

Revisão / Review

Terapias celulares do miocárdio com células da medula óssea: critérios de qualidade e perspectivas

Myocardial cell therapy with bone marrow cells: criteria for quality and future perspectives

Maria Isabel D. Rossi¹Radovan Borojevic²

A terapia celular pode ser uma nova opção terapêutica para pacientes cardíacos, modificando o processo de remodelamento cardíaco e prevenindo a falência cardíaca pós-infarto. Estudos clínicos até o presente usaram células mononucleadas de medula óssea, isoladas por centrifugação em gradiente de densidade a partir de aspirados de medula óssea da crista ilíaca. Embora esta nova estratégia revolucionária pareça ser segura e melhorar a função cardíaca, resultados negativos surgiram desafiando o futuro de terapias baseadas em células para o reparo cardíaco. Aqui discutimos alguns resultados laboratoriais que podem explicar, pelo menos parcialmente, as diferenças obtidas em protocolos similares. Uma análise da correlação entre a composição celular da fração mononuclear do aspirado da medula óssea e o êxito clínico da terapia indicou que os linfócitos não favorecem o reparo do miocárdio. Uma seleção negativa eliminando as linhagens do sistema imunitário pode ser proposta para melhorar a terapia celular do miocárdio. Rev. Bras. Hematol. Hemoter. 2009;31(Supl. 1):82-86.

Palavras-chave: Célula-tronco; medula óssea; coração; miocárdio; terapia celular.

Introdução

A terapia celular tem se mostrado uma nova opção para tratar as cardiopatias relacionadas à isquemia do miocárdio pós-infarto. A terapia celular mais amplamente usada é o transplante de medula óssea, na qual o tecido colhido reconstitui o mesmo no recipiente, seja autólogo ou heterólogo. Extensas seleções ou manipulações do material celular são raramente indicadas e usadas, e a preocupação essencial é a proteção das células manipuladas de estresse e de agressão física ou química. No caso de terapias celulares do miocárdio, na grande maioria dos casos, a fonte de células transplantadas não é o tecido cardíaco. A escolha e a manipulação das células representam, portanto, desafios grandes, para os quais as propostas ainda estão longe de consenso científico e médico.

Modelos experimentais têm demonstrado que a infusão de diferentes tipos celulares pode contribuir para a melhora da função cardíaca após infarto agudo ou isquemias cardíacas crônicas. Entre os diferentes tipos celulares estudados, infusão de progenitores endoteliais isolados do sangue periférico ou medula óssea,^{1,2,3,4} células mesenquimais da medula óssea^{5,6,7} ou do tecido adiposo⁸ ou células-tronco residentes expandidas *in vitro*, como as células-tronco do miocárdio^{9,10} ou do epicárdio,¹¹ foram capazes de estimular a revascularização do miocárdio, melhorando sua função.

No entanto, a maioria dos estudos clínicos tem-se restrito, até o momento, à infusão, por diferentes vias, de células mononucleares isoladas de aspirados da medula óssea por centrifugação em gradiente de densidade.¹²⁻¹⁷ Esta opção re-

¹Professor Adjunto do Programa de Bioengenharia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

²Professor Titular, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Programa de Bioengenharia, Instituto de Ciências Biomédicas, Programa Avançado de Biologia Celular Aplicada à Medicina, Hospital Universitário Clementino Fraga Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro – RJ.

Correspondência: Radovan Borojevic
CCS-UFRJ, Cidade Universitária, Ilha do Fundão
21941-970 – Rio de Janeiro-RJ – Brasil
Caixa postal 68021
E-mail: radovan@histo.ufrj.br
Doi: 10.1590/S1516-84842009005000033.

flete dois fatos. O conhecimento da coleta e manipulação de células da medula óssea é embasado em ampla experiência. Por outro lado, é consenso atual que a medula óssea contém progenitores hematopoéticos, endoteliais e mesenquimais, e que todos podem participar direta ou indiretamente na revascularização e estabilização da árvore vascular coronariana e, potencialmente, na regeneração de tecido muscular próprio.

