a formação de células musculares lisas e células endoteliais vasculares. Concomitantemente, as MSCs estimulam directamente o restauro do tecido cardiovascular lesado, por libertação de um *cocktail cardiogénico* de **factores parácrinos** que, alegadamente, seria por si só suficiente para a reparação MSCs-dependente [30]. Nesta mistura contam-se: TGF- β 1, BMP-4 (*bone morphogenetic protein 4*), activina A, ácido retinóico, IGF-1, FGF-2 (*basic fibroblast growth factor*), α -trombina e IL-6. Houve inclusivamente quem juntasse este conjunto pré-implantatoriamente às MSCs mostrando assim melhorar a sua eficácia

terapêutica. Há então um **recrutamento e activação das CSCs endógenas** para as áreas isquémicas e não-isquémicas [27]. Concomitantemente, vêem-se inibidas a **apoptose** celular (em particular aquela dependente da caspase-3), e a **fibrose**, ao vedar a proliferação de fibroblastos cardíacos I, II e III que participam na matriz extracelular

cardíaca. Em suma,

regeneram-se

células residentes

do miocárdio

perdidas (músculo

liso,

cardiomíocitos,

células endoteliais),

é fomentada a

angiogénese e

minimiza-se a

remodelação

ventricular [29].

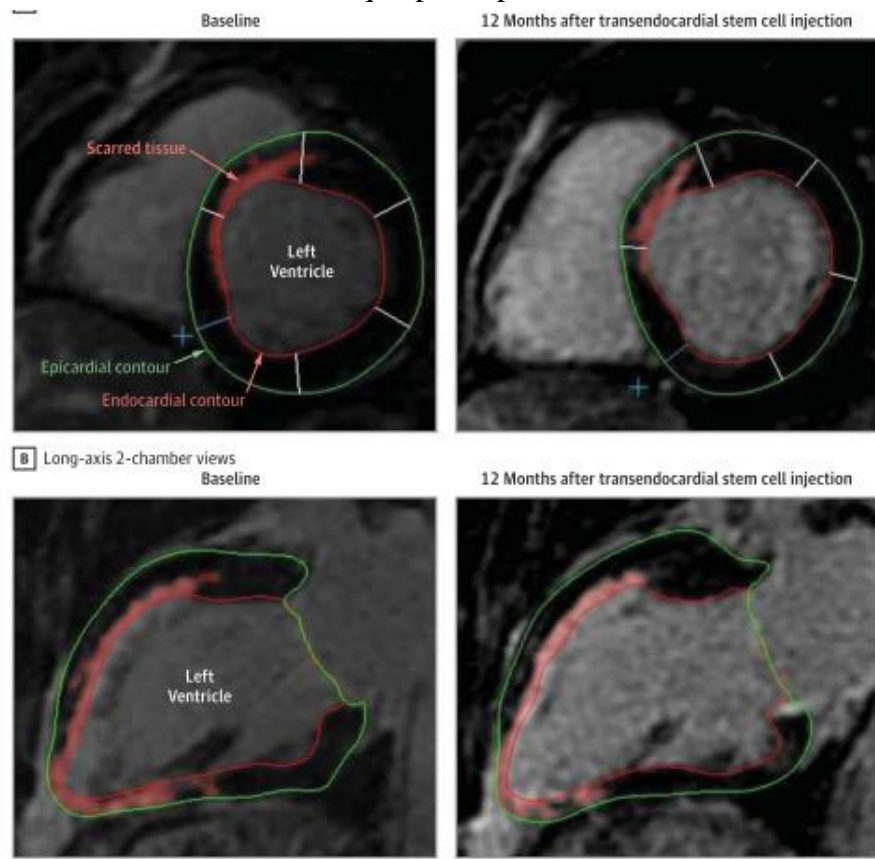


Figura 9 Na imagem evidencia-se a diminuição notável na massa de tecido cicatricial (de 30,85 para 21,17 gramas) 12 meses após tratamento com MSCs. Imagem retirada de Heldman, 2014.

Ao transplante de células-tronco em lesões cardíacas, com o objetivo de promover a substituição e/ou regeneração dos cardiomiócitos chama-se **cardiomioplastia celular**. A entrega das células pode fazer-se via intravenosa, intracoronária ou intramiocárdica. Desde o primeiro estudo em 1999 (injecção de células autólogas do estroma medular directamente no ventrículo esquerdo de ratos criolesionados) até ao muito recente

POSEIDON² (direccionado a doentes com cardiomiopatia isquémica) os resultados deste procedimento têm sido optimistas. Tem-se verificado transversalmente uma influência positiva na capacidade funcional do miocárdio (sistólica e diastólica), na remodelação ventricular e, nos ensaios clínicos, benefício para a qualidade de vida dos doentes (com baixa incidência de reacções adversas, incluindo reacções imunológicas, sendo que a maior parte das observadas são peri-injecção).

A **remodelação ventricular** merece aqui alguma atenção, pelo seu impacto hemodinâmico e pela sua componente fibrótica patológica. A actividade das MSCs ao nível da remodelação ventricular prende-se com a modelação dos constituintes da matriz extracelular, diminuindo a expressão de colagénios (I e III) e metaloproteinasas da matriz (MMP-2, MMP-9) relacionadas com a proliferação de fibroblastos cardíacos, mas prende-se igualmente com a geração de factores anti-fibróticos (HGF, adrenomedulina...) (figura 9). Desta forma, no **enfarte agudo do miocárdio**, a zona enfartada é limitada, assim como a perda de espessura da parede cardíaca (melhora 30% às 12 semanas), a cicatrização é reduzida e estes parâmetros reflectem-se nas pressões diastólicas finais (menos 50% em 6 meses) [27]. Também se verificaram resultados sobreponíveis na **insuficiência cardíaca** de diversas etiologias [31]. Ainda que a fracção de ejeção ventricular não se tenha mostrado consistentemente melhorada, vale a pena salientar que

² Referência em clinicaltrials.gov: NCT01087996.

a área de cicatrização é altamente preditiva no que toca a arritmias ventriculares, remodelação do ventrículo esquerdo, falência cardíaca e mortalidade [32].

Persiste, contudo, o desconhecimento quanto à melhor via de administração, dose/frequência das instilações e vantagem das estratégias relacionadas com o pré-condicionamento do material (genético, farmacológico, físico, estruturas de matriz biocompatível) [27]. Para além disso, já foram estudados vários tipos de células estaminais – como as CSCs, as CDCs (*cardiosphere derived stem cells*), as BMMNCs (*bone marrow mononuclear cells*), e outros, que podem apresentar uma melhor relação dose-resposta. Poderá haver vantagem na combinação de várias? O futuro trará, certamente, uma resposta.

Vasos periféricos

O impacto do envelhecimento, e do fenótipo senescente, não se fica pelo coração. A disfunção endotelial serve de base para a iniciação do processo **aterosclerótico**, sendo que existe um território inflamatório subjacente muito relevante. Assim sendo, as células estaminais insinuam-se úteis ao alojar-se exactamente nos locais de lesão, **diferenciando-se em células endoteliais e reparando os vasos sanguíneos afectados**, enquanto **mitigam a inflamação** contra-producente intermediada pelas metaloproteinases secretadas por macrófagos. Porém, há ensaios laboratoriais discordantes com este pressuposto, uma vez que parece haver uma fracção de MSCs a diferenciar-se em células musculares lisas – a quem se atribui a **restenose vascular** na aterosclerose (quer *de novo*,

quer *in stent*) [33]. Assim sendo, o transplante de MSCs pode agravar, ao invés de atenuar, a progressão da doença. Mais estudos são necessários para esclarecer estas hipóteses.

Como é bem conhecido, a idade e a aterosclerose amplificam o risco de **aneurisma aórtico** (AA), co-existindo um desequilíbrio da síntese/degradação da matriz extracelular e ainda a fragilidade da parede aórtica. Efectivamente, a inflamação crónica resultante da aterosclerose é uma agravante importante para a degeneração directa e indirecta da matriz. O **potencial anti-inflamatório e imunossupressor** das MSCs, assim como a sua **mobilização para locais com tecido danificado**, justificam o seu uso no âmbito do AA. Assim, a inflamação e a degradação da parede aórtica são inibidas pelas citocinas anti-inflamatórias, inibidoras de proteases e estimuladoras da síntese da matriz extracelular já aludidas. Empiricamente, estão demonstradas eficácia não só na prevenção do desenvolvimento como na progressão dos AA, parecendo existir mesmo alguma regressão no aneurisma já formado [26]. Só não é consensual a via de administração, posto que pela via mais cómoda, intravenosa, uma grande percentagem de células são retidas ao nível dos capilares pulmonares, renais, esplénicos, hepáticos e renais. As alternativas – implantação de uma película celular (*cell-sheet*) intraperitoneal ou injeção directa na parede aórtica – são ideais neste aspecto, sendo porém evidentemente mais invasivas [26].

Outra doença cuja incidência se acentua com o avançar da idade é sem dúvida a incompetência venosa. A sua manifestação e as suas potenciais complicações (úlceras venosas, varicosidades, tromboembolia pulmonar) fazem desta doença uma patologia marcante sob vários pontos de vista. Recentemente foi proposta uma solução inovadora

para **insuficiência venosa profunda crônica**, úlceras venosas e outros problemas decorrentes de baixo fluxo, como lesão muscular dos MI ou a sua paralisia. Com células autólogas, a professora Narine Sarvazyan propõe a criação de bandas para rodear os troços de veias insuficientes, assemelhando-se a corações primitivos [34] (figura 10). Esta bomba funcionaria por compressão das veias, um pouco como a bomba esquelética dos gastrocnémios. O peristaltismo seria garantido por um anel de células *pacemaker* com células contrácteis. O efeito é – senão reverter totalmente a pressão hidrostática – pelo menos gerar um impulso rítmico na veia. Está comprovado que este impulso favorece a secreção de citocinas pelas células endoteliais venosas e conseqüentemente, contraria a predisposição a agregação plaquetar, hipercoagulabilidade e adesão leucocitária,

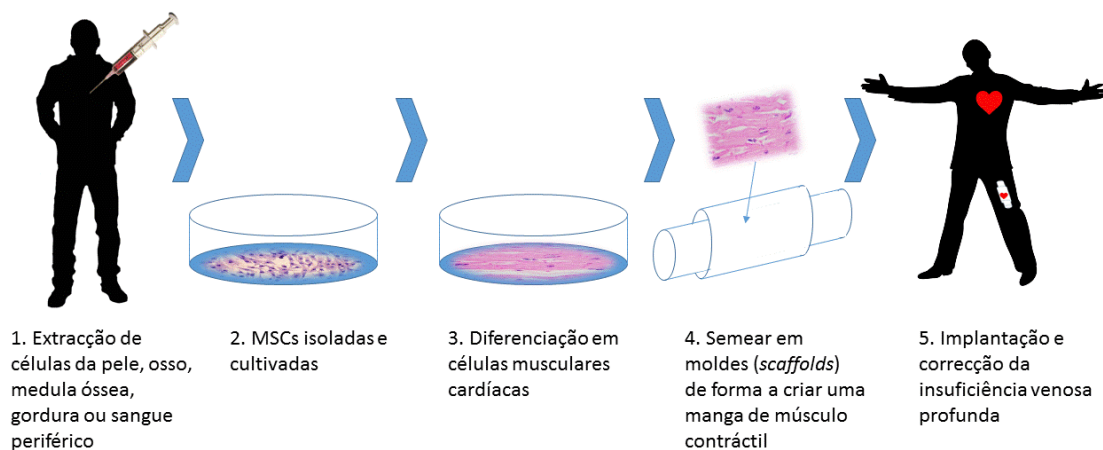


Figura 10 Representação da proposta de Sarvazyan para o tratamento de insuficiência venosa profunda. No passo 4, admitem-se vários padrões para disposição das células, sejam em barra, espiral, várias bandas simétricas ou outros, a estudar.

diminuindo o risco de trombose e promovendo a cura de úlceras venosas da perna. A longo-termo, assistir o retorno venoso nas extremidades mais baixas permite prevenir o edema e em última instância ajudar a circulação em todo o organismo, incluindo o próprio coração.

A revolução encontra-se no facto de se propôr uma estrutura inteiramente diferente da estrutura/ localização anatómica original, tirando partido da funcionalidade de células especializadas de outro tecido presente no corpo. A título de curiosidade, no artigo, a autora interroga-se, então, porque não nos presenteou a natureza com um mecanismo semelhante... e responde de seguida, dizendo que uma vez que a doença venosa profunda é prevalente em idade avançada, a existência desta alternativa não representaria uma vantagem evolucionária. Porém, havendo esta possibilidade, não existe nenhuma razão para não se proporcionar aos idosos esta hipótese, tirando partido dos últimos avanços na biologia das células estaminais e da engenharia de tecidos.

Reperusão

A isquémia tecidular já foi aqui abordada com respeito à doença cardíaca e vascular, e sê-lo-á novamente a propósito do acidente vascular cerebral. Mas a forma como o organismo reage à **reperusão** do coração, cérebro, e até mesmo dos membros traumatizados, órgãos transplantados e retinopatia merece aqui uma referência. Visto que a hipoperusão celular resulta em acumulação rápida de metabolitos ácidos destrutivos, radicais livres de oxigénio e, portanto, danos celulares, com fluxo sanguíneo insuficiente as mitocôndrias ficam rapidamente disfuncionais. Ao contrário do que pudesse parecer lógico, a reposição da irrigação sanguínea não melhora este estado, coloca sim as mitocôndrias já debilitadas em *stress* adicional: na sequência do aumento da permeabilidade celular, influxo de cálcio e libertação de mais radicais livres. Com efeito, gera-se inflamação que agrava o

problema, resultando em disfunção microvascular, hiperinflamação e sucumbência das células [35]. Restaurar o fluxo sanguíneo pode assim causar a morte adicional de células face à resposta inflamatória agressiva. A terapia celular intravenosa com MSCs depois de restaurada a irrigação vem contrapor-se a esta situação e melhora o cenário, porque ao mesmo tempo que estimula neovascularização reduz a inflamação prejudicial (cascatas inflamatórias, citocinas e complemento), via sinalizações parácrina e autócrina. Este efeito de “tolerância” e regulação da resposta imune é essencialmente mediado pela enzima **indoleamina 2,3 dioxigenase (IDO)**: a mesma que participa no evitar da rejeição na incompatibilidade materno-fetal, envolvida também na defesa do hospedeiro contra patógenos, na capacidade de camuflagem/evasão do tumor, entre outras [35]. Estes efeitos estão associados ao recrutamento e mobilização IDO-dependente de linfócitos T reguladores e citocinas como a IL-10. Esta constatação pode ter relevância também para outros fenómenos imunes e inflamatórios, como transplante de órgãos e cancro [35].

