

Células-tronco e suas aplicações

Brasilia-25 de junho



Mayana Zatz

Diretora-CENTRO DO GENOMA HUMANO e CÉLULAS-TRONCO
INSTITUTO NACIONAL DE CÉLULAS-TRONCO EM DOENÇAS GENÉTICAS

Células-tronco dos pacientes e para os pacientes



I – Como ferramenta para investigar, em diferentes tecidos, a expressão de genes envolvidos em doenças genéticas



Estabelecimento de linhagens celulares de pacientes afetados



Nossos pacientes “in vitro”

II. Terapia celular



Comparando células-tronco adultas de diferentes fontes “in vitro” e “in vivo” em vários modelos animais

CÉLULAS-TRONCO DOS PACIENTES



Yamanaka

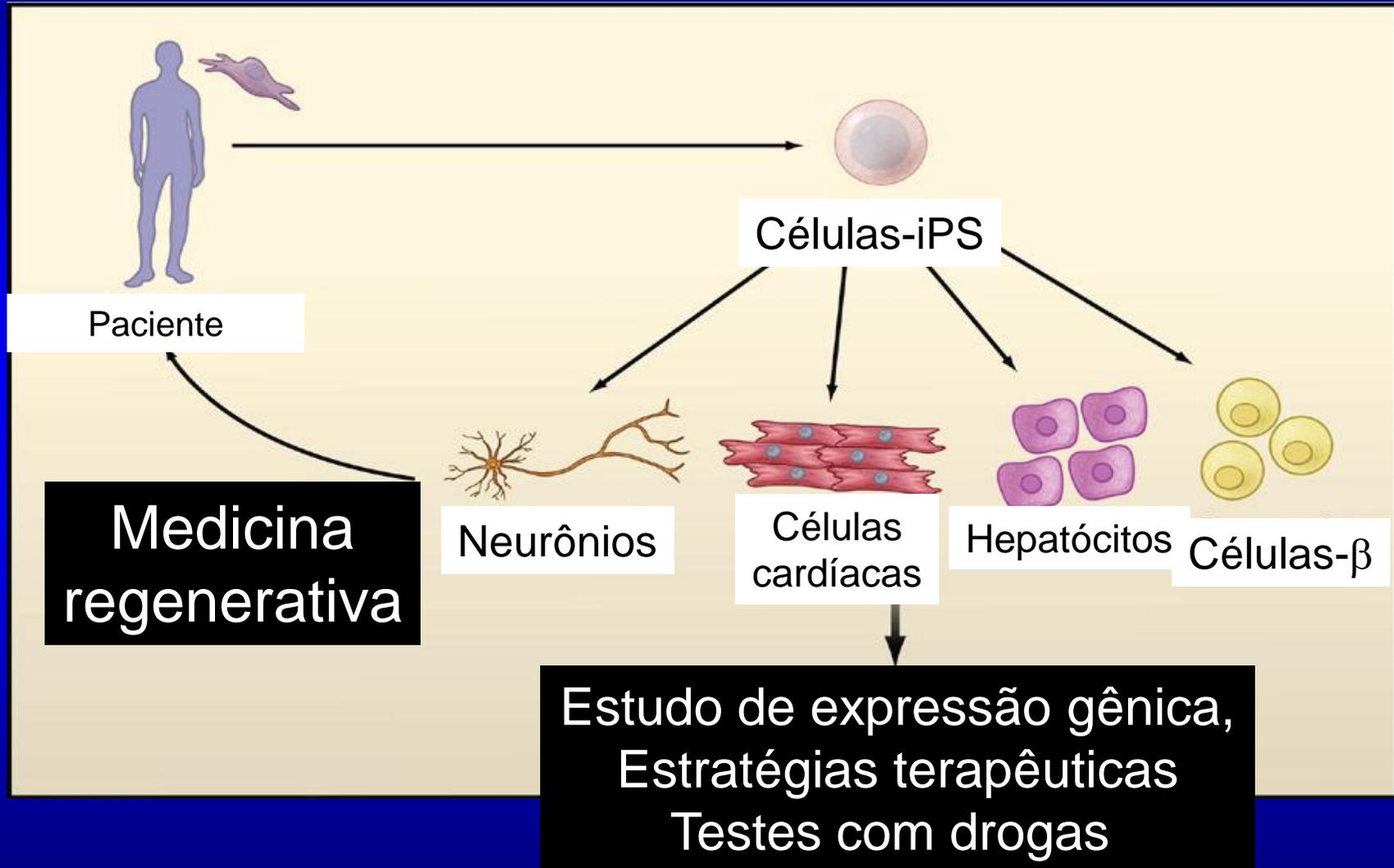
Reprogramar células já diferenciadas

Fibroblastos



- ➡ Semelhantes a células-tronco pluripotentes (células IPS)
- ➡ Com potencial de diferenciar-se em qualquer linhagem celular

Células IPS Nossos pacientes “in vitro”



O que estamos pesquisando ?

Autismo

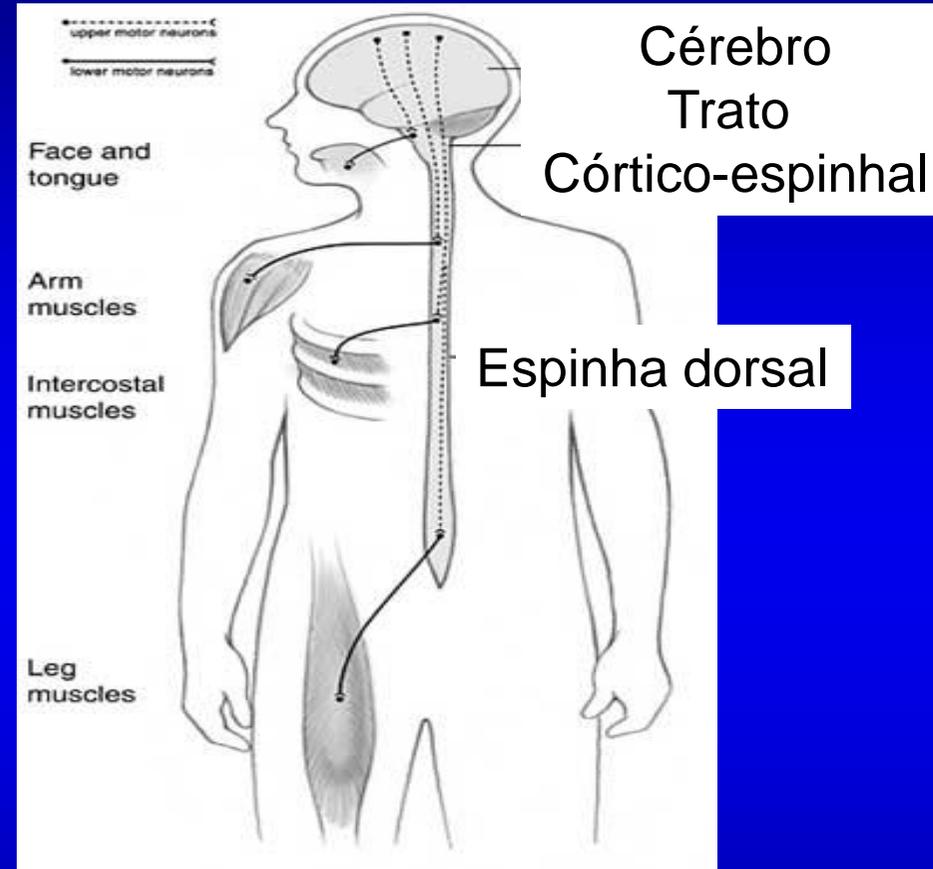
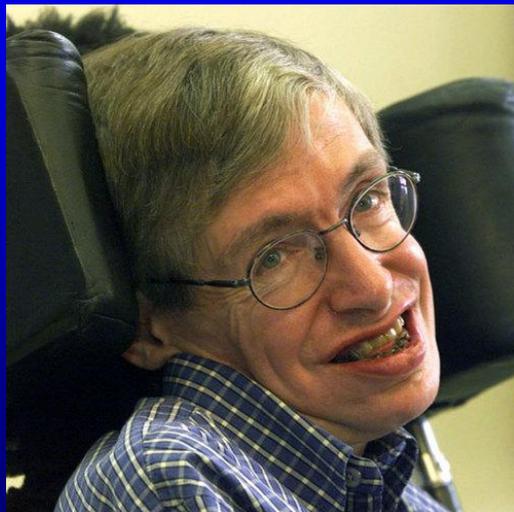
Doenças neuromusculares