Embora uma metanálise dos resultados publicados na literatura tenha sugerido que haja uma melhora da função cardíaca, esta é discreta e é inegável que em alguns casos não se observou qualquer efeito.¹⁸ Por exemplo, em estudo randomizado, duplo-cego, com o grupo controle dos pacientes recebendo placebo, e a infusão por via intracoronariana de células mononucleares de medula óssea, verificou-se uma melhora da fração de ejeção nos pacientes que receberam as células.¹⁹ Outro estudo, também randomizado, duplo-cego com placebo controlado, onde células mononucleares de medula óssea foram também injetadas por via intracoronariana, não registrou melhora no quadro clínico dos pacientes.²⁰ Em seu conjunto, os estudos heterogêneos com diferentes resultados podem levar a severas críticas, comprometendo a aplicação de terapias celulares. É importante, portanto, identificar os motivos destes resultados discrepantes.

A importância do método de isolamento e da caracterização das células

Apesar das variações quanto ao número de células injetadas, a via de administração e o período pós-infarto agudo em que as células foram injetadas, resultados recentes sugerem que possíveis diferenças no método de isolamento das células poderiam alterar propriedades funcionais destas e, portanto, a qualidade do material inoculado, o que levaria às diferenças observadas no resultado final. Seeger e colaboradores²¹ demonstraram que diferenças na forma de armazenamento, na solução de coleta e armazenagem, e mesmo no gradiente de densidade podem alterar a purificação e função de células derivadas de aspirados da medula óssea. Os autores mostraram diferenças significativas na recuperação celular, especificamente de progenitores hematopoéticos (CD45⁺ CD34⁺ e CD45⁺CD133⁺), e na capacidade funcional, incluindo a habilidade de induzir revascularização no modelo de isquemia de membros inferiores, entre células mononucleares obtidas por centrifugação em Ficoll ou Lymphoprep. Além disso, a estocagem *overnight* a 4°C em solução salina fisiológica com plasma autólogo heparinizado resultou em diminuição da migração das células em resposta à quimiocina CXCL12, também conhecida como SDF-1 α (*Stromal Derived Factor-1*), quando comparado com a estocagem em meio de cultura (*ex vivo*) contendo soro autólogo. Estes achados constituem uma grande contribuição para a área de terapias celulares não

só em cardiopatias isquêmicas, e indicam claramente a importância dos métodos de obtenção das células e da caracterização fenotípica e funcional da população isolada.

Caracterização fenotípica e funcional da população mononuclear isolada de aspirados de medula óssea de cardiopatas

Em estudos do nosso grupo, a injeção transendocárdica de células mononucleadas de medula óssea em pacientes com isquemia crônica promoveu redução da área isquêmica e melhora significativa em aproximadamente seis meses dos sintomas e da capacidade funcional do miocárdio.^{13,15} Ela foi sustentada por período muito mais longo, e a recente revisão dos pacientes, cinco anos após a terapia, mostra a manutenção da melhora clínica e de qualidade de vida em todos os paciente (Dohmann HFR *et al.*, 2008, observações não publicadas). Neste estudo, aspirados da crista ilíaca do paciente, coletados com heparina de baixo peso molecular (Liquemine, Roche) foram imediatamente processados. O gradiente de centrifugação para obtenção do anel de células mononucleadas foi realizado com Ficoll-Paque Plus™ (Pharmacia, GE Life Science). As células foram diluídas em soro fisiológico contendo 3% de albumina humana e imediatamente transportadas, em ambiente refrigerado, para injeção nos pacientes. Portanto, o intervalo de tempo entre a obtenção da fração mononuclear e a injeção não excedeu quatro horas.

Numerosas provas funcionais e de caracterização fenotípica da população celular a ser injetada foram realizadas com o objetivo de comprovar a capacidade funcional das células.

A recuperação celular após gradiente de Ficoll foi de aproximadamente 25% (12%-38,6%), e as características fenotípicas desta população foram avaliadas por citometria de fluxo (Tabela 1). Utilizou-se o marcador CD45 para determinar a população de leucócitos (*leucogate*) e o percentual de progenitores hematopoéticos (CD34⁺) com baixa expressão de CD45 (CD45^{Lo}) foi quantificado utilizando-se o método de Ishage.²² A expressão de HLA-DR na população CD34⁺CD45^{Lo} foi verificada, pois está correlacionada com a diferenciação dos mesmos. Ou seja, os progenitores hematopoéticos mais primitivos são negativos para HLA-DR.²³ O percentual de linfócitos T (CD3⁺), CD4 e CD8, e de linfócitos B (CD19⁺) foi determinado na *leucogate*, assim como o de monócitos (CD14⁺) e de células CD56⁺, entre as quais se encontram as células NK.