Neurodegenerativas

No sistema nervoso, o **envelhecimento normal** faz-se acompanhar de alterações *estruturais, bioquímicas e funcionais* no cérebro, assim como alterações *neurocognitivas* (eg, orientação e memória). As alterações estruturais concretizam-se através da expansão dos ventrículos, perda de volume cerebral focal, baixa da plasticidade neuronal e degradação de alguns circuitos. As manifestações bioquímicas do envelhecimento traduzem-se nos neurotransmissores, com decréscimo dos receptores dopaminérgicos D1,

D2 e D3, tal como dos serotoninérgicos, e ainda de transportadores, como o 5-HT glutamato [29].

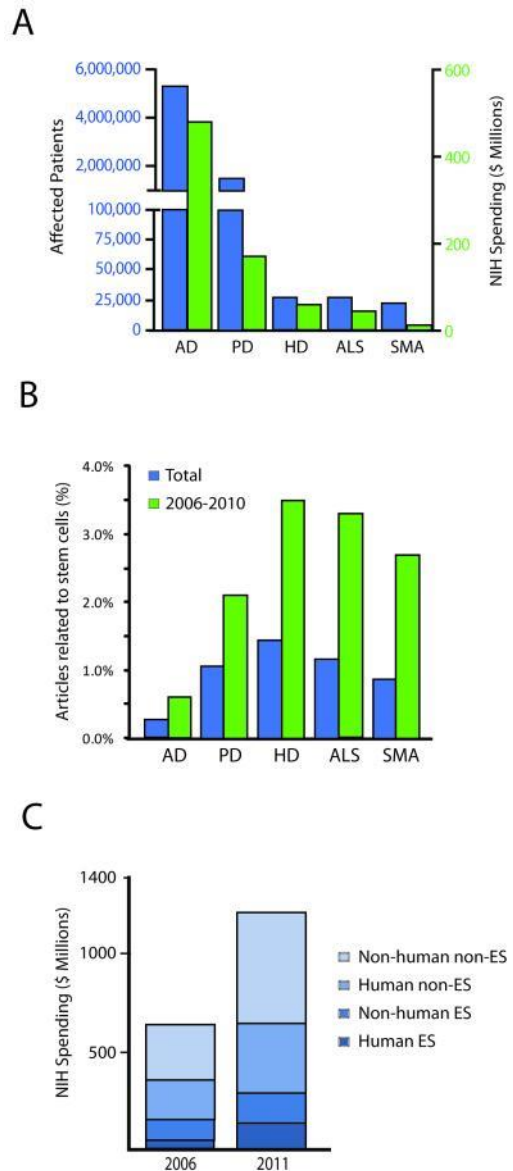
As doenças neurodegenerativas caracterizam-se, essas sim, por perda de neurónios no cérebro ou na medula espinhal. A **neurodegeneração aguda** pode ser causada por um insulto circunscrito no tempo, como um AVC ou um traumatismo, que se repercute numa perda localizada de neurónios. A **neurodegeneração crónica** desenvolve-se ao longo de um período prolongado de tempo, e pode afectar um subtipo de neurónios em particular ou resultar numa perda neuronal generalizada.

Figura 11 (retirada de Lunn, 2011)

- A. Prevalência das doenças nos USA confrontada com o investimento pelo National Institutes of Health (2011)**
- B. Literatura disponibilizada acerca das novas tecnologias celulares no âmbito das diversas doenças neurodegenerativas**
- C. Tipo de células, espécie proveniente e respectivo investimento pelo NIH.**

AD: Doença de Alzheimer; PD: Doença de Parkinson; HD: Doença de Huntington; ALS: esclerose lateral amiotrófica; SMA: atrofia muscular espinhal

No **cérebro**, as doenças de Alzheimer e de Huntington provocam perda difusa de neurónios, enquanto Parkinson afecta neurónios específicos, dopaminérgicos, localizados na *substantia nigra*. No **tronco cerebral e**



medula espinhal, a esclerose lateral amiotrófica envolve degeneração dos neurónios motores. A esclerose múltipla pode afectar tanto o cérebro como a medula espinhal, assim como a isquémia, mas em extensões variáveis. Também o glaucoma, na impossibilidade de um tratamento eficaz, é uma doença do envelhecimento dramática e mutilante. Todas estas patologias possuem peculiaridades; como tal, os mecanismos de perda neuronal afiguram-se complexos e embargam, por enquanto, a descoberta de tratamentos eficazes. A ausência de terapias eficientes para estas doenças representa – pelo número de pessoas afectadas e pelos enormes encargos que originam – um terreno atractivo e mesmo privilegiado para os investigadores em células estaminais [36] (figura 11, 12).

Doença de Alzheimer

A **doença de Alzheimer** é a demência neurodegenerativa mais comum, e também a sexta causa de morte dos EUA [37]. A sua descrição no início do século XX por Alois Alzheimer já compreendia, para além

Parâmetro	Factor libertado pelas MSCs
Modulação do sistema imunitário	Proteoglicanos de condroitina Prostaglandina <u>E</u> Tenascina-C
Neuroprotecção	Factor neurotrófico derivado das células da glia Factor de crescimento nervoso
Crescimento axonal, diferenciação e plasticidade sináptica	Metaloproteinases da matriz <i>Neurocan</i> <i>Phosphacan</i> Inibidores teciduais das metaloproteinases

Figura 12 Aspectos potencialmente influenciados pelo transplante de MSC. Baseado em Roll, 2014.

do quadro demencial, a diminuição do volume encefálico total, em particular da

substância cinzenta, o aumento dos ventrículos cerebrais e o depósito de proteínas amilóides e tau. As placas senis e os emaranhados de neurofibrilas são marcos típicos no doente com Alzheimer, sendo causa de citotoxicidade ao nível dos neurónios, que em geral começa pelas áreas da memória e da linguagem para se estender, eventualmente, ao restante cérebro. Paralelamente, ocorre um decréscimo nas concentrações dos neurotransmissores como a acetilcolina, a somatostatina, serotonina e epinefrina [37].

Surgem então duas abordagens possíveis para o doente com Alzheimer: ou contrariar a formação das placas neurotóxicas, ou contrabalançar os défices no sistema colinérgico. Presentemente, a prática faz-se em função da última: inibidores da colinesterase como a rivastigmina, donezepil e galantamina, atenuam de facto os danos colinérgicos, mediando mesmo alguma recuperação da concentração e funções cognitivas [37]. A resistência medicamentosa e os efeitos secundários são, não obstante, importantes o suficiente para a hipótese amilóide/tau ser resgatada. E é aqui que as células estaminais voltam a convir – quer para substituição directa dos neurónios em falta quer por indução das células estaminais endógenas (*neural precursor cells*, NPCs) com potencial neuroprotector. É certo que o referido efeito pode ser obtido por estímulo de compostos químicos diversos, desde alopregnanolona, fluoxetina, fator estimulador de colónias de granulócitos (G-CSF), AMD3100 e SDF-1 α . Mas os resultados mais satisfatórios têm sido verificados, afinal, com a terapia celular [37].

Um estudo da equipa de Shin et al. concentrado na clearance de placa beta-amilóide demonstrou que as MSCs amplificam a via de autofagia, favorecendo a sobrevivência de neurónios, tanto *in vitro* como *in vivo* [31]. Entretanto, foi reportado que também os

sintomas de Alzheimer podem ser atenuados pelo transplante de MSCs no modelo animal: a melhoria funcional surgirá como consequência da *diminuição* de deposição de proteína beta-amilóide, menor produção do seu precursor, e activação da micróglia. A activação da micróglia, por sua vez, diminui a libertação de factores pró-inflamatórios, aumenta a emissão das citocinas anti-inflamatórias e a expressão de neprilisina (a enzima que degrada a proteína beta-amilóide) [37]. Emergiram assim também resultados promissores no sentido da modulação do ambiente inflamatório da doença de Alzheimer.

Adicionalmente, no modelo experimental, a co-cultura de MSCs e microglia de rato parece amplificar a expressão de neprilisina [37].

Doença de Parkinson

A **doença de Parkinson** é a segunda doença neurodegenerativa mais comum, e tem uma prevalência de 2% em indivíduos com mais de 70 anos [38]. Esta doença atinge primariamente

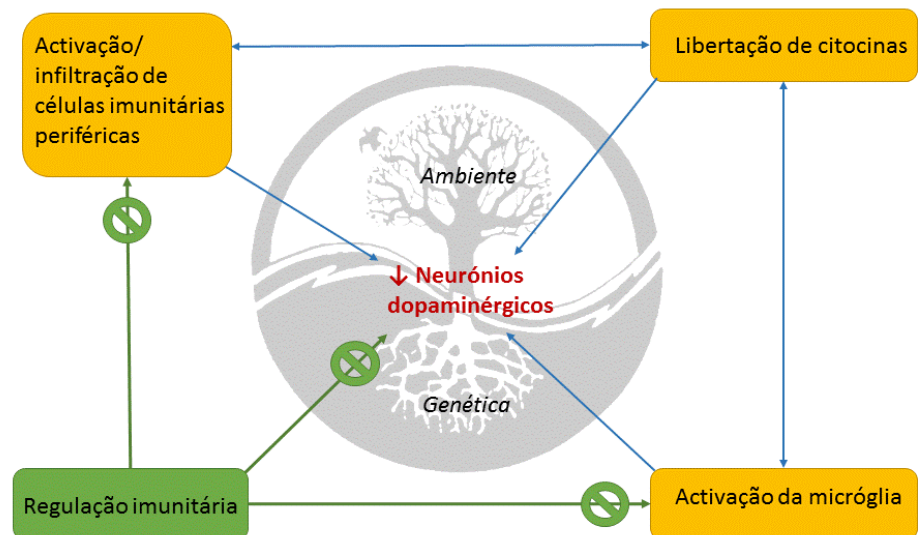


Figura 13 A importância dos distúrbios imunitários na perda de neurónios dopaminérgicos, e o potencial terapêutico da regulação imune no tratamento da Doença de Parkinson. Baseado em Chao, 2014.

os neurónios dopaminérgicos, cujos corpos celulares estão na *substantia nigra pars compacta* e os axónios no *striatum*. Como consequência, a degradação destas células diminui sucessivamente a quantidade de dopamina estriatal, que vai ser transmitida ao tálamo, finalmente manifestando-se em diminuição do *output* motor. Observam-se pois sintomas motores, como bradicinesia, rigidez e instabilidade postural. Outros sintomas, como o tremor parkinsoniano, parecem estar associados a uma componente não dopaminérgica [38].

Em 2014 foi publicado um artigo que expõe uma série de mediadores moleculares (citocinas, receptores) envolvidos na doença de Parkinson incipiente [39]. De acordo com ele, vários factores genéticos e ambientais mal conhecidos agridem os neurónios (lesão cerebral aguda, infecção, químicos nocivos...), ao que os neurónios danificados reagem com neuroinflamação (figura 13). Paralelamente, a activação das células da glia/microglia parece favorecer a activação da via NFκB, e o consequente despoletar do processo inflamatório com infiltração de leucócitos (linfócitos T, em particular) recrutados do sangue periférico que atravessam mesmo a barreira hemato-encefálica. Em consonância com esta conjectura, tratamentos experimentais nos modelos animais, como terapia génica com genes anti-inflamatórios ou simplesmente administração de anti-inflamatórios não-esteróides (AINEs), têm sugerido, realmente, menor activação da microglia e menos degeneração neuronal [39].

A actividade modulatória das MSCs pode, no futuro, revelar-se muito útil também nesta vertente da Doença de Parkinson. Para já, a sintomatologia é, de facto, controlada eficazmente por fármacos, mas este efeito não resiste ao início de perturbação motora

mais profunda. Nesta fase resta somente o recurso à estimulação cerebral profunda e a poucos outros que, novamente, controlam os sintomas sem serem capazes de parar ou reverter a doença. A oportunidade das células estaminais decorre, então, do seguinte pressuposto: quando restaurada a transmissão dopaminérgica no *striatum*, tem lugar a recuperação da função [38].

A investigação com células estaminais no âmbito da doença de Parkinson começou pelo transplante de tecido fetal – que hoje já não se admite, porque se revelou tumorigénico e, claro, eticamente problemático. Não tardou até as MSCs se insinuarem superiores, por serem fáceis de isolar e aplicar, e capazes de transpor a barreira-encefálica [29] – o que permitia serem transplantadas sem recurso a métodos invasivos.

Nesta sequência, já no laboratório, as MSCs provaram estimular o crescimento neuronal endógeno, inibir a produção de citocinas inflamatórias (TNF- α , IL-2, 6 e 12, e IFN γ), diminuir a apoptose celular, encorajar a conexão sináptica nos neurónios danificados, regenerar os neurónios hospedeiros, segregar factores tróficos neuroprotectores (EGF, VEGF, NT3, HGF, BDNF, outros), partilhar as suas mitocôndrias com células danificadas e reduzir os radicais livres (e logo o *stress* oxidativo no hipocampo) [29, 31, 40]. A oxidação persiste, porém, como um obstáculo à diferenciação e sobrevivência das MSCs (*in vitro* e *in vivo*). Para isto, vários investigadores têm estudado nanoestruturas, de carbono ou de nitreto de silício (SiNx) que orientam, aceleram e ainda permitem avaliar o crescimento neuronal [40, 41]. O objectivo é futuramente implantar estes pequeníssimos tubos, como *stents* mas da espessura de um cabelo, onde sejam necessários, para promover a regeneração neuronal em locais lesionados. De momento,

os nanotúbulos de carbono já provaram ser biocompatíveis com as MSCs e as células estaminais neuronais (*in vitro* e *in vivo*) [40]. Já os microtúbulos de SiNx serão brevemente apetrechados com eléctrodos para estudar o sinal eléctrico no axónio. Aguardam-se avanços neste campo da Nanomedicina.

