

**TERAPIA CELULAR EM REPARAÇÃO ÓSSEA – APLICAÇÃO CLÍNICA DE
CÉLULASTRONCOMESESENQUIMAIS
CELLULAR THERAPY ON BONE REPAIR – CLINICAL APPLICATION OF MESENCHYMAL
STEM CELL**

Betânia Souza MONTEIRO¹, Napoleão Martins ARGÔLO-NETO², Ricardo Junqueira DEL
CARLO³,

1 Médica Veterinária, Mestre, Estudante de Doutorado do Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa. betania.monteiro@gmail.com

2 Médico Veterinário, Mestre, Estudante de Doutorado do Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa. argolo_napoleao@hotmail.com

3 Médico Veterinário, Professor Titular, Clínica Cirúrgica Veterinária, Universidade Federal de Viçosa. ricarlo@ufv.br

RESUMO

O tecido ósseo é dinâmico e está continuamente sob processo de remodelação importante para a manutenção da sua homeostase e para a reparação dos microtraumas freqüentes. Contudo, nos casos de defeitos estruturais graves, neoplasias, infecções e processos de não-união óssea, os reparos por meio da remodelação fisiológica podem estar limitados.

Desta forma, objetivando a normalidade tecidual e a manutenção da função, recorre-se a procedimentos cirúrgicos (colocação de pinos, placas, parafusos e hastes), do uso de enxertos e biomateriais e, mais recentemente da terapia celular. Dentre as opções para terapia celular, tem sido preconizada a utilização de células-tronco (CT), sobretudo as tronco mesenquimais (CTM ou MSCs) por apresentarem maior plasticidade e biodisponibilidade que as demais célulastronco somáticas. Espera-se que estas células, sob condições patológicas, auxiliem o organismo a superar a falta de fonte osteoprogenitora, de demais células comprometidas com a reparação e de fatores solúveis para o recrutamento de novos tipos celulares.

Palavras-chave: tecido ósseo, células-tronco mesenquimais, terapia celular.

Key-words: bone tissue, mesenchymal stem cells, cellular therapy

Células-tronco Mesenquimais

As células-tronco (CT), presentes em todos os vertebrados, são células indiferenciadas, capazes de auto-renovação e diferenciação em múltiplas linhagens de células e tecidos, responsáveis pela auto reparação tecidual. Durante o desenvolvimento do pré-embrião são encontradas células totipotentes e pluripotentes, chamadas de embrionárias (CTE). Nos tecidos adultos, são encontradas células multipotentes, denominadas adultas ou somáticas (CTS) (DEL CARLO *et al.*, 2008).

Dentre as CTS encontram-se as células-tronco mesenquimais (CTM ou MSCs), com ampla plasticidade, capacidade de migração para locais de lesão tecidual e de promover a manutenção e regeneração de múltiplas linhagens de células do organismo (SOTIROPOULOU *et al.*, 2006; NAUTA e FIBBE, 2007).

As MSCs estão presentes, em pequenas quantidades, em todos os tecidos adultos, incluindo a medula óssea, tecido adiposo, periósteo, tecido muscular e órgãos parenquimatosos. Essas células caracterizam-se pela habilidade de produzir qualquer tipo celular necessário num

processo de reparação, como osteoblastos, condroblastos, hepatócitos, células epiteliais, renais, cardíacas, entre outros (PITTENGER *et al.*, 1999). Tal plasticidade fornece perspectivas terapêuticas promissoras com esse grupo celular, tornando-o foco de pesquisas em todo o mundo.

As MSCs são coletadas, principalmente, da medula óssea, tecido adiposo e de órgãos parenquimatosos. Após a coleta, pode-se utilizar a fração celular mononuclear da medula óssea (BMMC - bone marrow mononuclear cells) para aplicação direta sobre as lesões ou realizar a expansão das MSCs, *in vitro*, para posterior utilização (CROVACE *et al.*, 2008).

