

Artigo de Opinião

Aplicação das células estaminais mesenquimais do tecido do cordão umbilical na regeneração cardíaca após enfarte do miocárdio

Application of mesenchymal stem cells from the umbilical cord tissue in cardiac regeneration after acute myocardial infarction

Helder Soares da Cruz^{1*}

¹ ECBio – Investigação e Desenvolvimento em Biotecnologia, S.A.

A terapia celular tem sido usada recentemente em pacientes com enfarte agudo do miocárdio mas os resultados apontam para uma modesta melhoria da função e estrutura do ventrículo esquerdo, devido a limitações do produto celular e a grande variabilidade de dose, muitas vezes sub-terapêutica. As células estaminais mesenquimais derivadas do tecido do cordão umbilical, quando administradas no miocárdio de murganhos submetidos a enfarte do miocárdio, diminuem o impacto na perda de função cardíaca, atenuam o processo de remodelação, aumentam a densidade de capilares, limitam a extensão da apoptose e favorecem a proliferação de células progenitoras cardíacas.

Cellular therapy has been used recently in patients suffering from acute myocardial infarction but the results show only a modest improvement in left ventricular structure and function, due to limitations of the cellular product and of the variable dose, often sub-therapeutic. Mesenchymal stem cells from the umbilical cord tissue, when administered into the mice myocardium after induction of myocardial infarction, have decreased the negative impact in the cardiac function, decreasing remodeling, increasing capillary density, limiting cardiomyocyte apoptosis and favoring the proliferation of cardiac progenitor cells.

PALAVRAS-CHAVE: Células estaminais mesenquimais; tecido do cordão umbilical; enfarte do miocárdio; regeneração cardíaca.

KEY WORDS: Mesenchymal stem cell; umbilical cord tissue; myocardial infarction; cardiac regeneration.

Submetido em 7 março 2014; Publicado em 31 março 2014.

* **Correspondência:** Helder Soares da Cruz. Email: helder.cruz@ecbio.com

INTRODUÇÃO

Na incessante procura de melhorar os resultados em pacientes com enfarte agudo do miocárdio e insuficiência cardíaca, nos últimos 10 anos, uma nova abordagem foi impulsionada - a terapia celular. Estudos independentes têm demonstrado que a terapia com células estaminais adultas pode melhorar a função cardíaca, atenuar a remodelação do ventrículo esquerdo (VE) e reduzir o tamanho do enfarte. Nestes estudos foram utilizadas principalmente células derivadas da medula óssea, nomeadamente, células mononucleadas da medula óssea (BMMNCs) - estudo REPAIR-AMI; células de medula óssea não fracionada (estudo BOOST); células estaminais mesenquimais da medula óssea (BM-MSCs); frações de medula óssea, células CD133⁺ e células progenitoras do sangue periférico (estudo TOPCARE-AMI). A meta-análise dos dados obtidos indica que a terapia celular leva a uma modesta melhoria da função e estrutura do VE em pacientes com enfarte agudo do miocárdio e com cardiomiopatia isquémica crónica. Conquanto o perfil de segurança pareça ser bom, não se tendo verificado efeitos adversos relevantes nestes ensaios nos primeiros anos de *follow-up*, os mecanismos subjacentes aos benefícios da terapia celular ainda requerem um estudo mais aprofundado. De facto, as células utilizadas nestes estudos apresentam ainda limitações como a caracterização incompleta do produto celular e a grande variabilidade de dose, por vezes sub-terapêutica, mesmo dentro do mesmo estudo.

Limitações das células estaminais da medula óssea

Mais especificamente, a utilização das BM-MSCs apresenta várias limitações importantes, como sejam: *i*) o processo de obtenção da medula óssea a partir do próprio paciente não deixa de ser um processo invasivo, acarretando algum risco; *ii*) as BM-MSCs existem em pequenas quantidades relativas na medula óssea, e a sua multiplicação é limitada. Isto faz com que se opte por um preparado heterogéneo e indefinido que não dá garantias de sucesso; *iii*) a

eficiência com que se isolam BM-MSCs viáveis a partir de doentes debilitados, por vezes com historial clínico complexo, é mais baixa e, para além disso, a eficiência de isolamento de BM-MSCs está ainda relacionada de forma negativa com a idade do paciente; *iv*) a necessidade de infra-estrutura em ambiente hospitalar e *know how* técnico e regulamentar para isolar e expandir BM-MSCs a partir de uma população celular altamente heterogénea, assim como para elaborar um preparado farmacêutico em tempo útil para o paciente, acarreta questões técnicas e logísticas difíceis de ultrapassar. Como tal, opta-se normalmente por um preparado de medula óssea, contendo uma fração de células mononucleadas da medula contendo uma população heteróloga de células sem qualquer definição quantitativa ou qualitativa relativamente ao conteúdo de MSCs. O ideal seria ter acesso imediato a um produto celular, seguro, superior em termos de potência terapêutica, que estivesse armazenado e disponível sempre que necessário administrar ao paciente, sem limitações de dose e tempo para administração.