Esclerose lateral amiotrófica (ELA)

Esclerose Lateral amiotrófica- ELA

Doença rapidamente progressiva

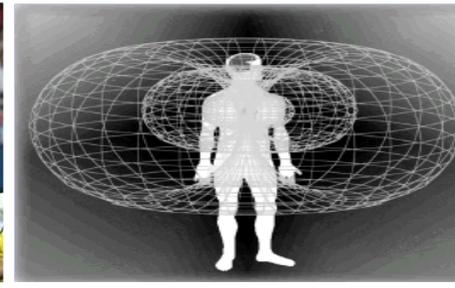
- Morte Seletiva dos Neurônios Motores
 - Heterogeneidade clínica
 - Cognição é mantida



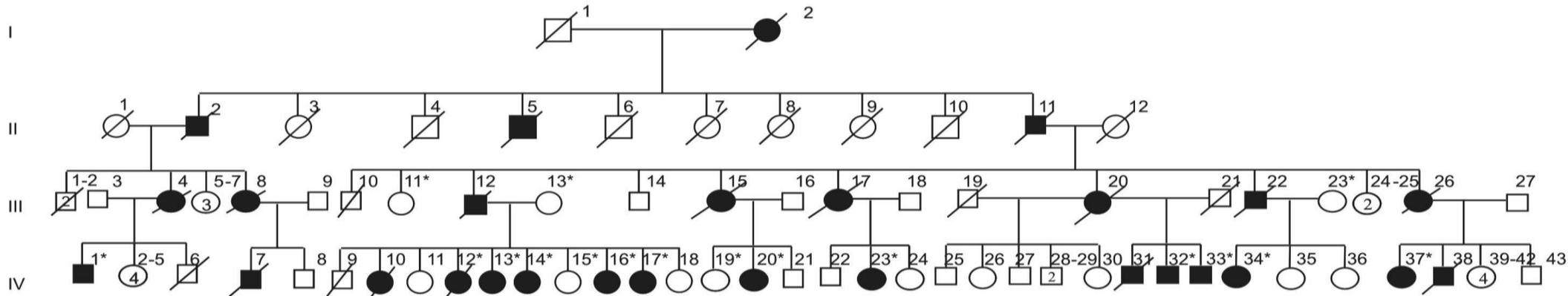
EUA: ~30.000 casos
Brasil : ?????

FORMAS

ESPORÁDICAS (90%):
sem causas definidas



FAMILIARES (5-10%):
transmitidas de uma geração para
outra



O que causa a morte dos neurônios motores?