Além da plasticidade, as MSCs apresentam propriedade imunológica bimodal, o que lhe permite interagir com células do sistema imunológico, inibindo ou estimulando a resposta imune (PATEL *et al.*, 2008). A imunomodulação amplia as perspectivas clínicas das MSCs, uma vez que viabiliza sua utilização em pacientes incompatíveis geneticamente (DJOUAD *et al.*, 2003; AGGARWAL & PITTENGER, 2005).

Propriedades Imunológicas das MSCs

As MSCs tornaram-se foco de atenção terapêutica devido seu potencial imunomodulatório (WAN *et al.*, 2008), embora, os mecanismos de imunossupressão da resposta inflamatória e dos mecanismos de rejeição ao transplante não estejam totalmente elucidados (PATEL *et al.*, 2008).

Mediante o contato direto das MSCs com o tecido (alógeno ou autógeno) ou mediante a interação destas células com o INF- γ produzido pelas células imunes do organismo, as MSCs desencadeiam a liberação de diversos fatores solúveis. Estes fatores atuarão sobre as células do sistema imunológico (linfócitos e células dendríticas apresentadoras de antígeno - APC) modulando a resposta imune (CORCIONE *et al.*, 2006; NAUTA & FIBBE, 2007) [Fig. 1].

Dentre esses fatores, estão as prostaglandinas (PGE2), interleucinas (IL-4, IL-6, IL-10), fator de crescimento transformador beta (TGF- β), fator de crescimento do hepatócito (HGF) e a enzima indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) (NAUTA & FIBBE, 2007). A liberação de TGF- β e HGF suprime a proliferação dos linfócitos **T** e **B** (Di NICOLA *et al.*, 2002). Enquanto, a liberação de PGE2 inibe o recrutamento dos linfócitos T citotóxicos e produção de citocinas pró-inflamatórias. A enzima IDO induz a apoptose dos linfócitos T, por transformar o triptofano (aminoácido essencial para a ativação dessas células) em produtos tóxicos (AGGARWAL & PITTENGER, 2005). De forma análoga, IDO, PGE2 e TGF- β induzem a perda do potencial citotóxico das células **NK** (natural killer), uma vez que suprimem a produção de IL-2, IL-15 e INF- γ pelas mesmas (SOTIROPOULOU *et al.*, 2006).

Em relação às **APC**, evidenciou-se que as MSCs interferem na diferenciação, maturação e ativação dessas células por meio da produção de IL-6 e de fator de crescimento estimulador de macrófago (M-CSF). Além disso, a liberação de PGE2, pelas MSCs, inibe a produção e secreção de fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e de INF- γ e estimula a produção de citocina anti-inflamatória IL-10 (AGGARWAL & PITTENGER, 2005; NAUTA & FIBBE, 2007).

Ademais, além dos efeitos imunossupressores relatados acima, alguns autores descrevem que as MSCs expressam pequenas quantidades de complexo de histocompatibilidade principal do tipo I (MHC-I) e níveis negligenciáveis de MHC-II (Le BLANC, 2003). Durante a seleção clonal positiva e negativa (reconhecimento do organismo do próprio e do não-próprio), as células de defesa utilizam o MHC para tal seleção. Em ausência do mesmo, o processo de seleção de não-próprio não ocorre, impedindo a rejeição (MAJUMDAR *et al.*, 2003).