Recapitulando, o que se pretende das MSCs é providenciar o alívio dos sintomas e reverter a progressão da doença onde outros tratamentos já não têm efeito. Em animais, já se demonstrou a substituição de neurónios dopaminérgicos danificados, assim como de outros neurónios, células de suporte neuronal e estruturas vasculares (lesadas pela injeção) [38]. Observou-se também que as MSCs aumentam os níveis de dopamina e tirosina hidroxilase [31]. Em laboratório, é ainda possível induzir uma modificação genética das MSCs que provoca maior secreção de factores específicos, ou uma percentagem adicional de diferenciação das MSCs para células dopaminérgicas. Por exemplo, Barzilay e colegas utilizaram lentivírus com o gene LMX1a para alterar o perfil de expressão (génica) das células no sentido de se assemelharem mais aos neurónios mesodiencefálicos, o que favorece a sua diferenciação para neurónios dopaminérgicos [31].

Em 2010, decorreu um ensaio clínico com MSCs autólogas em 7 humanos com Parkinson (administradas por cirurgia estereotáxica). De uma forma geral, confirmou-se uma melhoria na escala UPDRS (*Unified Parkinson's Disease Rating Scale*), melhoria subjectiva de sintomas (como a expressão facial, marcha, episódios de *freezing*) e conseguiu-se, inclusive, a redução das doses dos agonistas dopaminérgicos nalguns deles. Este resultado foi atribuído a diferenciação das MSCs em células produtoras de

dopamina. Não obstante, este estudo não é conclusivo isoladamente, tendo em conta o número diminuto de pacientes envolvidos e a ausência de grupo controlo [42].

No artigo de Young coloca-se uma questão pertinente: haveria vantagem na utilização de células alogénicas, que não carregassem potencialmente as mutações causadoras da doença? Sublinha depois que, a fazer-se, deverá ter-se em atenção a concordância de géneros (as células estaminais femininas não se comportam da mesma forma num ambiente rico em testosterona, e vice-versa com os estrogénios) e de grupos sanguíneos (ABO, Rho-D positivo/negativo) [38]. Termina explicando que as células autólogas não serão problema, mesmo comportando uma mutação importante, já que a doença de Parkinson só se viria a manifestar nas células transplantadas depois de diferenciadas e perto do final do seu ciclo de vida.

Isquémia cerebral

As **lesões isquémicas cerebrais** são o tipo mais importante de acidente vascular cerebral (AVC), e constituem a causa primeira de morbilidade grave a longo termo nos EUA. A trombólise é o único tratamento disponível, mas está limitada pela sua curta janela terapêutica e pelo risco hemorrágico implicado. Nesta área, aposta-se no potencial de substituição das células afectadas pelas MSCs, mas principalmente nos factores tróficos e de crescimento (ou estímulo à libertação de tais factores), consequentemente levando à amplificação do potencial endógeno de reparação neuronal [43].

Tal como no miocárdio isquémico, a regeneração do cérebro isquémico depende de factores secretados por células estaminais, sejam estas endógenas (células estaminais neurais = *neural stem cells*, NSCs), ou transplantadas [40, 44]. A emissão de factores pró-angiogénicos, como o VEGF, é crítica na reparação de lesões pós-AVC. Também factores neurotróficos como o NGF e o factor neurotrófico derivado do cérebro (*brain-derived neurotrophic factor*, BDNF) são secretados pelas células estaminais neurais e parecem melhorar inclusive a reparação de lesões na medula espinhal (por moderação da apoptose) [44]. Comprovadamente, estes factores também podem ser secretados por MSCs, e são, em especial, propensas a isso quando cultivadas em meio condicionado já ele próprio com VEGF, NGF e BDNF [44].

In vivo, os resultados são, claro está, menos lineares deparando-se com duas grandes dificuldades: o *stress* oxidativo e a hipóxia.

O **stress oxidativo** e os metabolitos tóxicos lentificam a regeneração tecidular e reduzem a longevidade das MSCs transplantadas. Os nanotúbulos de carbono oferecem aqui também uma alternativa possível de suporte à diferenciação das MSCs.

Mais do que o *stress* oxidativo, a reposição da citoarquitECTURA do tecido destruído depara-se com uma série de condições próprias da isquémia que incluem **inflamação**, libertação de **células necróticas** e formação de **cicatrices gliais**. A sobrevivência das células do enxerto está assim condicionada, pelo que o transplante de células estaminais deve ser substancial: vários milhões de células devem ser injectados [43].

Na isquémia, as MSCs irão ser, naturalmente, atraídas pelo gradiente de citocinas que sinalizam lesão tecidular: molécula de adesão celular vascular-1 (*vascular cell adhesion*

molecule-1, VCAM-1), SDF-1, proteína quimiotática de monócitos-1 (*monocyte chemoattractant protein-1*, MCP-1), quimiocina CC (ligante do motivo CC) (*chemokine (C-C motif) ligand 2*, CCL2...). Aproximadamente 1/3 das células vem a migrar para a área enfartada, sendo que somente 2-20% das MSCs vêm a **integrar os circuitos neuronais** – como o comprova a expressão dos marcadores neuronais correspondentes. No modelo animal, as células estaminais têm capacidade de regenerar muitos fenótipos de neurónio, como GABA-érgicos, glutamatérgicos, dopaminérgicos, interneurónios, e até, em percentagens inferiores, astrócitos e microglia [43].

Mas, como noutras patologias, a reintegração das MSCs da estrutura neuronal tem um papel secundário quando comparado com o efeito das células indiferenciadas, que mais ou menos perto da lesão contribuem com factores de crescimento para suporte regenerativo directo ou indirecto (por estímulo das células residentes) das células isquémicas. O factor neurotrófico derivado das células da glia (*glial cell-derived neurotrophic factor*, GDNF), BDNF e o IGF-1 já foram identificados como implicados na **protecção** induzida por células estaminais nos casos da hipóxia neonatal ou oclusão da artéria cerebral média. As **propriedades imunossupressoras** também são importantes, porque as MSCs têm capacidade de diminuir os danos resultantes da inflamação pós-isquémia, ao moderar a emissão de mediadores pró-inflamatórios, o recrutamento de células inflamatórias e a própria activação perilesional tanto de astrócitos como de elementos da microglia. A **angiogénese** também é uma vertente muito importante no AVC isquémico. Uma angiogénese demasiado exuberante pode agravar o edema e entrar mesmo em hemorragia, mas o desenvolvimento ideal de vasos afigura-se

fundamental para a reperfusão da lesão e regiões adjacentes e para restabelecer o metabolismo normal no tecido cerebral, e as MSCs transplantadas contribuem para o estado pro-angiogénico pós-isquémico durante mais de 2 semanas. Células estaminais podem ser geneticamente modificadas para expressar VEGF, factor de crescimento placentário (PIGF, *placental growth factor*) e Ang-1 (entre outros!) em quantidades adicionais. O transplante de células estaminais, comprovadamente, estimula a **proliferação de células progenitoras e neuroblastos** da zona subventricular ipsilateral, durante um período prolongado de tempo. Porém, não é clara a correspondência entre aumento da neurogénese e recobro funcional pós-AVC. Uma ressalva para esclarecer que angiogénese e neurogénese não são entidades totalmente independentes: de facto, em estudos *in vivo*, o bloqueio da angiogénese com endostatina atenua substancialmente a migração de neuroblastos para a regiões isquémica, com ou sem terapia celular, sugerindo a existência daquele que é chamado “nicho neurovascular”. Finalmente, a **remodelação da substância branca** também tem sido verificada, por exemplo, com prevenção da redução isquémica do corpo caloso após tratamento com MSCs.

Na prática, em modelos animais, verificou-se que com MSCs houve melhoria da função senso-motora/redução dos défices funcionais, aumento da sinaptogénese, estímulo da regeneração nervosa, menos danos induzidos pelo activador do plasminogénio tecidular (*tissue plasminogen activator*, tPA) e imunomodulação (quando administradas 1-7 dias após AVC) [43].

Quanto aos progressos em humanos, sabe-se que decorrem neste momento uma dezena de estudos em fase II, mas ainda é cedo para falar em resultados (*clinicaltrials.gov*).

Outras doenças neurodegenerativas

Depois de se constatar que, no modelo do ratinho, as MSCs atrasavam o início da esfingomielinase ácida (interveniente na doença de Niemann-Pick) e melhoravam a sobrevivência, testou-se na **esclerose lateral amiotrófica** (ELA) em doentes refractários às terapêuticas. Na ELA, a implantação de MSCs resulta em diminuição da morte de neurónios motores (por acções parácrinas), e aumento do número de conexões neuromusculares [29, 31]. No ensaio clínico verificou-se uma tendência gradual para a recuperação de força muscular (carece-se de informação sobre a durabilidade do efeito) [40]. Em ratinhos transgênicos notou-se, finalmente, o atraso da incidência da doença e a melhoria das funções motoras, com o contributo potencial da neurogenina 1 como indutor da neurogênese [45].

A **esclerose múltipla** (EM) apresenta-se com neuroinflamação crónica: células T auto-reactivas infiltram-se no sistema nervoso central através de uma barreira hemato-encefálica enfraquecida, causando destruição da mielina e danos secundários dos oligodendrócitos e axónios [31, 46]. Infelizmente, não existem terapias capazes de frenar a fase progressiva da doença – os tratamentos são paliativos e vêm associados a efeitos secundários que muitas vezes impedem o seu uso a longo termo. Testes com MSCs em animais têm produzido alguma imunomodulação mas são relativamente impotentes na reposição dos oligodendrócitos (regeneração da mielina), perante a distribuição ampla das lesões e as lesões na substância cinzenta [31, 46]. As propriedades neuro-

regenerativas e o potencial para reparação inclusive da barreira hemato-encefálica [46], com reacções adversas mínimas, asseguram mesmo assim que se continue a investigação com MSCs; entretanto, esperam-se para breve os resultados de um estudo para a EM recidivante [31].

A **doença de Huntington** manifesta-se entre os 35 e os 45 anos de idade, com dificuldades motoras, problemas cognitivos, demência e perturbação afectiva. Resulta de um número anormal de repetições do trinucleotídeo CAG no gene de Huntington, e a sua abordagem actual fica-se pelo tratamento sintomático dirigido a cada um dos 3 domínios afectados: psiquiátrico, do movimento e da cognição... O efeito dos fármacos é difícil de avaliar, pela amplitude do espectro de apresentação da doença.

A terapia celular tem sido explorada como potencial (e verdadeira) cura para a doença, baseando-se na substituição das células mortas e neuroprotecção das lesadas. A capacidade de conversão das MSCs em células neuronais tem sido confirmada em ensaios, bem como a capacidade de secreção de factores neuroprotectores, entre factores de crescimento, quimiocinas e citocinas. Estudos recentes com ratinhos mostram que o transplante intraestriatal de MSCs reduz a atrofia estriatal, apesar da permanência muito limitada (7 dias) das células transplantadas [47]. Entretanto, investe-se na possibilidade de modificação genética das MSCs, com vista a prolongar o seu efeito, e, portanto, ampliar as respectivas funções neurogénica e citoprotectora. A sobrevivência neuronal, neurogénese, diminuição da inflamação e activação mitocondrial são mediadas pelos factores parácrinos já nossos conhecidos: VEGF, HGF, IGF-1, IGF-2 e SDF-1.

Teoricamente, estes efeitos positivos resultarão em protecção e reparação das células neuronais, e assim, inibição da progressão da doença de Huntington [47].

Para além das doenças neurodegenerativas referidas nos parágrafos anteriores, merece referência o **glaucoma**, que afecta a retina de uma forma progressiva e irreversível, à luz do conhecimento actual. A base molecular do glaucoma é complexa, sendo que entre os vários mecanismos que causam degeneração das células ganglionares da retina estão: lesão primária do axónio, privação de factores neurotróficos, isquémia, *stress* oxidativo, disfunção mitocondrial e inflamação. Cumulativamente, tem lugar uma degeneração gradual das células ganglionares da retina, resultando em defeito no campo visual, que pode culminar na perda irreversível da visão do doente. As terapêuticas praticadas actualmente atrasam a progressão da doença e limitam a perda da visão na maior parte dos doentes, mas noutros os tratamentos em voga não surtem este efeito nem são capazes de reestabelecer a pressão intraocular aos parâmetros normais. O potencial contido nas MSCs reside na sua capacidade de produzir os factores neurotróficos, incluindo o BDNF, factor neurotrófico ciliar (CNTF, *ciliary neurotrophic factor*), GDNF e o factor de crescimento dos fibroblastos básicos (bFGF, *basic fibroblast growth factor*). Encontra-se em curso, presentemente, o primeiro ensaio clínico neste âmbito na Flórida (NCT01920867 em *clinicaltrials.gov*), fase II, dirigido não só ao glaucoma, como à doença macular degenerativa, doença do nervo óptico e várias doenças da retina [48]. No modelo animal com degeneração macular relacionada com a idade, o transplante subretinal de MSCs promove sobrevivência dos fotorreceptores, retarda regeneração da retina e preserva-lhe a sua função [29].

Marcação com radioisótopos, pré-condicionamento e modificação genética

Foram exploradas patologias variadas que podem vir a dar matéria de estudo para os vários anos que se seguem. A realidade é que, no âmbito da terapêutica com MSCs, há inúmeras variáveis a controlar, entre as quais se explicitam três: a via de administração, o pré-condicionamento e a modificação genética.

A incerteza que persiste acerca dos mecanismos terapêuticos motiva a utilização de técnicas de imagem para investigar a biodistribuição das MSCs transplantadas, recorrendo a **marcação com radioisótopos** [49]. Segue-se um exemplo simples: no modelo de rato com lesão compressiva da medula espinhal constatou-se por tomografia computadorizada por emissão de fóton único (*single photon emission computed tomography*, SPECT) que a administração intravenosa de MSCs resultava numa distribuição visceral (baço, fígado, rins) das células marcadas com índio-111, com pouca afluência à lesão. Pelo contrário, a injeção para o interior da cavidade centromedular resultou em abundância de células no local da lesão, durante pelo menos 10 dias. Naturalmente, há riscos quando se adopta uma técnica mais invasiva; mas nem sempre tem que ser assim. A injeção estereotáxica é um dos 3 mecanismos mais populares para a introdução das células estaminais por forma a ultrapassarem a barreira hematoencefálica até às cisternas sub-aracnoideias do sistema nervoso central [38]. A injeção estereotáxica é eficiente, mas, evidentemente, um procedimento invasivo, assim como a injeção intratecal (ou *reversed spinal tap*). Graças às novas técnicas de imagem,

descobriu-se na Alemanha (University Hospital of Tubingen) outra estratégia eficiente de administração dos MSCs aos doentes neurológicos, e francamente menos invasiva: intranasal. A administração intranasal aumenta comprovadamente os níveis de tirosina hidroxilase no *striatum* e *substantia nigra* lesados, baixando os valores de 6-hidroxi-dopamina (toxina) e citocinas pró-inflamatórias [40] – apresentando-se como uma alternativa mais segura para o tratamento da doença de Parkinson. Similarmente, estudos desta natureza revelar-se-ão muito úteis para avaliar a migração e fixação das células, a correlação da sua profusão com os efeitos positivos verificados, comparação com locais de reacção adversa (hemorragia, neoplasia...) e ainda determinação das doses e vias mais eficientes para os tratamentos.