Embora a análise por exclusão de corante (azul trypan) demonstrasse que mais de 95% das células eram viáveis, ensaios clonogênicos para verificar a capacidade de proliferação de progenitores hematopoéticos e de células mesenquimais do estroma foram realizados. A frequência de células mesenquimais do estroma da medula óssea, também denominadas de células-tronco mesenquimais pela sua capacidade

Tabela 1. Características fenotípicas da população mononuclear isolada da medula óssea de pacientes cardiopatas

Fenótipo	% na população mononuclear	Nº (x 10 ⁶)/10mL de medula óssea
CD45 ^{Lo} CD34 ⁺	2,8 (± 1,6) *	1,1 (± 1,6) *
CD45 ^{Lo} CD34 ⁺ HLA- DR ^{Lo/-}	0,12 (± 0,07)	0,06 (± 0,03)
CD45 ⁺ CD34 ⁺ CD4 ⁺	27,6 (± 9,6)	9,5 (± 6,4)
CD45 ⁺ CD34 ⁺ CD8 ⁺	14,8 (± 6,2)	4,7 (± 3)
CD45 ⁺ CD19 ⁺	10,1 (± 5)	3,7 (± 3,3)
CD45 ⁺ CD14 ⁺	10,5 (± 3,9)	4,2 (± 2,6)
CD45 ⁺ CD56 ⁺	1,3 (± 0,4)	0,5 (± 0,3)

* Média (±SD)

de se diferenciar nas linhagens osteogênica, condrogênica e adipogênica,²⁴ foi determinada pelo ensaio de formação de colônia de células fibroblastoides (CFU-F, Fibroblast-Colony Forming Unit) como descrito anteriormente.²⁵ Já a capacidade de proliferação e diferenciação dos progenitores hematopoéticos foi avaliada pela formação de colônia em meio semissólido (*soft-agar*) na presença de fatores de crescimento (CFU-GM, Granulocyte-Macrophage Colony Forming Unit).

A dispersão do número de CFU-F foi semelhante à distribuição das células CD45^{Lo}CD34⁺ (Figura 1A). O número de CFU-GM correlacionou-se diretamente (R² = 0,72) com o percentual de progenitores hematopoéticos (CD45^{Lo}CD34⁺) (Figura 1B). Esta correlação indica que aproximadamente uma em trinta células CD45^{Lo}CD34⁺ (33,9 ± 10,7) é capaz de formar uma colônia de células mielóides em meio semissólido. Esta correlação é ainda mais estreita com a população mais indiferenciada, pois verificou-se que cada (1,4 ± 0,5) célula

CD45^{Lo}CD34⁺HLA-DR^{Lo/-} é capaz de formar uma colônia. Portanto, o método de isolamento não afetou a capacidade proliferativa destas células.

Correlação da quantidade e do fenótipo de células injetadas com o êxito da terapia

Os mecanismos da participação das diferentes frações de células mononucleares obtidas e usadas na terapia do miocárdio não são claros. Entretanto, o conhecimento detalhado da composição da população celular injetada em cada um dos pacientes, junto com o acompanhamento clínico e estudos dos parâmetros funcionais após a terapia permitiram uma análise *post hoc* das correlações entre estes parâmetros. A Tabela 2 cita os dois conjuntos de dados submetidos à análise de correlação, e a Tabela 3 as correlações detectadas.^{26,27} Nota-se uma clara correlação entre o número total de células e o bom êxito da terapia. O conjunto de linfócitos não mostra uma correlação favorável, e as células CD3+CD8+ e CD56+ mostram um efeito claramente desfavorável. Como a quantidade de células injetadas numa intervenção transendocárdica é limitada, uma seleção negativa de linfócitos pode ter dois efeitos interessantes: permitir o aumento de células que se mostram favoráveis à regeneração do miocárdio, e eliminar as populações não desejadas. A possibilidade de seleção negativa esta atualmente em estudo. Por outro lado, as células que mostraram a correlação positiva pertencem aos progenitores mais precoces, que representam uma parte muito pequena da população mononuclear total. O efeito favorável durador, melhorando o quadro clínico do paciente durante pelo menos 8-12 semanas, sugere uma capacidade de proliferação destas células, ou desencadeamento de