A controvérsia gerada pelas células estaminais embrionárias (ESC), e a mais recente descoberta de que as células pluripotentes induzidas (iPS) têm grande instabilidade genómica após expansão¹, tem conduzido cada vez mais à investigação sobre o potencial das células estaminais adultas e neonatais como alternativas terapêuticas.

Células estaminais mesenquimais do tecido do cordão umbilical

A ECBio - Investigação e Desenvolvimento em Biotecnologia, SA, é uma empresa biofarmacêutica dedicada ao desenvolvimento de medicamentos inovadores à base de células estaminais isoladas a partir de tecidos neonatais (www.ecbio.com). Nos últimos anos, a ECBio tem vindo a focar a sua actividade na aplicação clínica do subtipo de células estaminais mesenquimatosas (*mesenchymal stem cells* - MSCs) presentes no tecido do cordão umbilical.

As MSCs são caracterizadas por terem um enorme potencial de auto-renovação, sendo capazes de se diferenciar em múltiplos tipos de células

especializadas, como sejam células ósseas, células cartilagueas, células constituintes do músculoesquelético, células produtoras de insulina e células neurais². Para além disso, as MSCs têm a capacidade de promover a regeneração autóloga de tecidos através de mecanismos parácrinos, envolvendo a secreção de fatores tróficos como as citocinas e fatores de crescimento que estimulam a ação regenerativa de células precursoras residentes nos tecidos lesados, assim como o recrutamento de outras células circulantes^{2,3}.

Na ECBio desenvolveu-se um protocolo de isolamento de MSCs a partir do tecido do cordão umbilical bem definido em termos do número de células obtidas por massa de tecido inicial⁴. O processo de obtenção de cordões umbilicais, considerados resíduos cirúrgicos, é um processo totalmente não invasivo, não acarretando qualquer risco para o dador. Para além disso, o nível de eficiência atingido após otimização fez com que este protocolo originasse uma população de células bem caracterizada a partir de 100% das amostras biológicas de cordão umbilical processadas, e em números compatíveis com o desenvolvimento de bancos de células para terapia em humanos⁴. Ao contrário das BM-MSCs, as células do tecido do cordão umbilical existem em grandes quantidades na Geleia de Wharton, não estando a sua expansão para aplicação clínica limitada por senescência celular, mesmo em situações onde a administração de doses múltiplas poderá ser necessária. Foi comprovado que estas células mantêm o fenótipo mesenquimal, estabilidade genómica e ausência de propensão para induzir a formação de teratomas até níveis de expansão muito elevados, bastante acima do necessário para estabelecer um *Master Cell Bank* (MCB) e *Working Cell Bank* (WCB) para terapias celulares (Figura 1)⁴.

Estas características fazem com que este protocolo seja ideal para ser aplicado em rotina em investigação e serviços de criopreservação e terapia celular. Tanto os aspetos técnicos como as aplicações do método estão protegidos por patente⁴. Recentemente, foi efetuado o registo de marca do primeiro produto terapêutico à base de células estaminais - UCX[®]. A marca UCX[®] foi criada no sentido da aplicação clínica,