O **pré-condicionamento** é uma forma extraordinária de mobilização dos mecanismos endógenos para optimização do potencial terapêutico das MSCs. Observou-se que as células expostas a hipóxia sub-letal pré-transplante vêm a sua tolerância e propriedades regenerativas beneficiadas, assim como a sua capacidade de sobrevivência. São responsáveis por estes efeitos o factor-1 humano indutível por hipóxia (*hypoxia-inducible factor 1*, HIF) e outros factores tróficos, como sejam: BDNF, GDNF, VEGF, eritropoetina, SDF-1 e respectivos receptores [43]. Adicionalmente, fica frenada a emissão de citocinas pró-angiogénicas e parece haver maior diferenciação para neurónios e endoteliócitos – enfim, os animais que recebem estas células pré-condicionadas com hipóxia apresentam uma melhoria funcional mais eficiente que o grupo de controlo com células normóxicas [43]. Outros elementos “gatilho” já estudados no pré-condicionamento são: anóxia, monóxido de carbono, peróxido de hidrogénio, mediadores

como eritropoetina, IFG-1, proteínas de choque térmico (*heat shock proteins*), e vários agentes farmacológicos (mais recentemente, o cobalto protoporfirina e a apelina) [43].

Outra forma de rentabilizar o potencial terapêutico das MSCs é a **modificação genética**. Como se processa? As MSCs podem ser preparadas com lentivírus, adenovírus ou outros vírus comuns, no sentido de pré-incorporar genes angiogênicos, ou neuroprotectores, no sentido de amplificar continuamente os efeitos parácrinos das células [43, 50]. Por enquanto, porém, ainda não há experiência ao nível de clínica para testar a segurança e eficiência desta estratégia. Teme-se o potencial de transformação maligna, e a ambivalência da terapêutica. O equilíbrio é delicado: i.e., se o VEGF estimula angiogénese e neurogénese, também vem a aumentar a permeabilidade vascular, arriscando-se agravar o eventual edema [43].

Diabetes

Com o avançar da idade, resulta o aumento da obesidade central visceral à custa de triglicérides que se acumulam no músculo, fígado e células pancreáticas. Paralelamente, dá-se um incremento na libertação de ácidos gordos, glicerol, hormonas, citocinas pró-inflamatórias e, logo, macrófagos, que somam à senescência celular habitual para culminar no desenvolvimento de resistência à insulina. A subsequente incapacidade de controlar a glicémia define, efectivamente, a **diabetes tipo II**. Quanto ao **tipo I**, apresenta-se semelhante à II nos estadios mais avançados: ocorre perda e disfunção de células β -pancreáticas e perda de insulina.

Com o aumento da longevidade não restam dúvidas de que a diabetes e respectivas complicações têm vindo a ganhar volume (morbilidade e mortalidade), e conta-se mesmo que a escalada continue a acompanhar o aumento da obesidade. A importância da obesidade também é agravada por causas evolutivas de ordem genética e ambiental, que afectam a função das células β -pancreáticas e a sensibilidade dos tecidos à insulina [29].

Um pilar importante da regulação da glicémia na diabetes tipo I ou tipo II avançada é a administração de insulina injectável. Mesmo com a divulgação dos aparelhos para controlo da glicémia, do aperfeiçoamento dos dispositivos para a administração e também das formulações dos análogos de insulina, esta continua a não reproduzir a regulação precisa conseguida pelas células β na homeostasia da glicose, persistindo riscos significativos de hipoglicémia e complicações – apesar de haver hoje menos complicações microvasculares que em 1980, quando o gene da insulina foi primeiramente sequenciado [51]. Carecendo actualmente de cura para a diabetes insulino-dependente, o transplante de células β -pancreáticas é atractivo, insinuando-se como alternativa às injeções de insulina, assim como o próprio transplante total do pâncreas, pois estes permitem um controlo aproximadamente fisiológico da glicémia, logo, reduzindo as complicações nervosas e a dependência de insulina a longo-termo [52]. No entanto vê-se limitado pela disponibilidade de órgãos/ ilhéus de doadores e pela necessidade de imunossupressão [31].

Quando foi primeiro tentado em doentes com pancreatite crónica, em 1980, o transplante de ilhéus β -pancreáticos (e.g., para o espaço subcutâneo) seria uma alternativa minimamente invasiva para a substituição das células β -pancreáticas. Duas décadas

depois, este trabalho foi transposto, experimentalmente, para os doentes com diabetes tipo 1 [25]. Entretanto, tem-se mostrado ineficaz para a manutenção da insulino-independência a longo-termo, o que se atribui primariamente a isquémia resultante de vascularização insuficiente e do próprio ambiente hipóxico pós-transplante (logo, sobrevida limitada dos ilhéus). O componente imune também não pode ser desprezado, posto que ocorre com alguma frequência rejeição dos excertos, apesar do uso de imunossuppressores potentes [25]. Neste ponto, os estudos apontavam para duas variáveis a explorar: o sítio para o transplante e o controlo da resposta imunitária [53].

Com efeito, são vários os locais onde se implantaram as células, entre eles o fígado, baço, cápsula renal, testículos, cérebro, cavidade peritoneal, omento, medula óssea, músculo, gordura epididimal, etc. [53], e o espaço subcutâneo foi o que de facto se apresentou mais simples e menos invasivo. A questão da vascularização tentou contornar-se com recurso a malhas de biomateriais diferentes, com ou sem aplicação adicional de factores pró-angiogénicos, mas com resultados muito modestos [53].

Enfim, apostou-se no controlo da resposta imunitária. A actividade imunomoduladora pelas MSCs já foi descrita na secção a isso destinada. Essencialmente, a interacção célula-a-célula e a secreção de factores parácrinos (neste caso: TGF- β 1, HGF, óxido nítrico, IDO, PGE-2, MMP-2 e 9 e IL-6) vêm a controlar

tanto a resposta imunitária inata como adaptativa, ao conter a proliferação,

migração e função de células B, T e NK [51]. Simultaneamente, inibem a produção de anticorpos e imunoglobulinas, maturação das células dendríticas e activação de neutrófilos. Como tal, a rejeição dos ilhéus é refreada pela co-administração de MSCs, o que se traduz, logo à partida, numa maior sobrevida dos ilhéus enxertados [51].

Com efeito, dependendo das condições do meio de cultura, as MSCs podem afectar ambas: a sobrevivência e a funcionalidade dos ilhéus β -pancreáticos [52]. O contacto directo condiciona uma diferenciação preferencial das MSCs em células produtoras de insulina (por aumento da expressão de Pdx, *pancreatic and duodenal homeobox 1*: o

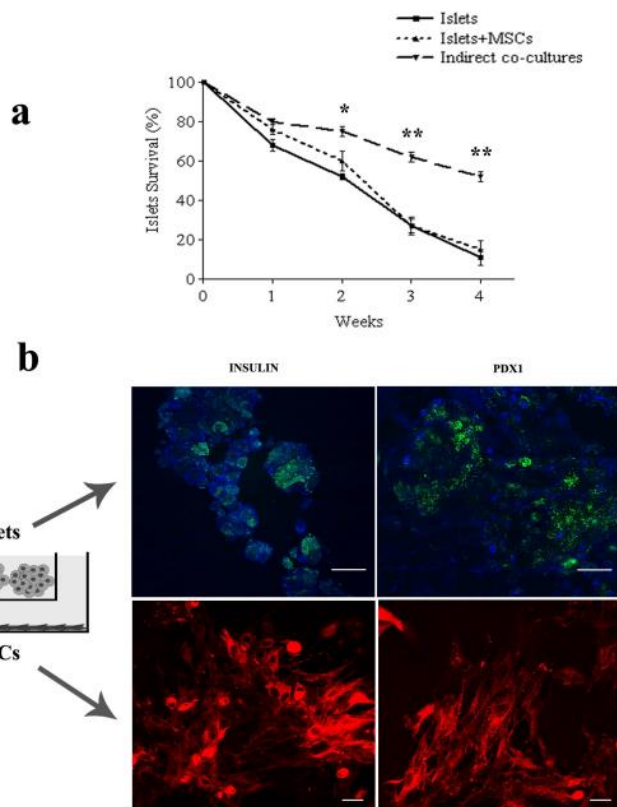


Figura 14 Resultado da cultura simples de ilhéus β -pancreáticos, co-cultura directa e indirecta com MSCs, ao longo de 4 semanas. Nota-se uma clara melhoria da sobrevivência para os ilhéus de co-cultura indirecta com MSCs. Imagem retirada de Scuteri, 2014.

factor promotor da produção de insulina). Ao mesmo tempo, a co-cultura indirecta (em que as MSCs e os ilhéus ficam fisicamente separados por um *Transwell*, partilhando os factores tróficos) favorece a sobrevivência dos ilhéus (figura 14) [52]. As MSCs são manifestamente capazes de segregar VEGF, factor de von Willebrand e outros factores de crescimento, e de induzir a proliferação de (ou transformar-se em) componentes dos vasos sanguíneos, como células endoteliais e musculares lisas [25, 52]. A melhoria da vascularização reflecte-se, sem dúvida, na optimização metabólica das células β e na diminuição do número de células necessárias para controlar a glicémia [25].

Sinteticamente, o co-transplante de ilhéus pancreáticos e MSCs interfere no processo da remodelação, preserva a estrutura tridimensional dos ilhéus (mantêm a integridade da membrana e portanto as suas propriedades) e melhora a revascularização. Também fica aumentada a capacidade de restituir a normoglicémia, seja por produção directa de insulina (pelas células diferenciadas) ou por aumento da sobrevivência dos ilhéus [29, 52]. Sabe-se ainda que as MSCs alogénicas e xenogénicas podem inclusivamente induzir **regeneração do pâncreas** (*cross-talk* trófica MSCs/pâncreas) e reduzir assim a glicémia, favorecendo mesmo o aumento de peso pós-transplante [31]. Estudos *in vitro* e *in vivo* atestam que o transplante de MSCs em animais melhora a regeneração de células progenitoras por secreção de factores angiogénicos, citoprotectores, anti-inflamatórios, mitogénicos e anti-apoptóticos [31]. Finalmente, o efeito inibidor das MSCs sobre a resposta imunitária parece prevenir (ou pelo menos atrasar) a rejeição de ilhéus alogénicos, e melhora mesmo a função dos transplantes implantados.

É possível que exista ainda um benefício adicional se, junto aos ilhéus β -pancreáticos e às MSCs, se transplantarem ainda fibroblastos. Um artigo da PLoS ONE sustenta que a adição dos fibroblastos melhorou a sobrevivência dos ilhéus de xenotransplante assim como das MSCs, ao reforçar o potencial pró-angiogénico das MSCs, logo, reduzindo a hipóxia [53]. Também há quem atribua aos fibroblastos propriedades imunossupressoras *MSC-like*... São necessários mais estudos para clarificar esta cooperação.

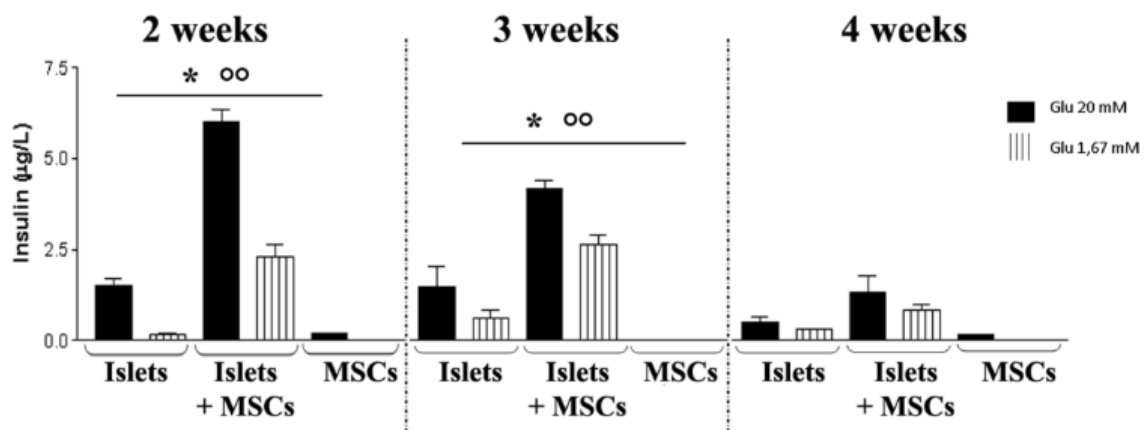


Figura 15 Produção de insulina pelos ilhéus pancreáticos, ilhéus de cultura directa com MSCs e MSCs cultivadas isoladamente, ao serem expostos às concentrações indicadas de glicose. Gráfico proveniente de Scuteri, 2014.