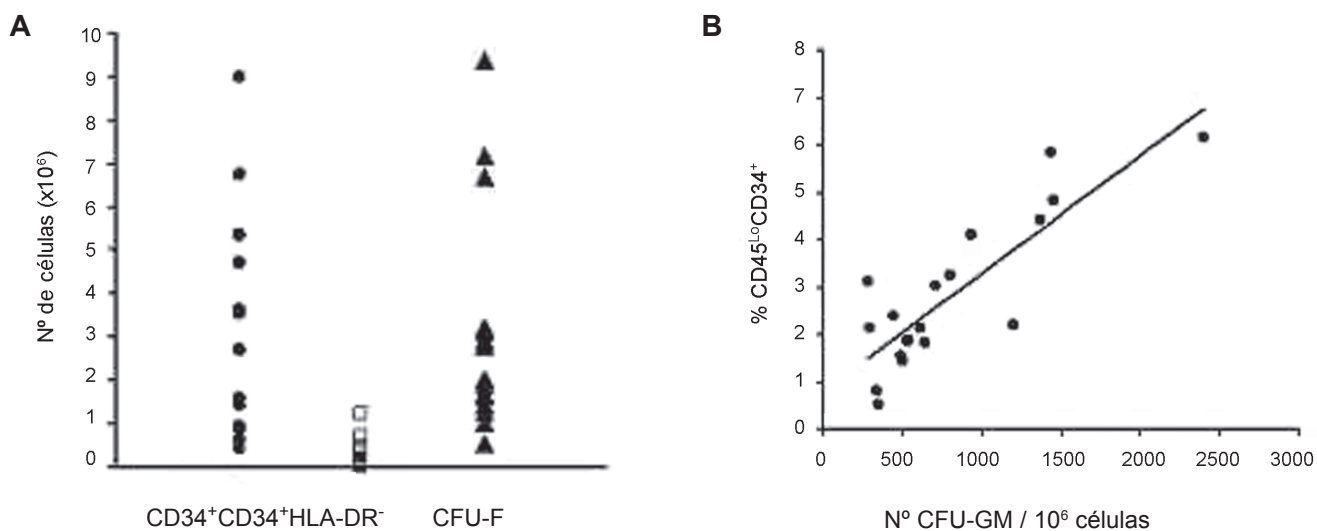


Figura 1. Características da população mononuclear de medula óssea injetadas por via transendocárdica. (A) Número de progenitores hematopoéticos (CD34⁺ e CD34⁺HLA-DR⁻) e de progenitores mesenquimais (CFU-F) na fração mononuclear de medula óssea; (B) Correlação entre o número de colônias de granulócitos e macrófagos e o percentual de células CD45^{Lo}CD34⁺ na fração mononuclear de medula óssea. As células mononucleares foram obtidas por centrifugação em Ficoll. O percentual de células CD45^{Lo}CD34⁺ foi determinado por citometria de fluxo e o número de colônias

Tabela 2. Parâmetros caracterizando a população celular injetada e a evolução funcional e da qualidade de vida dos pacientes

Marcadores fenotípicos determinados pela citometria de fluxo	Parâmetros funcionais do miocárdio determinados 2, 4, 6 e 12 meses após a terapia
CD34	Extra-sístoles ventriculares
HLA DR	Voltagem unipolar
c-kit	Isquemia
CD45	Fibrose
CD14	QRT
CD3	Volume Sistólico Final
CD4	Volume Diastólico Final
CD8	Índices:
CD19	NYHA
CD56	CCSAS
Ensaio Funcionais	Qualidade de vida (questionários)
CFU-GM	SF36
CFU-F	Minnesota

Tabela 3. Correlação entre os parâmetros da população celular injetada e a evolução funcional e de qualidade de vida dos pacientes

Quantidade e fenótipo	Correlação positiva	Correlação negativa
Número total de células e densidade de células injetadas	9	
CD34	6	
CD34-CD45-ckit+	8	
CFU-F	5	
CD4	2	4
CD8		17
CD56		12
CD19		4

fenômenos autossustentados no tecido receptor. Este achado sugere a possibilidade de tentar expandir estas populações antes da injeção. Para os CFU-F que correspondem aproximadamente às células-tronco mesenquimais, isto é tecnicamente viável, em condições rigorosamente controladas.²⁸ Esta linha de pesquisa está sendo também atualmente prosseguida em vários grupos.