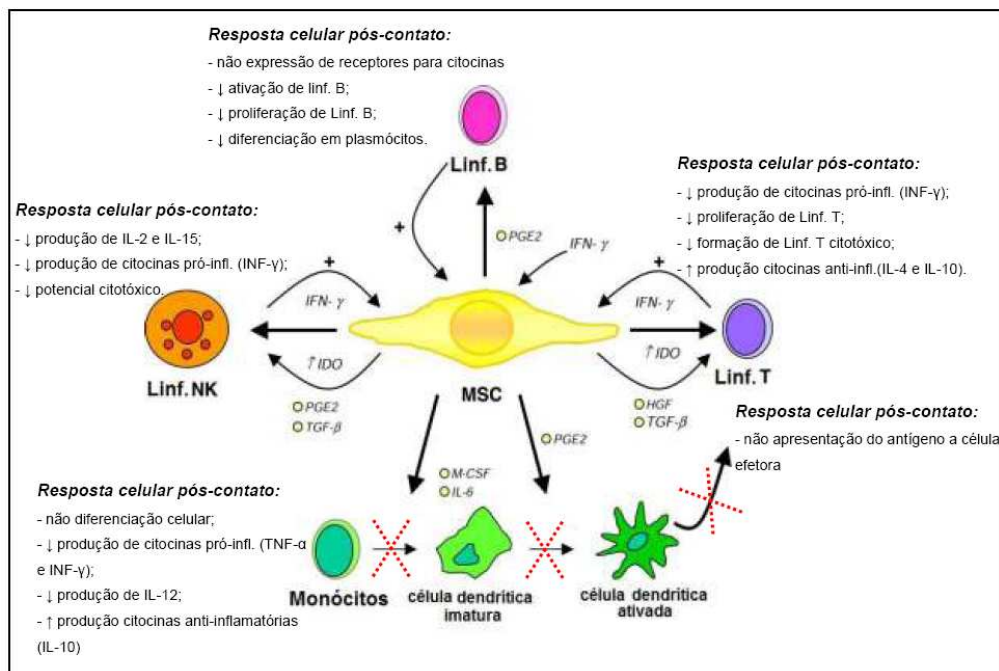


Figura 1 – Demonstração dos efeitos imunomoduladores das células-tronco mesenquimais (MSCs) sobre células do sistema imune (modificado de NAUTA & FIBBE, 2007).

Terapia Celular – autógena e alógena

Embora a forma de coleta de MSCs favoreça seu uso autógeno, a possibilidade de tratamento alógeno permite a criação de bancos de MSCs, ampliando as possibilidades terapêuticas. Pacientes em estados mórbidos desfavoráveis poderiam fazer uso de culturas celulares já estabelecidas.

Não obstante, estudos contemporâneos relatam a utilização das MSCs, alógenas e autógenas, para a reparação óssea. Usualmente, nesses estudos, utiliza-se desde a fração BMMC, que contem pequenas quantidades de MSCs, até a cultura expandida de MSCs obtidas de diversos órgãos. Ambas, podem ser aplicadas *in situ* (no local da lesão), isoladamente ou combinadas com substitutos ósseos e biomateriais, e por infusão intravenosa.

Barros *et al* (2001a e 2001b) realizaram a aplicação alógena de BMMC, por via percutânea, em falhas ósseas induzidas experimentalmente em rádio de coelhos. Os autores

puderam concluir que a aplicação de BMMC resultou em preenchimento precoce com formação direta de tecido ósseo, quando comparado com o controle, sobretudo nas duas primeiras semanas de avaliação.

Crovace *et al.* (2008), Del Carlo *et al.* (2007) e Dallari *et al.* (2007) utilizaram BMMC autógenas, via aplicação *in situ*, em falhas ósseas críticas em modelos experimentais animais, visando precocidade de osteogênese, e obtiveram resultados similares a Barros *et al.* (2001b). Yamasaki *et al.* (2008) realizaram osteotomia rotacional transtrocanterica acrescida da aplicação autógena de BMMC associadas à hidroxiapatita, no tratamento de osteonecrose bilateral da cabeça femoral. Concluíram que a aplicação das células favoreceu a reparação. De forma similar, Paez *et al.* (2007) associou BMMC ao substituto ósseo coral *Porites astreoides* e constataram sustentação para crescimento e formação óssea precoce.