Outra linha de pensamento sugere que as MSCs, ao serem capazes de se diferenciar em células β -pancreáticas funcionais, sob determinadas condições, **possam ser suficientes, por si só, para suprir a produção de insulina no organismo.**

Se o meio de cultura das MSCs tiver *low serum* e factores de crescimento como o peptídeo glucagina-like 1 (GLP-1, *glucagon like peptide 1*) ou análogos, induz-se a diferenciação das MSCs em células que expressam insulina e partilham algumas propriedades das células β [51]. Já foi provada a eficácia destas células diferenciadas na diminuição da

glicémia em doentes com diabetes induzida por estreptozotocina, apesar do processo de diferenciação e produção de insulina ser pouco eficiente [51] (figura 15). Outra abordagem seria forçar a sobre-expressão de factores de transcrição pancreática, como Pdx,

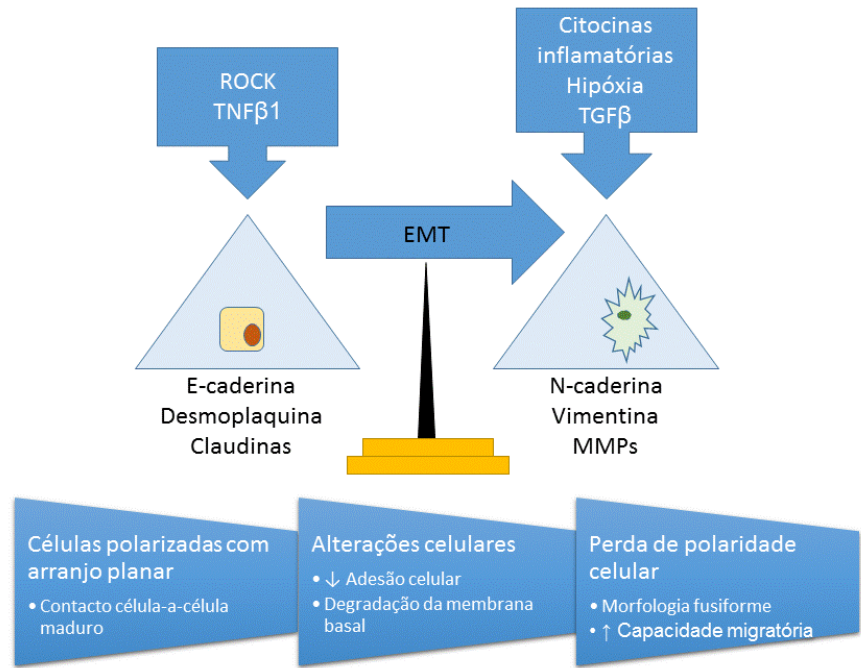


Figura 16 Transição epitelial-para-mesenquimatosa, os seus determinantes e efeitos.

Ngn3, MafA e Pax4, em combinação com factores de crescimento e reagentes que se sabem capazes de alterar a estrutura da cromatina. Mas quando esta estratégia foi tentada, obtiveram-se células predominantemente α -like, grandes produtoras de glucagina, mas pobres em insulina [51]. Algumas alterações recentes melhoraram, porém, este panorama com incremento da produção de insulina ao ponto de reverter as hiperglicémias em ratos imunocomprometidos e diabéticos por estreptozotocina. Estas alterações, concretamente, foram: uso de material de cultura fresco e bloqueio da transição epitelial-para-mesenquimatosa (*epithelial-to-mesenchymal transitioning*, EMT) com proteína-cinase associada a rho (*rho-associated protein kinase*, ROCK) e inibidores do TGFβ1 [51]. Se EMT é o processo de transdiferenciação do fenótipo das células epiteliais para o das

células mesenquimatosas; o que se faz é reprimir as características epiteliais e amplificar as características fenotípicas mesenquimatosas das MSCs (figura 16).

Entretanto pode surgir uma questão: porque motivo não são as MSCs nativas do organismo suficientes para obter os efeitos acima descritos? Na verdade, sabe-se actualmente que a hiperglicémia da diabetes é tóxica para as BM-MSCs, induzindo senescência celular e apoptose por intermédio dos produtos glicosados finais (*advanced glycation end products*). Simultaneamente, a hiperglicémia faz aumentar as espécies reactivas de oxigénio, que afectam directamente a biodisponibilidade dos factores parácrinos implicados na mobilidade de células estaminais da medula. Consequentemente, as MSCs endógenas não são, isoladamente, suficientes para melhorar o controlo da glicémia nem a história natural da doença [29].

Tratamento das complicações

As consequências mais frequentes da diabetes são: complicações microvasculares (retinopatia, nefropatia, neuropatia), complicações macrovasculares (doença das artérias coronárias e periféricas), cardiomiopatia diabética e cicatrização de feridas prolongada ou incompleta.

Na diabetes tipo 2, idade ou idade ao diagnóstico de diabetes e duração da doença estão associadas independentemente com o risco de queixas macrovasculares e morte. Diagnosticados mais velhos e diabetes mais prolongadas aumentam proporcionalmente o risco de eventos macrovasculares e morte (maior risco nos idosos com mais anos de

doença). Há interação entre idade ou idade ao diagnóstico e a duração da diabetes no risco de eventos microvasculares. Os eventos microvasculares são reduzidos com a idade ou idade ao diagnóstico, de tal forma que o risco é mais pronunciado nos grupos mais jovens com maior duração da doença (maior duração da hiperglicémia provou-se mais importante do que a intensidade). Em suma, a prevenção de eventos macrovasculares faz-se em todas as idades e estádios da doença, os microvasculares, preferencialmente nos mais novos [54].

No tratamento das complicações da diabetes, as MSCs afiguram-se muito úteis pela sua capacidade de diferenciação em múltiplos tecidos. Enxertadas nos **rins**, as MSCs diferenciam-se em células endoteliais e possivelmente mesangiais. Na **retina** isquémica, alojam-se nas zonas danificadas, e diferenciam-se em células endoteliais, microglia e astrócitos. Na **disfunção erétil**, geram músculo liso, endotélio e *target genes*. Na **neuropatia**, fomentam a neovascularização; libertação de VEGF-A, FGF-2, SDF-1, e factores neurotróficos [55]. Na **cardiopatia**, injectados intramusculares, melhoram função ventricular, aumentam densidades de miócitos e capilares, atenuam apoptose, reduzem fibrose. Finalmente, nas **feridas**, diferenciam-se em fibroblastos e queratinócitos, promovem a neovascularização e regeneração tecidual, e recrutam ainda células inflamatórias para as feridas, facilitando a angiogénese em membros isquémicos [29, 56].

Sobre este último, em 2014 foi divulgado um caso-clínico em que um doente diabético com corte na mão (de aproximadamente 5x3 cm) se apresenta sem dor 24h depois do transplante de MSCs autólogas. Às 48h ocorreu alívio do edema, redução da área da ferida

e diminuição das secreções purulentas... atingindo a cura total às 192h (= 8 dias). Não há dúvida que se justifica a investigação com MSCs no campo da diabetes [56].

Oncologia

A doença oncológica representa um dos maiores flagelos que acomete os seres vivos, destacando-se, como sabemos, pela sua prevalência e prognóstico. Actualmente, os maiores desafios neste âmbito residem no diagnóstico oportuno e tratamento do cancro. Do tratamento, desejar-se-ia que fosse eficaz e com os mínimos efeitos secundários. Hoje, contudo, na prática clínica, esta realidade permanece distante, principalmente nos cancros avançados, sendo que os efeitos secundários sistémicos do tratamento incluem lesão tecidual e mesmo mutações genómicas, com todas as consequências que daí decorrem.

Os progressos recentes na Engenharia Genética e o conhecimento sucessivo de mais biomarcadores com impacto na fisiopatologia dos tumores propiciaram o investimento numa estratégia de ataque para o cancro, baseada nas propriedades das células estaminais. Assim, socorrendo-se da sua facilidade de expansão, tropismo para o tecido canceroso e imunoprevilégio, as MSCs afiguram-se um vector interessante para o **transporte de (trans)genes**, que se pretende que entrem no organismo, qual “cavalo de Tróia”, e actuem unicamente nas células cancinogénicas [57, 58].

Para além das moléculas anticancerígenas naturais às MSCs (TNF, *TNF related apoptosis inducing ligand* – TRAIL, IFN- β ...), os genes transferidos para as células tumorais podem ser indutores de suicídio (*suicide gene therapy*), destruir o tumor directa ou indirectamente (*oncolytic virotherapy*) ou ainda reforçar a resposta imunitária do organismo ao tumor (*genetic immunotherapy*) [57, 59].

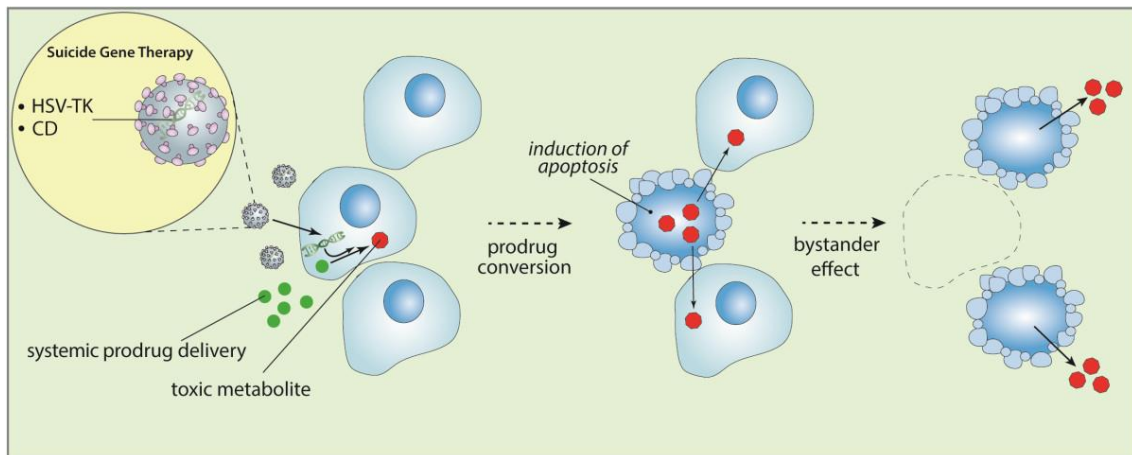


Figura 17 O objectivo da terapia com gene suicida é aumentar a distribuição de metabolitos tóxicos às células tumorais. A administração do pró-fármaco irá resultar na formação de um metabolito tóxico que determina a morte tanto das células transduzidas como das não transduzidas com o gene, através do chamado efeito *bystander*. Imagem de Okura, 2014.

Na *suicide gene therapy* são conversores de pró-fármacos não tóxicos em agentes verdadeiramente citotóxicos (figura 17). Por exemplo, a introdução do gene timidina cinase do *herpes simplex* (HSV-TK) nas células neoplásicas, que por sua vez gera uma enzima que metaboliza o pró-fármaco Ganciclovir num produto tóxico selectivo para todas as células TK+ (*in vitro* e *in vivo*) [60]. Outro exemplo bem conhecido usa do gene bacteriano da citosina deaminase (CD) para converter a flucitosina em 5-fluorocitosina (5-FC), que será o metabolito activo [59].

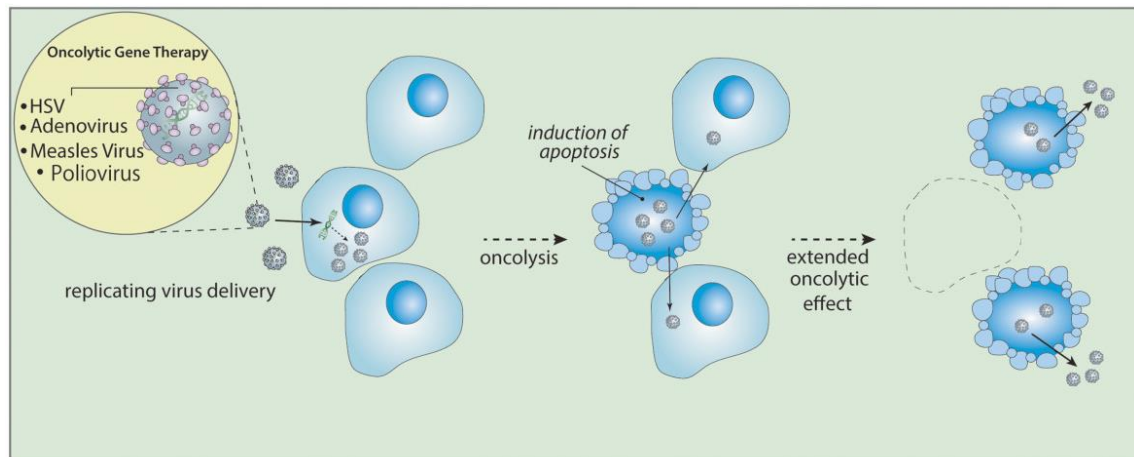


Figura 18 A terapia génica oncolítica emprega a replicação selectiva de vírus competentes em células tumorais alvo. A dispersão para novas células adjacentes ocorre com a lise das células hospedeiras. Imagem de Okura, 2014

Na **terapia oncolítica** (figura 18), ocorre auto-replicação selectiva do vírus dentro das células neoplásicas, que amplificam os genes terapêuticos e libertam partículas virais para as células adjacentes, culminando em lise das células hospedeiras [59]. Devido a deleções na maquinaria de síntese nucleotídica do vírus geneticamente programando, este só terá capacidade de se replicar nas células em mitose, como as células malignas neoplásicas. Para além destes efeitos, a terapia oncolítica resulta também em alguma hipersensibilidade aos agentes antivirais [61]. Os resultados melhoram quando ocorre simultaneamente uma resposta imune anti-tumor e disrupção do microambiente tumoral, e.g., por inibição da angiogénese [61].

Finalmente, a **imunoterapia genética** (figura 19) visa aumentar a resposta imunitária anti-tumoral, mediada pelas citocinas, células T e outras células (como as apresentadoras de antígenos, etc.). Por exemplo, MSCs transportadoras de IFN- α induzem a acumulação de células na fase S e apoptose. O transporte de IL-12 e IL-18, por sua vez, tem sido adoptado para recrutamento de células T e NK, com o benefício adicional da IL-12

prevenir a metastização para gânglios e outros órgãos, com incremento da apoptose [62]. Apesar de já ter provas dadas, em termos de segurança e ensaios clínicos, esta abordagem é mais frequentemente aplicada em combinação com uma das anteriores, porque persiste uma dificuldade significativa em ultrapassar a questão da transfecção.