Em conclusão, as terapias celulares do miocárdio mostram em seu conjunto resultados promissores, porém pouco claros em termos de mecanismos envolvidos. A maioria dos cientistas concordaria hoje que a questão não é mais se as terapias celulares devem ser aplicadas, mas como devem ser aplicadas.²⁹ O conhecimento detalhado de células usadas e de potenciais mecanismos que desencadeiam a evolução favorável das cardiopatias graves é um desafio para os próximos anos.

Abstract

Cell therapy may provide a novel therapeutic option for cardiac patients, modifying myocardium remodeling processes and preventing post-infarction heart failure. Currently clinical studies predominantly use bone marrow mononuclear cells isolated by density gradient centrifugation of iliac crest bone marrow aspirates. Although this revolutionary new strategy seems to be safe and to improve myocardial function, negative data have emerged challenging the future of cell-based therapy for heart repair. Here we discuss some laboratory data that might explain, at least in part, variations in outcomes using similar protocols. Analysis of the correlation between the cell composition of the mononuclear fraction of bone marrow aspirates and the clinical outcome of the therapy has indicated that cells of the lymphocyte lineage are not beneficial in myocardial regeneration. A proposal of selection to eliminate these cells may improve cell therapy of infarcted myocardium. Rev. Bras. Hematol. Hemoter. 2009;31 (Supl. 1):82-86.

Key words: Stem cell; bone marrow; heart; myocardium; cell therapy.

Referências Bibliográficas

- Bartunek J, Vanderheyden M, Vandekerckhove B, Mansour S, De Bruyne B, De Bondt P, et al. Intracoronary injection of CD133-positive enriched bone marrow progenitor cells promotes cardiac recovery after recent myocardial infarction: feasibility and safety. *Circulation*. 2005;112(9 Suppl):I178-83.
- Kocher AA, Schuster MD, Szabolcs MJ, Takuma S, Burkhoff D, Wang J, et al. Neovascularization of ischemic myocardium by human bone-marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function. *Nat Med*. 2001;7(4):430-6.
- Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Jakoniuk I, Anderson SM, Li B, et al. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature*. 2001;410(6829):701-5.
- Rota M, Kajstura J, Hosoda T, Bearzi C, Vitale S, Esposito G, et al. Bone marrow cells adopt the cardiomyogenic fate in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007;104(45):17783-8.
- Chen SL, Fang WW, Ye F, Liu YH, Qian J, Shan SJ, et al. Effect on left ventricular function of intracoronary transplantation of autologous bone marrow mesenchymal stem cell in patients with acute myocardial infarction. *Am J Cardiol*. 2004;94(1):92-5.
- Silva GV, Litovsky S, Assad JA, Sousa AL, Martin BJ, Vela D, et al. Mesenchymal stem cells differentiate into an endothelial phenotype, enhance vascular density, and improve heart function in a canine chronic ischemia model. *Circulation*. 2005; 111(2):150-6.
- Toma C, Pittenger MF, Cahill KS, Byrne BJ, Kessler PD. Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart. *Circulation*. 2002;105(1):93-8.
- Miyahara Y, Nagaya N, Kataoka M, Yanagawa B, Tanaka K, Hao H, et al. Monolayered mesenchymal stem cells repair scarred myocardium after myocardial infarction. *Nat Med*. 2006;12(4):459-65.
- Beltrami AP, Barlucchi L, Torella D, Baker M, Limana F, Chimenti S, et al. Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell*. 2003;114(6):763-76.