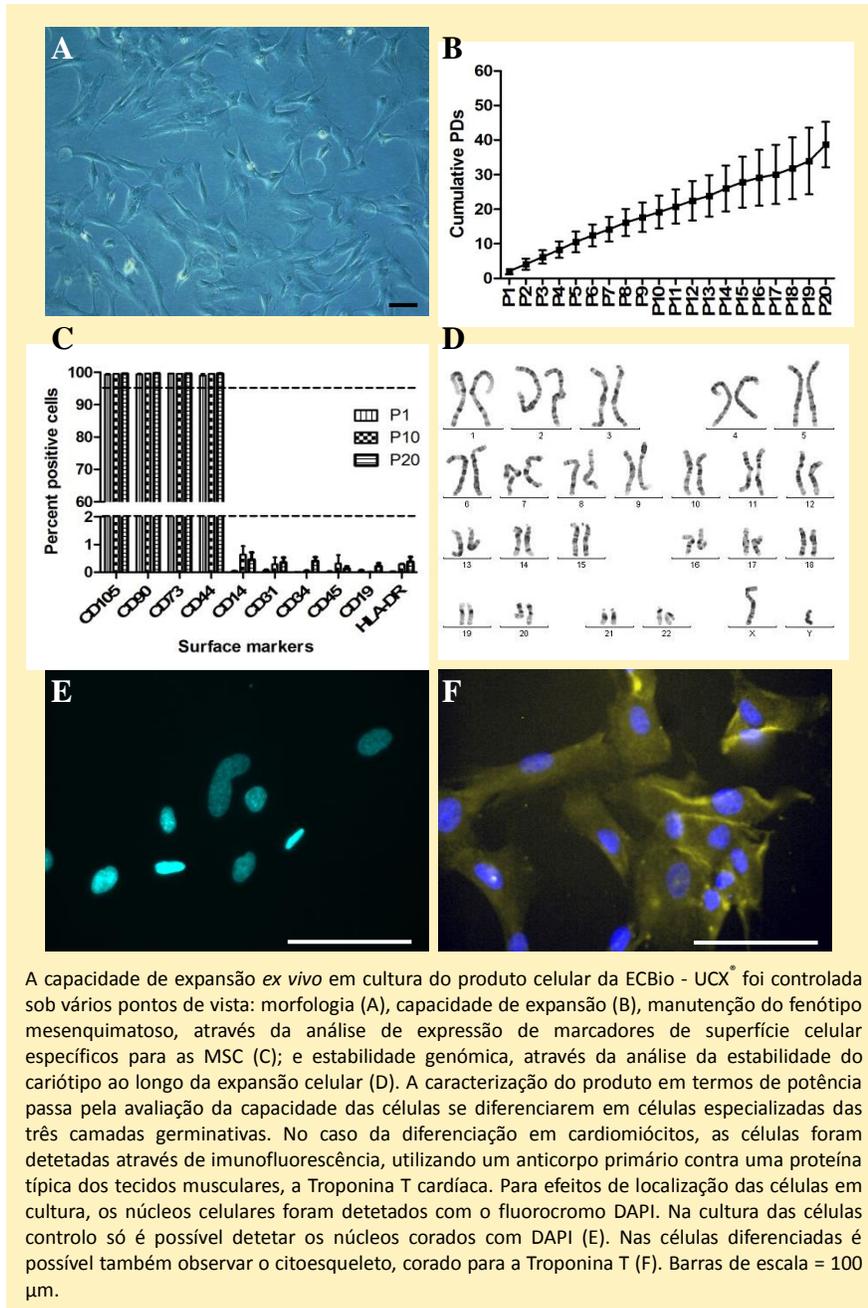
mais precisamente, o método patenteado foi adaptado para a produção de um produto medicinal de terapia avançada (*Advanced Therapy Medicinal Product* - ATMP), de acordo com as diretivas europeias^{5,6}. O registo nacional e internacional da marca UCX[®] foi um dos principais resultados obtidos a partir dos projetos QREN 2008/1467 (TERACEL) e QREN 2009/5294 (CARDIOCEL), promovidos pela ECBio.

Estes projetos permitiram também reunir evidências científicas que suportam não só aspetos de segurança/qualidade, mas também as especificidades relacionadas com a potência do produto UCX[®], como seja a sua capacidade de diferenciação cardiomiocítica (Figura 1). A ECBio foca agora a sua intervenção em áreas que claramente tiram partido das propriedades alogénicas (ausência de imunogenicidade), imunossupressoras do produto UCX[®], claramente comprovadas⁷.

RESULTADOS RECENTES

Nos últimos anos a ECBio tem vindo a estudar uma população específica de células estaminais mesenquimais humanas derivadas do tecido do cordão umbilical, designadas por células UCX[®], isoladas, expandidas e criopreservadas com base em tecnologia proprietária. Quando administradas no miocárdio de murganhos submetidos a enfarte do miocárdio, as células UCX[®] diminuem o impacto na perda de função cardíaca verificada em animais não tratados, atenuam o processo de remodelação cardíaca, aumentam a densidade de capilares e limitam a extensão da apoptose no tecido isquémico. Neste contexto experimental, as células UCX[®] parecem favorecer a proliferação de células indiferenciadas, designadas de progenitoras cardíacas, isoladas do miocárdio. Resumindo, as células UCX[®] minimizam os danos causados pelo enfarte do miocárdio por um conjunto de mecanismos que de forma indireta favorecem os principais constituintes celulares do coração, i.e. os cardiomiócitos e a vasculatura. Estes resultados foram apresentados numa recente publicação científica⁸.