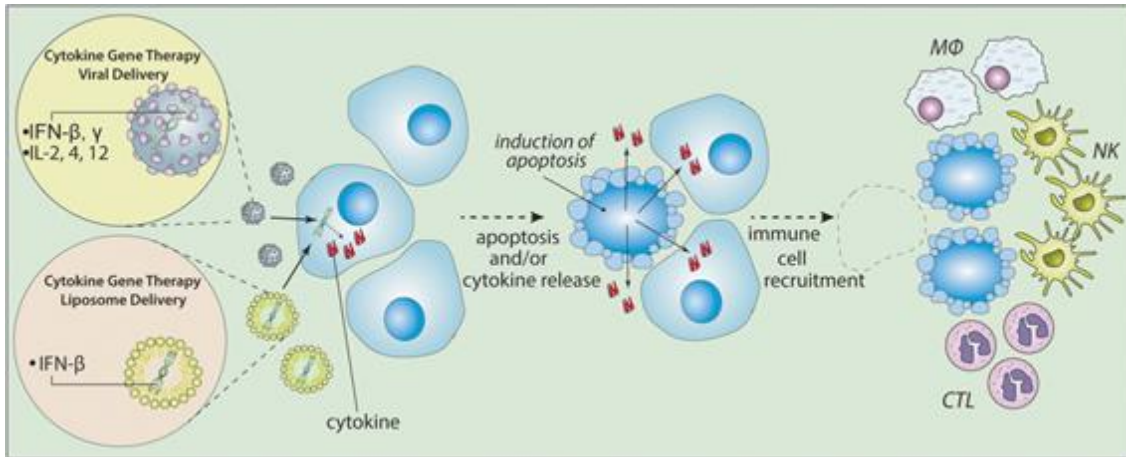


Figura 19 A imunoterapia genética mediada por citocinas envolve transferência *in-situ* de genes (como IL, ou IFN) capazes de recrutar células imunocompetentes tais como macrófagos, NK e linfócitos T citotóxicos. Imagem de Okura, 2014.

Em laboratório, têm sido avaliadas estas possibilidades no contexto de neoplasias várias: cerebral, cabeça e pescoço, mamária, ovárica, pulmonar, pancreática, sarcoma, hepatocelular, colo-rectal, prostática, hematológica e dermatológica [46, 57, 58, 63].

Glioblastoma

Tomemos como exemplo o caso do **glioblastoma**.

O glioblastoma merece destaque pela sua localização e prognóstico, sendo que é uma doença altamente incapacitante, com risco baixo de metastização mas com uma sobrevida reduzida. Para além de sabermos que ultrapassam a barreira hemato-encefálica, testes com MSCs e diversos genes têm revelado a capacidade de amplificar a resposta imune dirigida ao tumor (IL-2, IL-18, IL-12, IFN- γ) e mesmo inibir o seu crescimento (CD/5-FC) em modelos animais [58]. Com efeito, a FDA aprovou recentemente um estudo clínico piloto com CD/5-FC.

Já foi confirmada a segurança das terapêuticas com *suicide gene*, mas num dos maiores estudos com HSV-TK (fase III) constatou-se que a eficácia da transfecção do gene para as células desejadas era insuficiente (<10%, que era o mínimo necessário para ocorrer redução do volume tumoral) [61]. Entretanto, têm-se feito variar a origem dos genes (adenovírus parece melhorar o perfil da transfecção) e dos vectores. O único vector sintético que ainda não foi posto de parte é o liposoma catiónico [61], de resto tem-se investido especialmente nas NSCs e MSCs. A maior vantagem das NSCs é a sua facilidade de invadir as células tumorais [61]. As MSCs têm a enorme vantagem de serem de recolha fácil, sendo também caracterizadas por serem atraídas e invadirem o tumor naturalmente.

Quanto à terapia oncolítica, a injeção de vírus (ex, G207 ou HSV1716, derivados do *herpes simplex virus*) por cirurgia estereotáctica também já provou ser segura em humanos com gliomas malignos ou recorrentes (nenhuma encefalite foi observada) e, mais ainda, foi detectado um efeito benéfico na sobrevivência de muitos dos doentes, um dos quais chegou a sobreviver 5.5 anos após o tratamento [61]. A mesma molécula

também está a ser experimentada no melanoma avançado. Ultimamente, está em ensaios pré-clínicos o vírus G47Delta, também derivado do HSV, modificado adicionalmente para expressar mais MHC de classe I, por modo a gerar uma resposta imune mais intensa.

Alternativamente há os adenovírus (AV), que são captados por endocitose pelas células (estejam elas quiescentes ou em replicação) mas não integram o genoma da célula. ONYX-015 e Ad5Delta24 são os vírus mais estudados. Os AV permanem em pequenos episomas e replicam-se com recurso à maquinaria celular intrínseca [61]. Teoricamente, o facto de não se inserirem no genoma das células diminui o risco mutagénico.

Outros vírus e outras técnicas são também, claro, relevantes, mas excede as pretensões deste artigo mencioná-los a todos. Independentemente das suas especificações, a terapia génica tem apresentado resultados decepcionantes nos estudos de fase II e III. Esta falência tem-se associado ao facto de os estudos envolverem exclusivamente doentes com doença muito avançada, e a alguma “falta de robustez pré-clínica”, no sentido da optimização da terapêutica no anteriormente aos ensaios com doentes [59]. A sinergia entre terapêuticas pode melhorar o panorama no presente estado da arte.

Ainda a propósito do tratamento do glioblastoma, o protocolo actual do tratamento inclui ressecção cirúrgica, rádio e quimioterapia. Neste e noutros tumores da cabeça e do pescoço, a **xerostomia** é uma consequência indesejada da radioterapia. Ultimamente, têm sido feitos ensaios em ratinhos que se revelam muito promissores ao nível da restituição do tecido glandular, angiogénese, anti-apoptose e antifibrose, por efeitos parácrinos dependentes de factores de crescimento (VEGF, metaloproteinases...) e também por diferenciação directa das MSCs em glândulas salivares [64]. As MSCs podem ser

extraídas do tecido adiposo, para conforto máximo dos doentes. Sabe-se também que o co-transplante de MSCs e células progenitoras do sangue periférico em doentes a fazer quimioterapia em doses elevadas é possível e seguro, sendo que resulta num efeito hematopoiético positivo [29].

Células estaminais cancerígenas vs mesenquimatosas

A afinidade entre as MSCs e o cancro não se prende unicamente pela viabilidade terapêutica. Estando claro que as MSCs têm tropismo para o tecido neoplásico e inflamatório, são inúmeros os artigos que hoje apontam as similitudes entre este tipos de células e as cancerígenas, desconhecendo-se se, na realidade, o papel das MSCs no cancro não poderá ser também agravante.

As MSCs têm várias características em comum com as células neoplásicas. Tal como as células MSCs, também as células cancerígenas manipulam o ambiente através de acções parácrinas: protecção da apoptose e estímulo da neovascularização. A maior parte das MSCs parece ser proveniente dos **pericitos**³/células endoteliais; e conhece-se igualmente

³ Pericitos são células abluminais que estão em contacto íntimo com a membrana basal e células endoteliais em redor que compõem a microvasculatura, das arteríolas precapilares até às pequenas veias colectoras

relação de muitos cancros com os nichos endoteliais. Gliomas, regulação da dormência do cancro da mama; inclusivamente, o glioblastoma é capaz de se diferenciar em pericitos e as metástases cancerígenas estão fortemente relacionadas com células endoteliais [44, 65]!

O principal mecanismo que explicaria o potencial maligno das MSCs advém das suas propriedades imunomoduladoras, que provavelmente se baseiam na expressão variável de receptores Toll-like, responsáveis pela iniciação da resposta imune inata e adaptativa [57]. Efectivamente, em 2007 foi demonstrado pela equipa de Karnaub que a injeção simultânea de MSCs e células cancerígenas de neoplasia mamária aumentava o risco de metastização (ainda que não se tenha demonstrado aumento significativo de volume da lesão primária) [57]. Este mesmo fenómeno foi observado em outros tipos de tumores (leucemia, neoplasia hepática, pancreática...), e explica-se como sendo uma “contaminação cruzada”. Pelo contrário, demonstrou-se também a possibilidade das MSCs terem um papel supressivo na formação do tumor, através da via das proteínocinas activadas por mitogénio p38 (MAPK, *mitogen-activated protein kinase*) [57].

Vale a pena frisar que o comportamento das células é muito variável de acordo com a origem das células, a metodologia de administração, *in vivo/in vitro*; e está aqui,

[21]. É esta localização perivascular que lhes permite o recrutamento mais rápido para o local das lesões focais onde vêm a actuar como reguladores do micro-ambiente e regeneração tecidual [65].

provavelmente, a explicação para os resultados aparentemente contraditórios em cima apontados [57]. No fim de contas, o comportamento do próprio tumor e tecidos circundantes permanece uma “caixa negra” para todos os efeitos práticos. Assim, a este ponto, só se pode afirmar com certeza que o conhecimento crescente dos mecanismos envolvidos no cancro traçará o limite entre a actividade supressora e estimulante das MSCs face ao cancro.

Outros...

Nesta última secção, serão inumeradas algumas outras vertentes da terapêutica com MSCs. Devido às limitações de espaço, não receberão uma descrição detalhada, mas merecem seguramente referência e estarão devidamente exploradas, para todos os efeitos, nos artigos da bibliografia.

No âmbito da doença musculo-esquelética degenerativa crónica, as MSCs na osteoporose revelaram-se encorajantes e seguras [29], assim como nas doenças degenerativa dos discos e das cartilagens [7, 29]. Avanços têm acontecido também no tratamento da distrofia muscular de Duchènne, osteonecrose e osteogénese imperfeita [31]. Também no tratamento de fracturas (para acelerar a cura ou melhorar a incorporação de enxertos ósseos) parece haver vantagens na aplicação de MSCs [66]. A aplicação concomitante dos progressos em Engenharia dos Materiais e Engenharia Genética tem o potencial de aperfeiçoar o produto, por exemplo: com moldes tridimensionais (*scaffold*) para obtenção

de peças híbridas mais resistentes e adaptadas, com produção extraordinária de factores bioactivos ou ainda com estímulos mecânicos precisos que proporcionam ao neotecido propriedades mecânicas e microscópicas mais fiéis ao equivalente natural [67]. O suporte na cicatrização de feridas e a regeneração de tendões são outras áreas com interesse crescente [7, 68]. Finalmente, há hoje ferramentas para criar enxertos ósseos autólogos no peritoneu de ratinhos sobre um molde empregnado em BMP-2, usufruindo da tendência à calcificação na membrana peritoneal (por recrutamento de MSCs endógenas) quando existem cateteres neste tecido [69].

No ramo da Otorrinolaringologia, tem havido um investimento importante no âmbito do tratamento da surdez sensorial, como é a presbiacúsia, tão frequente entre os idosos. Malgrado o esforço, os resultados têm sido até agora muito modestos [68].

No campo da Urologia, há hoje estudos com MSCs em modelos experimentais para o tratamento da incontinência de *stress*, disfunção erétil e disfunção vesical por obstrução (por estreitamento uretral ou outra alteração que condicione fibrose e diminuição da distensibilidade/contractibilidade da bexiga) [70].

A descoberta recente da capacidade de diferenciação das MSCs em tecido gonadal (*in vitro* e *in vivo*) parece adequada para o tratamento de deficiência de hormonas decorrente do envelhecimento [71]; seja nos homens – em que a diminuição da testosterona causa aumento de peso e hipertensão, seja nas mulheres pós-menopáusicas – que frequentemente sofrem de osteoporose como consequência da deficiência de estrogénios.

Nas últimas décadas tem-se investido em diferentes estratégias para induzir tolerância no transplante, mas infelizmente nenhuma se revelou segura e eficiente. Contudo, com o

advento da terapia celular, surgiu a possibilidade de utilizar o potencial imunomodulador das MSCs na prevenção do efeito enxerto *vs* hospedeiro (*graft vs host disease*, GvHD). Efectivamente, em ensaios clínicos, as MSCs mostraram-se capazes de atenuar a incidência de GvHD, apresentando mesmo um efeito hematopoiético positivo quando administradas a par do transplante de medula óssea [40]. No transplante de órgãos sólidos, estudos clínicos com transplantados renais revelaram diminuição duradoura do número de linfócitos CD4+ e CD8+ de memória, com um aumento gradual dos Treg durante os primeiros 30 dias pós-transplante [72]. Esta combinação reflecte um ambiente pró-tolerogénico.

Também pelo seu perfil imunológico, as MSCs têm sido exploradas, com sucesso, como tratamento experimental nas diversas doenças auto-imunes, como as enteropatias auto-imunes, a encefalomielite auto-imune, a artrite reumatóide e o lúpus [29, 31].

O potencial das MSCs não se esgota aqui: várias doenças hepáticas, a asma crónica, a própria DPOC e variadas afecções renais também têm sido alvo de investigação incessante [29, 31, 40]. O leque de possibilidades parece renovar-se a cada dia, com o progresso da Engenharia Biomédica.

Discussão e Conclusão

As terapias celulares baseadas em MSCs têm-se revelado muito promissoras nos ensaios pré-clínicos, aguardando a sua realização plena em cenário clínico. Evidentemente, fora do laboratório existem inúmeras variáveis para as quais as recomendações são actualmente escassas. Para além da transposição dos protocolos do animal para o Ser Humano ser complexa, não há consenso sobre a melhor fonte de MSCs, as condições de cultura ideais para cada caso (pré-condicionamento? co-culturas?), a melhor forma de administração, os tempos ou sequer a quantidade de células. Por outro lado, todos os estudos têm negado fenómenos adversos derivados da administração das MSCs, para além dos locais, que variam em função das técnicas de administração. Os maiores receios recaem, porém, na possibilidade de transformação maligna destas células indiferenciadas. Quanto às dificuldades, acusar-se-ão no decurso dos ensaios; hoje colocam-se principalmente as questões da imunocompatibilidade com o alotransplante, da viabilidade na utilização de células de doentes com defeitos genéticos e da retenção das MSCs nos capilares (do baço, pulmões, etc.).

Os ensaios pequenos e com voluntários já em deterioração avançada do seu estado de saúde são tendencialmente pouco esclarecedores e pessimistas nos seus resultados. O estudo da fisiologia normal das MSCs e da sua função pode ser o ponto de partida para descobertas reveladoras que alumiem a caminho para uma translação clínica eficiente (figura 20). Entretanto, talvez os ensaios maiores e com maior duração tragam consigo a eficiência para acompanhar o entusiasmo dos investigadores.

A despeito de todas estas reticências, no mês de Dezembro de 2014 foi autorizado o primeiro tratamento com células estaminais na Europa⁴. A substância activa do Holoclar são células epiteliais da córnea expandidas *ex-vivo*, contendo células estaminais. Entretanto, continuam a eclodir ideias para aplicar as MSCs para atenuar as consequências do envelhecimento (em Janeiro de 2015 uma equipa de investigadores da Flórida desenvolveu um protocolo para criar papilas dérmicas a partir de MSCs humanas, tendo-se inclusivamente comprovado a sua capacidade de desenvolver folículos pilosos em ratinhos – estamos perante a tão ambicionada cura para a alopecia?).