10. Urbanek K, Torella D, Sheikh F, De Angelis A, Nurzynska D, Silvestri F, *et al.* Myocardial regeneration by activation of multipotent cardiac stem cells in ischemic heart failure. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2005;102(24):8692-7.
11. Limana F, Zacheo A, Mocini D, Mangoni A, Borsellino G, Diamantini A, *et al.* Identification of myocardial and vascular precursor cells in human and mouse epicardium. *Circ Res.* 2007;101(12):1255-65.
12. Assmus B, Schächinger V, Teupe C, Britten M, Lehmann R, Döbert N, *et al.* Transplantation of Progenitor Cells and Regeneration Enhancement in Acute Myocardial Infarction (Topcare-AMI). *Circulation.* 2002;106(24):3009-17.
13. Dohmann HF, Perin EC, Borojevic R, Silva SA, Souza AL, Silva GV, *et al.* Sustained improvement in symptoms and exercise capacity up to six months after autologous transendocardial transplantation of bone marrow mononuclear cells in patients with severe ischemic heart disease. *Arq Bras Cardiol.* 2005;84(5):360-6.
14. Dohmann HF, Perin EC, Takiya CM, Silva GV, Silva SA, Sousa AL, *et al.* Transendocardial autologous bone marrow mononuclear cell injection in ischemic heart failure: postmortem anatomico-pathologic and immunohistochemical findings. *Circulation.* 2005;112(4):521-6.
15. Perin EC, Dohmann HF, Borojevic R, Silva SA, Sousa AL, Mesquita CT, *et al.* Transendocardial, autologous bone marrow cell transplantation for severe, chronic ischemic heart failure. *Circulation.* 2003;107(18):2294-302.
16. Perin EC, Dohmann HF, Borojevic R, Silva SA, Sousa AL, Silva GV, *et al.* Improved exercise capacity and ischemia 6 and 12 months after transendocardial injection of autologous bone marrow mononuclear cells for ischemic cardiomyopathy. *Circulation.* 2004;110(11 Suppl 1):II213-8.
17. Strauer BE, Brehm M, Zeus T, Köstering M, Hernandez A, Sorg RV, *et al.* Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans. *Circulation.* 2002;106(15):1913-8.
18. Abdel-Latif A, Bolli R, Tleyjeh IM, Montori VM, Perin EC, Hornung CA, *et al.* Adult bone marrow-derived cells for cardiac repair: a systematic review and meta-analysis. *Arch Intern Med.* 2007;167(10):989-97.
19. Schächinger V, Erbs S, Elsässer A, Haberbosch W, Hambrecht R, Hölschermann H, *et al.* Intracoronary bone marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction. *N Engl J Med.* 2006;355(12):1210-21.
20. Lunde K, Solheim S, Aakhus S, Arnesen H, Abdelnoor M, Egeland T, *et al.* Intracoronary injection of mononuclear bone marrow cells in acute myocardial infarction. *N Engl J Med.* 2006;355(12):1199-209.
21. Seeger FH, Tonn T, Krzossok N, Zeiher AM, Dimmeler S. Cell isolation procedures matter: a comparison of different isolation protocols of bone marrow mononuclear cells used for cell therapy in patients with acute myocardial infarction. *Eur Heart J.* 2007;28(6):766-72.
22. Sutherland DR, Anderson L, Keeney M, Nayar R, Chin-Yee I. The ISHAGE guidelines for CD34+ cell determination by flow cytometry. *International Society of Hematotherapy and Graft Engineering. J Hematother.* 1996;5(3):213-26.
23. Sutherland HJ, Eaves CJ, Eaves AC, Dragowska W, Lansdorp PM. Characterization and partial purification of human marrow cells capable of initiating long-term hematopoiesis in vitro. *Blood.* 1989;74(5):1563-70.
24. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, *et al.* Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science.* 1999;284(5411):143-7.
25. Castro-Malaspina H, Gay RE, Jhanwar SC, Hamilton JA, Chiarieri DR, Meyers PA, *et al.* Characteristics of bone marrow fibroblast colony-forming cells (CFU-F) and their progeny in patients with myeloproliferative disorders. *Blood.* 1982;59(5):1046-54.
26. Dohmann HF, Silva SA, Souza AL, Rossi MI, Takiya CM, Borojevic R. Bone-marrow mononuclear cell therapy of severe ischemic heart failure. *C R Biol.* 2007;330(6-7):543-9.
27. Silva SA, Rossi MID, Borojevic R, Sousa AL, Silva GV, Perin EC, *et al.* Autologous bone marrow mononuclear cell transplantation (ABMMCT) for patients with severe ischemic heart failure: Correlation of the cells phenotypes with the analyzed clinical variables. *J. Cardiac Failure.* 2006; 12:S40.
28. Colter DC, Class R, DiGirolamo CM, Prockop DJ. Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000;97(7):3213-8.
29. Murry CE, Field LJ, Menasché P. Cell-based cardiac repair: reflections at the 10-year point. *Circulation.* 2005;112(20):3174-83.

Suporte Financeiro: APBCAM; CNPq; Faperj; Capes

Avaliação: O tema apresentado consta da pauta elaborada pelo editor, Professor Milton Artur Ruiz, e coeditores deste suplemento, Professores Sergio Paulo Bydlowski e Adriana Seber.

Conflito de interesse: não declarado

Recebido: 26/08/2008

Aceito: 03/10/2008