Esclerose lateral amiotrófica tipo 8



ELA8



Agnes Nishimura



Miguel Mitne-Netto

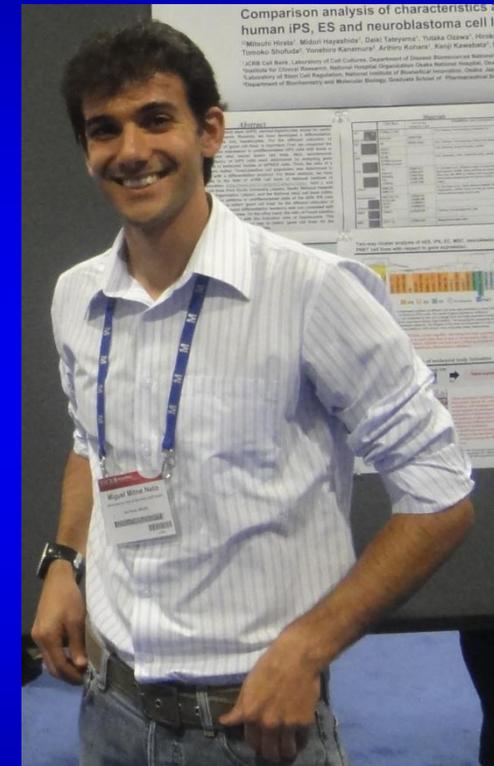
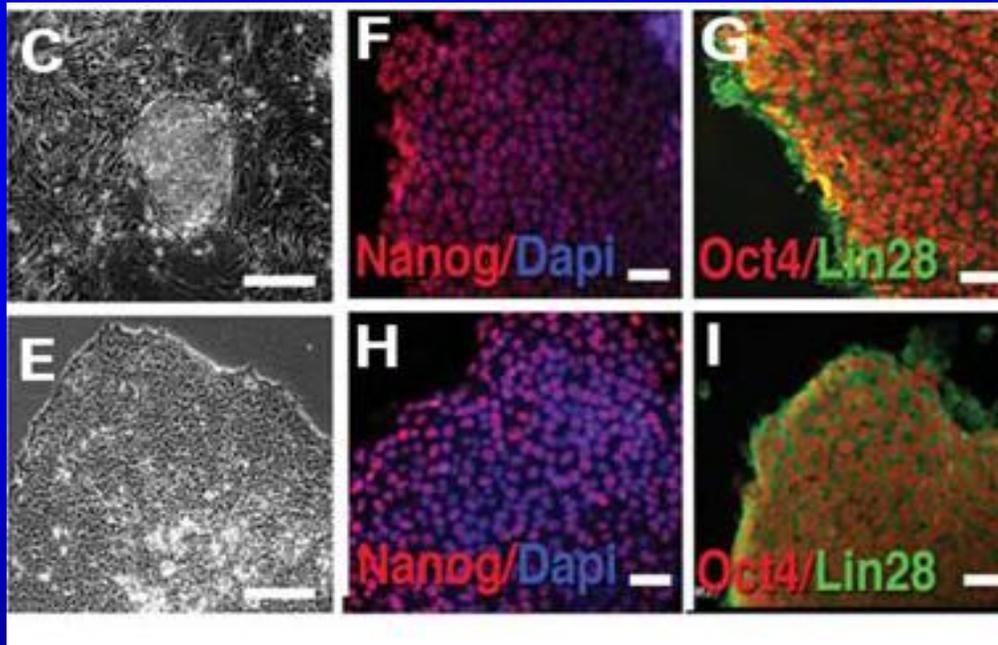
Gene da ELA8 codifica proteína de transporte nuclear: VAP-B