A par da evolução da nanotecnologia, da engenharia genética, da farmacogenómica e da engenharia de materiais, a tendência natural é que a terapia celular com MSCs se aperfeiçoe

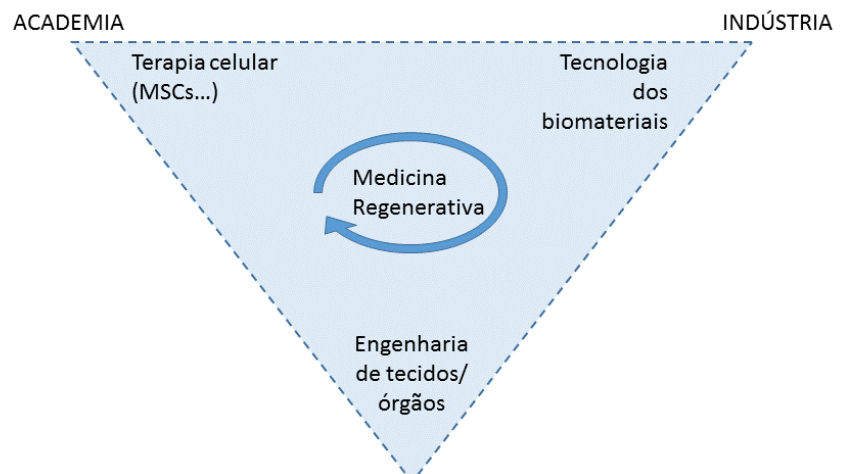


Figura 20 Representação da dinâmica complexa da Medicina Regenerativa com os diversos domínios. A linha a tracejado denota a flexibilidade deste sistema, admitindo evolução dos elementos. Adaptado de Andrades, 2011.

muito rapidamente. Aqueles que depositam mais esperanças nas terapias celulares estão

⁴ European Medicines Agency, *press release* de dia 19/12/2014 [73].

convictos que no futuro, depois de contermos as conseqüências do envelhecimento, possamos actuar ao nível das suas causas, com o apoio da biogerontologia. Já os pessimistas preocupam-se com as implicações sociais destas melhorias.

A tentação é grande; as derrotas podem-nos fazer vacilar, mas não perder a coragem de avançar porque as conquistas são uma fonte de motivação... Sempre, na senda da Ciência e da Ética médica; não dando lugar a esperanças excessivas ou a charlatanismos!

Agradecimentos

Dedico a minha Tese de Mestrado a todos os que me apoiaram na sua realização. Em particular, deixo uma saudação ao Professor Manuel Santos Rosa. Não quero, no entanto, passar sem deixar uma nota calorosa para os meus cordiais companheiros de caminhada: o estimulante café, que me aqueceu e animou consistentemente durante este percurso tortuoso, e a *internet*, que, apesar das suas armadilhas e manhas, me instruiu com material mais que suficiente para reflectir e escrever. O café e a *internet* são, ademais de tudo, prova incontornável de que o Homem é capaz de Grandes Descobertas.

Referências bibliográficas

- [1] Davidovic M, Sevo G, Svorcan P, Milosevic D, Despotovic N, Erceg P. Old age as a privilege of the “selfish ones”. *Aging and disease* [Internet]. 2010 [cited 25 January 2015];1(2):139-146. Available from: <http://www.aginganddisease.org>
- [2] Jin K. Modern Biological Theories of Aging. *Aging and Disease* [Internet]. 2010 [cited 25 January 2015];1(2):72-74. Available from: <http://www.aginganddisease.org>
- [3] who.int. WHO | Facts about ageing [Internet]. 2015 [cited 20 August 2014]. Available from: <http://www.who.int/ageing/about/facts/en/>
- [4] Brody J, Schneider E. Diseases and disorders of aging: An hypothesis. *Journal of Chronic Diseases*. 1986;39(11):871-876.
- [5] Tchkonina T, Morbeck D, Von Zglinicki T, Van Deursen J, Lustgarten J, Scoble H et al. Fat tissue, aging, and cellular senescence. *Aging Cell*. 2010;9(5):667-684.
- [6] Goldman D, Cutler D, Rowe J, Michaud P, Sullivan J, Peneva D et al. Substantial Health And Economic Returns From Delayed Aging May Warrant A New Focus For Medical Research. *Health Affairs*. 2013;32(10):1698-1705.
- [7] Andrades J, Claros S, Jimenez-Palomo P, Ma J, ZamoraNavas P, Guerado E et al. Skeletal Regeneration by Mesenchymal Stem Cells: What Else?. *Regenerative Medicine and Tissue Engineering - Cells and Biomaterials*. 2011.

- [8] Prockop D, Phinney D, Bunnell B. Mesenchymal stem cells. Totowa, NJ: Humana Press; 2008. 27-44.
- [9] Guo S, DiPietro L. Factors Affecting Wound Healing. *Journal of Dental Research*. 2010;89(3):219-229.
- [10] Ennis W, Sui A, Bartholomew A. Stem Cells and Healing: Impact on Inflammation. *Advances in Wound Care*. 2013;2(7):369-378.
- [11] Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8(4):315-317.
- [12] Caplan A. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res*. 1991;9(5):641-650.
- [13] Woodbury D, Schwarz E, Prockop D, Black I. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *Journal of Neuroscience Research*. 2000;61(4):364-370.
- [14] Chen L, Jiang X, Yang L. Differentiation of rat marrow mesenchymal stem cells into pancreatic islet beta-cells. *World J Gastroenterol*. 2004;10(20):3016-3020.
- [15] Zanini C, Bruno S, Mandili G, Baci D, Cerutti F, Cenacchi G et al. Differentiation of Mesenchymal Stem Cells Derived from Pancreatic Islets and Bone Marrow into Islet-Like Cell Phenotype. *PLoS ONE*. 2011;6(12):e28175.

- [16] Pournasr B, Mohamadnejad M, Bagheri N, Shahsavani M. In vitro differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells into hepatocyte-like cells. *Arch Iran Med.* 2011;14(4):244-9.
- [17] Oswald J, Boxberger S, Jørgensen B, Feldmann S, Ehninger G, Bornhäuser M et al. Mesenchymal Stem Cells Can Be Differentiated Into Endothelial Cells In Vitro. *Stem Cells.* 2004;22(3):377-384.
- [18] Deak E, Păunescu V, Herman D, Siska I, Tanasie G, Bunu C et al. In vitro differentiation of human mesenchymal stem cells to epithelial lineage. *Journal of Cellular and Molecular Medicine.* 2007;11(3):502-508.
- [19] Prockop D, Phinney D. Concise Review: Mesenchymal Stem/Multipotent Stromal Cells: The State of Transdifferentiation and Modes of Tissue Repair-Current Views. *Stem Cells.* 2007;25(11):2896-2902.
- [20] Krasnodembskaya A, Song Y, Fang X, Gupta N, Serikov V, Lee J et al. Antibacterial Effect of Human Mesenchymal Stem Cells Is Mediated in Part from Secretion of the Antimicrobial Peptide LL-37. *STEM CELLS.* 2010;28(12):2229-2238.
- [21] Caplan A, Correa D. The MSC: An Injury Drugstore. *Cell Stem Cell.* 2011;9(1):11-15.
- [22] Eggenhofer E, Luk F, Dahlke M, Hoogduijn M. The Life and Fate of Mesenchymal Stem Cells. *Frontiers in Immunology.* 2014;5.
- [23] Ma S, Xie N, Li W, Yuan B, Shi Y, Wang Y. Immunobiology of mesenchymal stem cells. *Cell Death and Differentiation.* 2013;21(2):216-225.

- [24] Lotfinegad P, Shamsasenjan K, Movassaghpour A, Majidi J, Baradaran B. Immunomodulatory Nature and Site Specific Affinity of Mesenchymal Stem Cells: a Hope in Cell Therapy. *Adv Pharm Bull.* 2014;4(1):5–13.
- [25] Figliuzzi M, Bonandrini B, Silvani S, Remuzzi A. Mesenchymal stem cells help pancreatic islet transplantation to control type 1 diabetes. *WJSC.* 2014;6(2):163.
- [26] Yamawaki-Ogata A, Hashizume R, Fu X, Usui A, Narita Y. Mesenchymal stem cells for treatment of aortic aneurysms. *WJSC.* 2014;6(3):278.
- [27] Hong K, Bolli R. Cardiac Stem Cell Therapy for Cardiac Repair. *Current Treatment Options in Cardiovascular Medicine.* 2014;16(7).
- [28] Rota M, Leri A, Anversa P. Human heart failure: Is cell therapy a valid option?. *Biochemical Pharmacology.* 2014;88(2):129-138.
- [29] Peng Y, Huang S, Cheng B, Nie X, Enhe J, Feng C et al. Mesenchymal stem cells: A revolution in therapeutic strategies of age-related diseases. *Ageing Research Reviews.* 2013;12(1):103-115.
- [30] Sanganalmath S, Bolli R. Cell Therapy for Heart Failure: A Comprehensive Overview of Experimental and Clinical Studies, Current Challenges, and Future Directions. *Circulation Research.* 2013;113(6):810-834.
- [31] Farini A, Sitzia C, Erratico S, Meregalli M, Torrente Y. Clinical Applications of Mesenchymal Stem Cells in Chronic Diseases. *Stem Cells International.* 2014;2014:1-11.

- [32] Heldman A, DiFede D, Fishman J, Zambrano J, Trachtenberg B, Karantalis V et al. Transendocardial Mesenchymal Stem Cells and Mononuclear Bone Marrow Cells for Ischemic Cardiomyopathy. *JAMA*. 2014;311(1):62.
- [33] Liu J, Zhang Y, Peng H, Liu P. Progress in mesenchymal stem cells for treatment of atherosclerosis. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao*. 2013;29(11):1538-47.
- [34] Sarvazyan N. Thinking Outside the Heart: Use of Engineered Cardiac Tissue for the Treatment of Chronic Deep Venous Insufficiency. *Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics*. 2014;19(4):394-401.
- [35] Masoumy M, Yu J, Liu J, Yanasak N, Middleton C, Lamoke F et al. The Role of Indoleamine 2,3 Dioxygenase in Beneficial Effects of Stem Cells in Hind Limb Ischemia Reperfusion Injury. *PLoS ONE*. 2014;9(4):e95720.
- [36] Lunn J, Sakowski S, Hur J, Feldman E. Stem cell technology for neurodegenerative diseases. *Annals of Neurology*. 2011;70(3):353-361.
- [37] Choi S, Lee S, Kim S, Lee H. Alzheimer's Disease and Stem Cell Therapy. *Experimental Neurobiology*. 2014;23(1):45-52.
- [38] Young H, Zanini C, Black J, Robinson J. Treating Parkinson Disease with Adult Stem Cells. *Journal of Neurological Disorders*. 2013;01(02).
- [39] Chao Y, Wong S, Tan E. Evidence of Inflammatory System Involvement in Parkinson's Disease. *BioMed Research International*. 2014;2014:1-9.

- [40] Sutton M, Bonfield T. Stem Cells: Innovations in Clinical Applications. *Stem Cells International*. 2014;2014:1-9.
- [41] Froeter P, Huang Y, Cangellaris O, Huang W, Dent E, Gillette M et al. Toward Intelligent Synthetic Neural Circuits: Directing and Accelerating Neuron Cell Growth by Self-Rolled-Up Silicon Nitride Microtube Array. *ACS Nano*. 2014;8(11):11108-11117.
- [42] Venkataramana N, Kumar S, Balaraju S, Radhakrishnan R, Bansal A, Dixit A et al. Open-labeled study of unilateral autologous bone-marrow-derived mesenchymal stem cell transplantation in Parkinson's disease. *Translational Research*. 2010;155(2):62-70.
- [43] Liu X, Ye R, Yan T, Yu S, Wei L, Xu G et al. Cell based therapies for ischemic stroke: From basic science to bedside. *Progress in Neurobiology*. 2014;115:92-115.
- [44] Dittmer J, Leyh B. Paracrine effects of stem cells in wound healing and cancer progression (Review). *International Journal of Oncology*. 2014;.
- [45] Calvo A, Manzano R, Mendonça D, Muñoz M, Zaragoza P, Osta R. Amyotrophic Lateral Sclerosis: A Focus on Disease Progression. *BioMed Research International*. 2014;2014:1-12.
- [46] Wang Y, Li Z. Traceable Therapeutic Strategy for Treatment of Breast Cancer with Mesenchymal Stem Cells (MSCs). *Cancer Cell & Microenvironment*. 2014;1:125-128.
- [47] Im W, Kim M. Cell Therapy Strategies vs. Paracrine Effect in Huntington's Disease. *JMD*. 2014;7(1):1-6.

- [48] Ng T, Pelaez D, Cheung H. Progress of mesenchymal stem cell therapy for neural and retinal diseases. *WJSC*. 2014;6(2):111.
- [49] Rosado-de-Castro P, Pimentel-Coelho P, Gutfilen B, Lopes de Souza S, de Freitas G, Mendez-Otero R et al. Radiopharmaceutical Stem Cell Tracking for Neurological Diseases. *BioMed Research International*. 2014;2014:1-12.
- [50] Jung G, Sun J, Petrowitz B, Riecken K, Kruszewski K, Jankowiak W et al. Genetically Modified Neural Stem Cells for a Local and Sustained Delivery of Neuroprotective Factors to the Dystrophic Mouse Retina. *Stem Cells Translational Medicine*. 2013;2(12):1001-1010.
- [51] Muir K, Lima M, Docherty H, Docherty K. Cell therapy for type 1 diabetes. *QJM*. 2014;107(4):253-259.
- [52] Scuteri A, Donzelli E, Rodriguez-Menendez V, Ravasi M, Monfrini M, Bonandrini B et al. A Double Mechanism for the Mesenchymal Stem Cells' Positive Effect on Pancreatic Islets. *PLoS ONE*. 2014;9(1):e84309.
- [53] Perez-Basterrechea M, Obaya A, Meana A, Otero J, Esteban M. Cooperation by Fibroblasts and Bone Marrow-Mesenchymal Stem Cells to Improve Pancreatic Rat-to-Mouse Islet Xenotransplantation. *PLoS ONE*. 2013;8(8):e73526.
- [54] Zoungas S, Woodward M, Li Q, Cooper M, Hamet P, Harrap S et al. Impact of age, age at diagnosis and duration of diabetes on the risk of macrovascular and microvascular complications and death in type 2 diabetes. *Diabetologia*. 2014;57(12):2465-2474.