Bruder *et al.* (1998) demonstraram que cultura de MSCs derivadas de medula óssea, depositadas sobre plataformas de hidroxiapatita e sobre cerâmica de cálcio, pode ser utilizada com sucesso no tratamento de defeitos críticos em fêmur de cães. Constataram rápido desenvolvimento de tecido ósseo ao redor dos implantes e retorno precoce da função do membro.

Hernigou *et al.* (2005) trataram não-união óssea, na diáfise da tíbia, utilizando a fração concentrada de BMMC, aplicada por via percutânea. Observaram reversão da não-união e consolidação óssea em 88% dos casos e o sucesso do tratamento era proporcional à concentração celular obtida. Zamprogno (2007) realizou, no tratamento de não-união, aplicação única de cultura de MSCs, por via percutânea, na dose de 107 células por aplicação. Observou que a terapia com células-tronco provenientes da medula óssea mostrou-se efetiva, promovendo a união óssea em pacientes que apresentavam um ano ou mais de fratura, e diversas cirurgias anteriores fracassadas.

Destacando a aplicação alogênica, Horwitz *et al.* (2002) realizaram duas infusões venosas de MSCs, na dose de 1×10^6 células/kg a 5×10^8 células/kg, com intervalos de um mês entre as aplicações, objetivando o tratamento de seis crianças que sofriam de severas formas de osteogênese imperfeita. Durante os primeiros seis meses de acompanhamento, observaram maior deposição óssea e menor ocorrência de fraturas nesses pacientes. Porém, de acordo com outros relatos, um inconveniente para a aplicação venosa é a necessidade de grandes quantidades de células por aplicação, visto que muitas se distribuem para locais distintos à lesão principal.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Muitos dados experimentais e clínicos apóiam a eficácia de MSCs na formação óssea e cicatrização de grandes defeitos. Contudo, a terapia celular com MSCs é uma ciência em formação cujos estudos clínicos começam a apresentar os primeiros resultados e ainda são necessários mais estudos randômicos para reiterar os resultados, até então, obtidos. Além disso, muitos aspectos das interações biomoleculares entre MSCs e sistema imunológico permanecem

obscuros. A compreensão de tais eventos pode esclarecer os mecanismos de plasticidade celular, as doses de aplicação, vias de aplicações e limitações da terapia.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGGARWAL, S.; PITTENGER, M.F. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. **Blood**. v. 105, p. 1815-1822, 2005.

BARROS, S.V.G.; DEL CARLO, R.J.; VILORIA, M.I.V.; *et al.* Auto-enxerto percutâneo de medula óssea. I. coleta, preparo e aplicação. **Ciência Rural**. v.31, n.6, p.1013-1018, 2001.

BARROS, S.V.G.; DEL CARLO, R.J.; VILORIA, M.I.V.; *et al.* Auto-enxerto percutâneo de medula óssea. II. Reparação de falhas segmentares produzidas no rádio de coelhos. **Ciência Rural**. v.31, n.4, p.627-632, 2001.

BRUDER, S.R.; JAISWAL, N.; RICHALTON, N.S.; *et al.* Mesenchymal Stem Cells in Osteobiology and Applied Bone Regeneration. **Clinical Orthopaedics and Related Research**. n. 355S, p. S247-S256, 1998.

CORCIONE, A.; BENVENUTO, F.; FERRETTI, E.; *et al.* Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. **Blood**. v. 107, p. 367–372, 2006.

CROVACE, A.; FAVIA, A.; LACITIGNOLA, L.; *et al.* Use of autologous bone marrow mononuclear cells and cultured bone marrow stromal cells in dogs with orthopaedic lesions. **Veterinary Research Communications**, v.32, suppl. 1, p.39-44, 2008.

DALLARI, D.; SAVARINO, L.; STAGNI, C.; *et al.* Enhanced tibial osteotomy healing with use of bone grafts supplemented with platelet gel or platelet gel and bone marrow stromal cells. **The Journal of Bone and Joint surgery of America**. v. 89, p. 2413–2420, 2007.