AUDITORIO
PROFESOR BENITO RAYLE



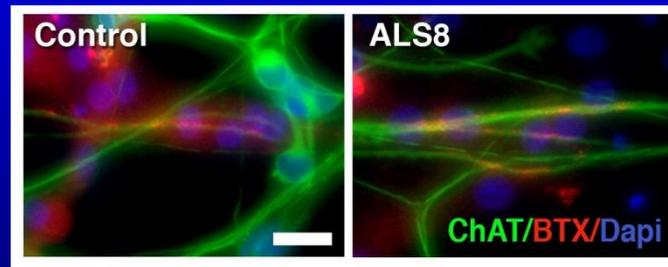
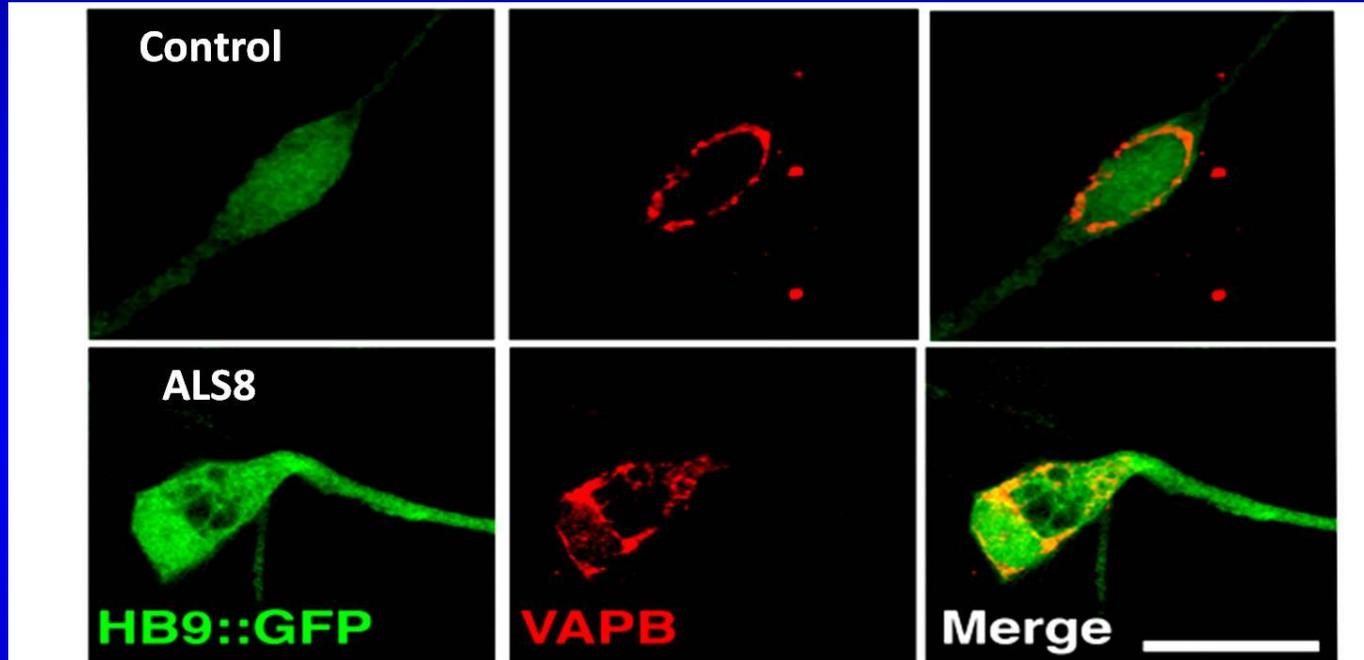
Foram geradas células iPSc e neurônios motores