- [55] Mizukami H, Yagihashi S. Exploring a New Therapy for Diabetic Polyneuropathy. The Application of Stem Cell Transplantation. *Front Endocrinol.* 2014;5.
- [56] Liu Y, Liu Y, Wang P, Tian H, Ai J, Liu Y et al. Autologous bone marrow stem cell transplantation for the treatment of postoperative hand infection with a skin defect in diabetes mellitus: A case report. *Oncology Letters.* 2014;.
- [57] Yagi H, Kitagawa Y. The role of mesenchymal stem cells in cancer development. *Front Genet.* 2013;4.
- [58] Mavroudi M, Zarogoulidis P, Porpodis K, Kioumis I, Lampaki S, Yarmus L et al. Stem cells' guided gene therapy of cancer: New frontier in personalized and targeted therapy. *Journal of Cancer Research & Therapy.* 2014;2(1):22-33.
- [59] Tobias A, Ahmed A, Moon K, Lesniak M. The art of gene therapy for glioma: a review of the challenging road to the bedside. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry.* 2012;84(2):213-222.
- [60] Beck C, Cayeux S, Lupton S, Dörken B, Blankenstein T. The Thymidine Kinase/Ganciclovir-Mediated "Suicide" Effect Is Variable in Different Tumor Cells. *Human Gene Therapy.* 1995;6(12):1525-1530.
- [61] Okura H, Smith C, Rutka J. Gene therapy for malignant glioma. *Mol and Cell Ther.* 2014;2(1):21.
- [62] Hodgkinson C, Gomez J, Mirosou M, Dzau V. Genetic Engineering of Mesenchymal Stem Cells and Its Application in Human Disease Therapy. *Human Gene Therapy.* 2010;21(11):1513-1526.

- [63] Kim J, Lee H, Song Y. Stem Cell Based Gene Therapy in Prostate Cancer. *BioMed Research International*. 2014;2014:1-8.
- [64] Xiong X, Shi X, Chen F. Human adipose tissue-derived stem cells alleviate radiation-induced xerostomia. *Int J Mol Med*. 2014.
- [65] Appaix F, Nissou M, Sanden B, Dreyfus M, Berger F, Issartel J et al. Brain mesenchymal stem cells: The other stem cells of the brain?. *WJSC*. 2014;6(2):134-143.
- [66] Long T, Zhu Z, Awad H, Schwarz E, Hilton M, Dong Y. The effect of mesenchymal stem cell sheets on structural allograft healing of critical sized femoral defects in mice. *Biomaterials*. 2014;35(9):2752-2759.
- [67] Brunger J, Huynh N, Guenther C, Perez-Pinera P, Moutos F, Sanchez-Adams J et al. Scaffold-mediated lentiviral transduction for functional tissue engineering of cartilage. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2014;111(9):E798-E806.
- [68] Skoloudik L, Chrobok V, Kalfert D, Koci Z, Filip S. Multipotent mesenchymal stromal cells in otorhinolaryngology. *Medical Hypotheses*. 2014;82(6):769-773.
- [69] Shen J, Nair A, Saxena R, Zhang C, Borrelli J, Tang L. Tissue Engineering Bone Using Autologous Progenitor Cells in the Peritoneum. *PLoS ONE*. 2014;9(3):e93514.
- [70] Kim J, Lee H, Song Y. Treatment of Bladder Dysfunction Using Stem Cell or Tissue Engineering Technique. *Korean Journal of Urology*. 2014;55(4):228.

[71] Yazawa T, Imamichi Y, Miyamoto K, Umezawa A, Taniguchi T. Differentiation of mesenchymal stem cells into gonad and adrenal steroidogenic cells. *WJSC*. 2014;6(2):203.

[72] Engela A, Baan C, Dor F, Weimar W, Hoogduijn M. On the interactions between mesenchymal stem cells and regulatory T cells for immunomodulation in transplantation. *Frontiers in Immunology*. 2012;3.

[73] ema.europa.eu. European Medicines Agency - News and Events - First stem-cell therapy recommended for approval in EU [Internet]. [cited 19 December 2014]. Available from:

http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/news_and_events/news/2014/12/news_detail_002239.jsp&mid=WC0b01ac058004d5c1

Índice de ilustrações

FIGURA 1 TEORIAS DO ENVELHECIMENTO DE ACORDO COM WEINERT E TIMIRA, INTERSECTADAS COM AS TEORIAS BIOLÓGICAS MODERNAS DO ENVELHECIMENTO.	6
FIGURA 2 DECLÍNIO DAS MSCs COM A IDADE, ESTIMADO COM ENSAIO DE CFU-F (COLONY FORMING UNITS – FIBROBLAST). ADAPTADO DE CAPLAN, 2007 ADULT MESENCHYMAL STEM CELLS FOR TISSUE ENGINEERING VERSUS REGENERATIVE MEDICINE. JOURNAL OF CELLULAR PHYSIOLOGY. 213(2):341-7.	8
FIGURA 3 AS SETAS COR-DE-LARANJA E AZUIS REPRESENTAM A PLASTICIDADE DAS MSCs E DE ALGUNS DOS SEUS DERIVADOS MAIS DIFERENCIADOS. BASEADO EM CAPLAN, 2007. ADULT MESENCHYMAL STEM CELLS FOR TISSUE ENGINEERING VERSUS REGENERATIVE MEDICINE. JOURNAL OF CELLULAR PHYSIOLOGY. 213(2):341-7.	10
FIGURA 4 PRINCIPAIS MECANISMOS DE ACÇÃO DAS MSCs, E RESPECTIVOS AGENTES BIOACTIVOS. BASEADO EM MEIRELLES L, FONTES A, COVAS D, CAPLAN A. MECHANISMS INVOLVED IN THE THERAPEUTIC PROPERTIES OF MESENCHYMAL STEM CELLS. CYTOKINE & GROWTH FACTOR REVIEWS. 2009;20(5-6):419-427	11
FIGURA 5 FACTORES ENVOLVIDOS NA IMUNOSSUPRESSÃO MSC MEDIADA, E RESPECTIVOS ALVOS. BASEADO EM MA S, XIE N, LI W, YUAN B, SHI Y, WANG Y. IMMUNOBIOLOGY OF MESENCHYMAL STEM CELLS. CELL DEATH AND DIFFERENTIATION. 2013;21(2):216-225.	13
FIGURA 6 ACTIVIDADE PARÁCRINA DAS MSCs COMO IMUNOMODULADORAS.	14
FIGURA 7 MAPA EXTRAÍDO DE CLINICALTRIALS.GOV, GERADO AUTOMATICAMENTE À PESQUISA PELAS PALAVRAS-CHAVE “MESENCHYMAL+STEM+CELLS”.	17
FIGURA 8 IMAGEM PRODUZIDA PELA WORLD HEALTH ORGANIZATION, ONDE SE EVIDENCIAM AS PRINCIPAIS CAUSAS DE MORTE GLOBALMENTE. HTTP://WWW.WHO.INT/MEDIACENTRE/FACTSHEETS/FS310/EN/..	18
FIGURA 9 NA IMAGEM EVIDENCIA-SE A DIMINUIÇÃO NOTÁVEL NA MASSA DE TECIDO CICATRICIAL (DE 30,85 PARA 21,17 GRAMAS) 12 MESES APÓS TRATAMENTO COM MSCs. IMAGEM RETIRADA DE	

HELDMAN A, DiFEDE D, FISHMAN J, ZAMBRANO J, TRACHTENBERG B, KARANTALIS V ET AL. TRANSENDOCARDIAL MESENCHYMAL STEM CELLS AND MONONUCLEAR BONE MARROW CELLS FOR ISCHEMIC CARDIOMYOPATHY. JAMA. 2014;311(1):62.	22
FIGURA 10 REPRESENTAÇÃO DA PROPOSTA DE SARVAZYAN PARA O TRATAMENTO DE INSUFICIÊNCIA VENOSA PROFUNDA. NO PASSO 4, ADMITEM-SE VÁRIOS PADRÕES PARA DISPOSIÇÃO DAS CÉLULAS, SEJAM EM BARRA, ESPIRAL, VÁRIAS BANDAS SIMÉTRICAS OU OUTROS, A ESTUDAR.....	26
FIGURA 11 DOENÇAS NEURODEGENERATIVAS E INVESTIMENTOS PELA NIH. RETIRADO DE LUNN J, SAKOWSKI S, HUR J, FELDMAN E. STEM CELL TECHNOLOGY FOR NEURODEGENERATIVE DISEASES. ANNALS OF NEUROLOGY. 2011;70(3):353-361	29
FIGURA 12 ASPECTOS POTENCIALMENTE INFLUENCIADOS PELO TRANSPLANTE DE MSC. BASEADO EM ROLL L, FAISSNER A. INFLUENCE OF THE EXTRACELLULAR MATRIX ON ENDOGENOUS AND TRANSPLANTED STEM CELLS AFTER BRAIN DAMAGE. FRONT CELL NEUROSCI. 2014;8.	30
FIGURA 13 A IMPORTÂNCIA DOS DISTÚRBIOS IMUNITÁRIOS NA PERDA DE NEURÓNIOS DOPAMINÉRGICOS, E O POTENCIAL TERAPÊUTICO DA REGULAÇÃO IMUNE NO TRATAMENTO DA DOENÇA DE PARKINSON. BASEADO EM CHAO Y, WONG S, TAN E. EVIDENCE OF INFLAMMATORY SYSTEM INVOLVEMENT IN PARKINSON'S DISEASE. BIOMED RESEARCH INTERNATIONAL. 2014;2014:1-9..	32
FIGURA 14 RESULTADO DA CULTURA SIMPLES DE ILHÉUS B- -PANCREÁTICOS, CO-CULTURA DIRECTA E INDIRECTA COM MSCs, AO LONGO DE 4 SEMANAS. NOTA-SE UMA CLARA MELHORIA DA SOBREVIVÊNCIA PARA OS ILHÉUS DE CO- -CULTURA INDIRECTA COM MSCs. IMAGEM RETIRADA DE SCUTERI A, DONZELLI E, RODRIGUEZ-MENENDEZ V, RAVASI M, MONFRINI M, BONANDRINI B ET AL. A DOUBLE MECHANISM FOR THE MESENCHYMAL STEM CELLS' POSITIVE EFFECT ON PANCREATIC ISLETS. PLoS ONE. 2014;9(1):E84309.....	48
FIGURA 15 PRODUÇÃO DE INSULINA PELOS ILHÉUS PANCREÁTICOS, ILHÉUS DE CULTURA DIRECTA COM MSCs E MSCs CULTIVADAS ISOLADAMENTE, AO SEREM EXPOSTOS ÀS CONCENTRAÇÕES INDICADAS DE GLICOSE. GRÁFICO PROVENIENTE DE SCUTERI A, DONZELLI E, RODRIGUEZ-MENENDEZ V, RAVASI M, MONFRINI M, BONANDRINI B ET AL. A DOUBLE MECHANISM FOR THE MESENCHYMAL STEM CELLS' POSITIVE EFFECT ON PANCREATIC ISLETS. PLoS ONE. 2014;9(1):E84309.....	50

FIGURA 16 TRANSIÇÃO EPITELIAL-PARA-MESENQUIMATOSA, OS SEUS DETERMINANTES E EFEITOS.	51
FIGURA 17 O OBJECTIVO DA TERAPIA COM GENE SUICIDA É AUMENTAR A DISTRIBUIÇÃO DE METABOLITOS TÓXICOS ÀS CÉLULAS TUMORAIS. A ADMINISTRAÇÃO DO PRÓ-FÁRMACO IRÁ RESULTAR NA FORMAÇÃO DE UM METABOLITO TÓXICO QUE DETERMINA A MORTE TANTO DAS CÉLULAS TRANSDUZIDAS COMO DAS NÃO TRANSDUZIDAS COM O GENE, ATRAVÉS DO CHAMADO EFEITO <i>BYSTANDER</i> . IMAGEM DE OKURA H, SMITH C, RUTKA J. GENE THERAPY FOR MALIGNANT GLIOMA. MOL AND CELL THER. 2014;2(1):21.	55
FIGURA 18 A TERAPIA GÉNICA ONCOLÍTICA EMPREGA A REPLICAÇÃO SELECTIVA DE VÍRUS COMPETENTES EM CÉLULAS TUMORAIS ALVO. A DISPERSÃO PARA NOVAS CÉLULAS ADJACENTES OCORRE COM A LISE DAS CÉLULAS HOSPEDEIRAS. IMAGEM DE OKURA H, SMITH C, RUTKA J. GENE THERAPY FOR MALIGNANT GLIOMA. MOL AND CELL THER. 2014;2(1):21.	56
FIGURA 19 A IMUNOTERAPIA GENÉTICA MEDIADA POR CITOCINAS ENVOLVE TRANSFERÊNCIA IN-SITU DE GENES (COMO IL, OU IFN) CAPAZES DE RECRUTAR CÉLULAS IMUNOCOMPETENTES TAIS COMO MACRÓFAGOS, NK E LINFÓCITOS T CITOTÓXICOS. IMAGEM DE OKURA H, SMITH C, RUTKA J. GENE THERAPY FOR MALIGNANT GLIOMA. MOL AND CELL THER. 2014;2(1):21.	57
FIGURA 20 REPRESENTAÇÃO DA DINÂMICA COMPLEXA DA MEDICINA REGENERATIVA COM OS DIVERSOS DOMÍNIOS. A LINHA A TRACEJADO DENOTA A FLEXIBILIDADE DESTE SISTEMA, ADMITINDO EVOLUÇÃO DOS ELEMENTOS. ADAPTADO DE ANDRADES J, CLAROS S, JIMENEZ-PALOMO P, MA J, ZAMORANAVAS P, GUERADO E ET AL. SKELETAL REGENERATION BY MESENCHYMAL STEM CELLS: WHAT ELSE?. REGENERATIVE MEDICINE AND TISSUE ENGINEERING - CELLS AND BIOMATERIALS. 2011.	66