DEL CARLO, R.J.; PINHEIRO, L.C.P.; MONTEIRO, B.S.; *et al.* Integração de aloenxertos ósseos corticais associados ou não a células-tronco da medula óssea, proteína óssea morfogenética (BMP) e autoenxerto esponjoso em cães. **Veterinária e Zootecnia**. v.14, n.2, p.204-215, 2007.

DEL CARLO, R.J.; MONTEIRO, B.S.; ARGÔLO-NETO, N.M. Células-tronco e fatores de crescimento na reparação tecidual. **Ciência Veterinária nos Trópicos**. v. 11, n.1, p. 167-169, 2008.

Di NICOLA, M.; CARLO-STELLA, C.; MAGNI, M.; *et al.* Human bone marrow stromal cells suppress T lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. **Blood**. v. 99, p.3838-3843, 2002.

DJOUAD, F.; PLENCE, P.; BONY, C.; *et al.* Immunosuppressive effect of mesenchymal stem cells favors tumor growth in allogeneic animals. **Blood**. v.102, p. 3837, 2003.

HERNIGOU, P.H.; POIGNARD, A.; BEAUJEAN, F.; *et al.* Percutaneous autologous bone marrow grafting for nonunions – Influence of number and concentration of progenitor cells. **The Journal of Bone and Joint Surgery**. v. 87, p. 430-1437, 2005.

HORWITZ, E.M.; GORDON, P.L.; KOO, W.K.; *et al.* Isolated allogeneic bone marrow-derived mesenchymal cells engraft and stimulate growth in children with osteogenesis imperfecta: implications for cell therapy of bone. **The Proceedings of the National Academy of Sciences USA**. v. 99, n.13, p. 8932–8937, 2002.

Le BLANC, K. Immunomodulatory effects of fetal and adult mesenchymal stem cells. **Cytotherapy**. v. 6, p. 485– 489, 2003.

MAJUMDAR, M.K.; KEANE-MOORE, M.; BUYANER, D.; *et al.* Characterization and functionality of cell surface molecules on human mesenchymal stem cells. **Journal of Biomedical Science**. v. 10, p. 228-241, 2003.

NAUTA, A.J.; FIBBE, W.E. Immunomodulatory properties of mesenchymal stroma cells. **Blood**. v.110, n.10, p.3499 – 3506, 2007.

PAEZ, O.L.A.; DEL CARLO, R.J.; BORGES, A.P.B.; *et. al.* Coral *Porites astreoides* associado ou não à medula óssea autógena no preenchimento de falhas produzidas na tíbia de cães. **Veterinária e Zootecnia**. v.14, n.2, p. 271-281, 2007.

PATEL, S.A.; SHERMAN, L.; MUNOZ, J.; *et al.* Immunological properties of mesenchymal stem cells and clinical implications. **Archivum immunologiae et Therapiae Experimentalis**. v. 56, n. 1, p. 1-8, 2008.

PITTENGER, M.F.; MACKAY, A.M.; BECK, S.C.; *et al.* Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. **Science**. v.284, p. 143-147, 1999.

SOTIROPOULOU, P.A.; PEREZ, S.A.; GRITZAPIS, A.D.; *et al.* Interactions between human mesenchymal stem cells and natural killer cells. **Stem Cells**. v. 24, n. 1, p. 74 – 85, 2006.

ZAMPROGNO, H. Células tronco esqueléticas para o tratamento de não união de fraturas. **Acta Scientiae Veterinariae**. v. 35, supl. 2, p. s289-s290, 2007.

YAMASAKI, T.; YASUNAGA, Y.; TERAYAMA, H.; *et al.* Transplantation of bone marrow mononuclear cells enables simultaneous treatment with osteotomy for osteonecrosis of the bilateral femoral head. **Medical Science Monitor**. v.14, n.4, p. CS23-CS30, 2008.