Figura 1 – Propriedades das células estaminais mesenquimais do tecido do cordão umbilical.



CONSIDERAÇÕES FINAIS

O recurso à terapia celular em enfarte agudo do miocárdio é recente e os resultados até agora têm sido modestos, devido, no entender do autor, a limitações do produto celular e a grande variabilidade de dose, muitas vezes subterapêutica. As células estaminais mesenquimais derivadas do tecido do cordão umbilical, quando administradas no miocárdio de murganhos submetidos a enfarte do miocárdio, diminuem o impacto na perda de função cardíaca, atenuam o processo de remodelação, aumentam a densidade de capilares, limitam a extensão da apoptose e favorecem a proliferação de células progenitoras cardíacas. Estas células possuem ainda outras características que as tornam fortes candidatos terapêuticos já que não dão origem a teratomas ou outras lesões neoplásicas *in vivo*, têm uma colheita fácil, podem ser expandidas para obter os elevados números necessários para terapia (frequentemente superiores a 100 milhões de células por dose) e podem ser armazenadas no longo prazo para uso no futuro. A utilização das células UCX[®] em estudos clínicos está prevista dentro do próximo um a dois anos.

AGRADECIMENTOS

Agradece-se ao Hospital Universitário Karolinska, SE, INEB-UP, iMed-UL, IMM-FMUL, Helmholtz-Centre for Infection Research, Braunschweig, DE; Health Research Institute of Santiago (IDIS.Complexo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela/SERGAS, ES), ICBAS, CECA/ICETA-UP, empresa Cytothera, S.A., (Grupo Medinfar, PT), Hospital de São Bernardo, Centro Hospitalar de Setúbal, E.P.E; HPP Hospital de Cascais; Hospital de Santa Maria – Lisboa; e Clínica Médica de Ginecologia Ginetrícia, Lisboa. Agradece-se ainda ao Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional - PO Lisboa: QREN SI&DT 2008/5294; QREN SI&DT 2008/1467; QREN SI&DT 2012/24765; QREN SI&DT 2013/30196.

REFERÊNCIAS

1. Gore, Li, Fung et al. Somatic coding mutations in human induced pluripotent stem cells. *Nature*. 2011; 471: 63–7.
2. Williams, Hare. Mesenchymal stem cells: Biology, pathophysiology, translational findings, and therapeutic implications for cardiac disease. *Circ Res*. 2011; 109: 923-40.
3. Ripa, Haack-Sorensen, Wang, et al. Bone marrow-derived mesenchymal cell mobilization by granulocyte-colony stimulating factor after acute myocardial infarction: Results from the Stem Cells in Myocardial Infarction (STEMMI) trial. *Circulation*. 2007; 116: I-24-30.
4. Instituto Nacional da Propriedade Industrial [INPI]. Patente de Invenção Nacional N.º 103843 – Método de isolamento de células precursoras a partir do cordão umbilical humano [página inicial na Internet]. C2008 [citada 2014 03 13]. Disponível em <http://servicosonline.inpi.pt/pesquisas/main/patentes.jsp?lang=PT>
5. European Medicines Agency. Guideline on the minimum quality and non-clinical data for certification of advanced therapy medicinal products [página inicial na Internet]. c2010 [citada 2014 Mar 12]. Disponível em http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2010/01/WC500070031.pdf
6. European Medicines Agency. Draft guideline on the risk-based approach according to Annex I, part IV of Directive 2001/83/EC applied to Advanced Therapy Medicinal Products [página inicial na Internet]. c2012 [citada 2014 Mar 12]. Disponível em: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2012/01/WC500120989.pdf
7. Santos, Bárcia, Simões et al. The role of human umbilical cord tissue-derived mesenchymal stromal cells (UCX[®]) in the treatment of inflammatory arthritis. *J Transl Med*. 2013; 11:18.
8. Nascimento, Mosqueira, Sousa et al. Human umbilical cord tissue-derived mesenchymal stromal cells attenuate remodeling after myocardial infarction by proangiogenic, antiapoptotic, and endogenous cell activation mechanisms. *Stem Cell Research & Therapy*. 2014; 5:5.