- 👉 4 pacientes com ELA8 (2 famílias)
- 👉 3 parentes sem a mutação P56S



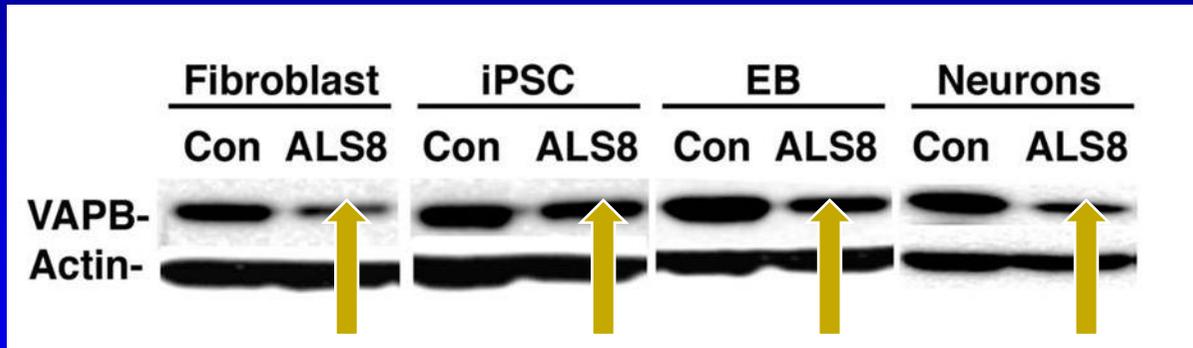
Miguel Mitne-Neto
Colab. Alysson Muotri

VAP-B está presente nas células pluripotentes IPS e nos neurônios motores

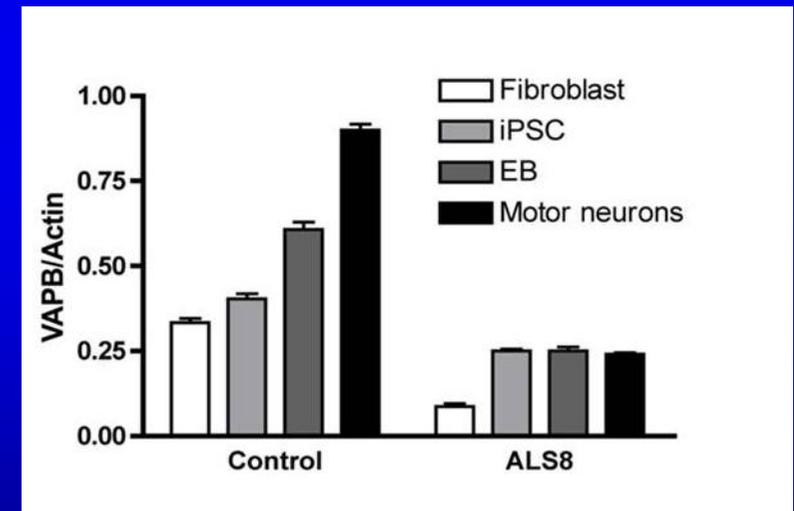


Neuromuscular junction

Níveis de VAPB estão reduzidos em fibroblastos, células IPS e neurônios motores



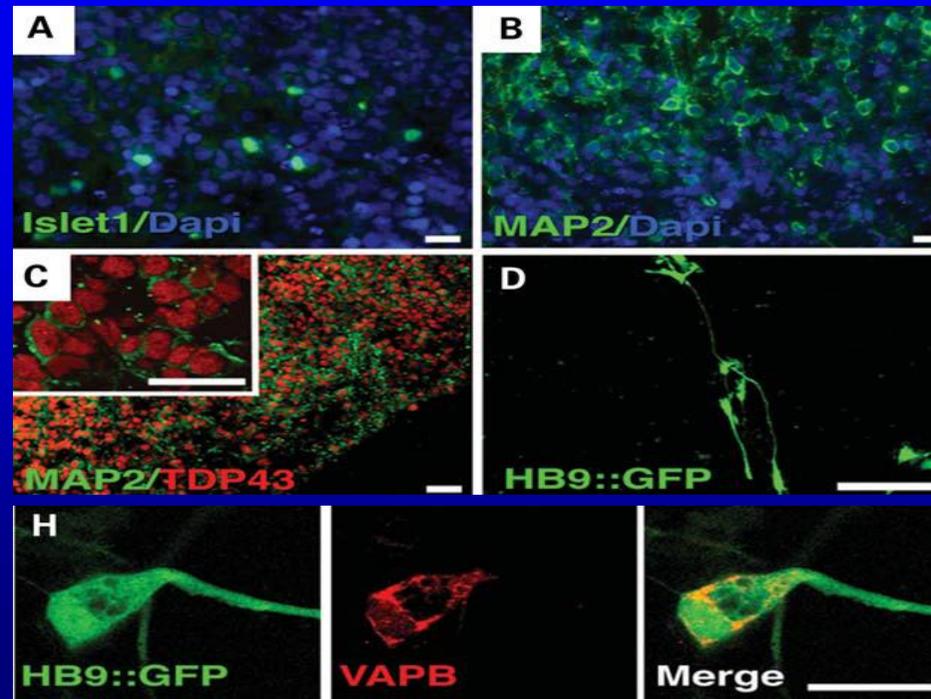
Perda de função?



Mitne-Neto et al., Human Molecular Genetics, 2011 😊

•Nossa Hipótese:

- Com envelhecimento níveis de VAPB podem ser cruciais para a viabilidade do neurônio motor



Doenças raras podem desvendar mecanismos comuns

Diminuição de VAP-B encontrada em neuronios motores de autopsias obtidas de pacientes com ELA esporádica

VAP-B diminui com a progressão da doença no camundongo SOD1, outra forma de ELA hereditária

Aumentar expressão VAP-B poderia proteger os neuronios motores?

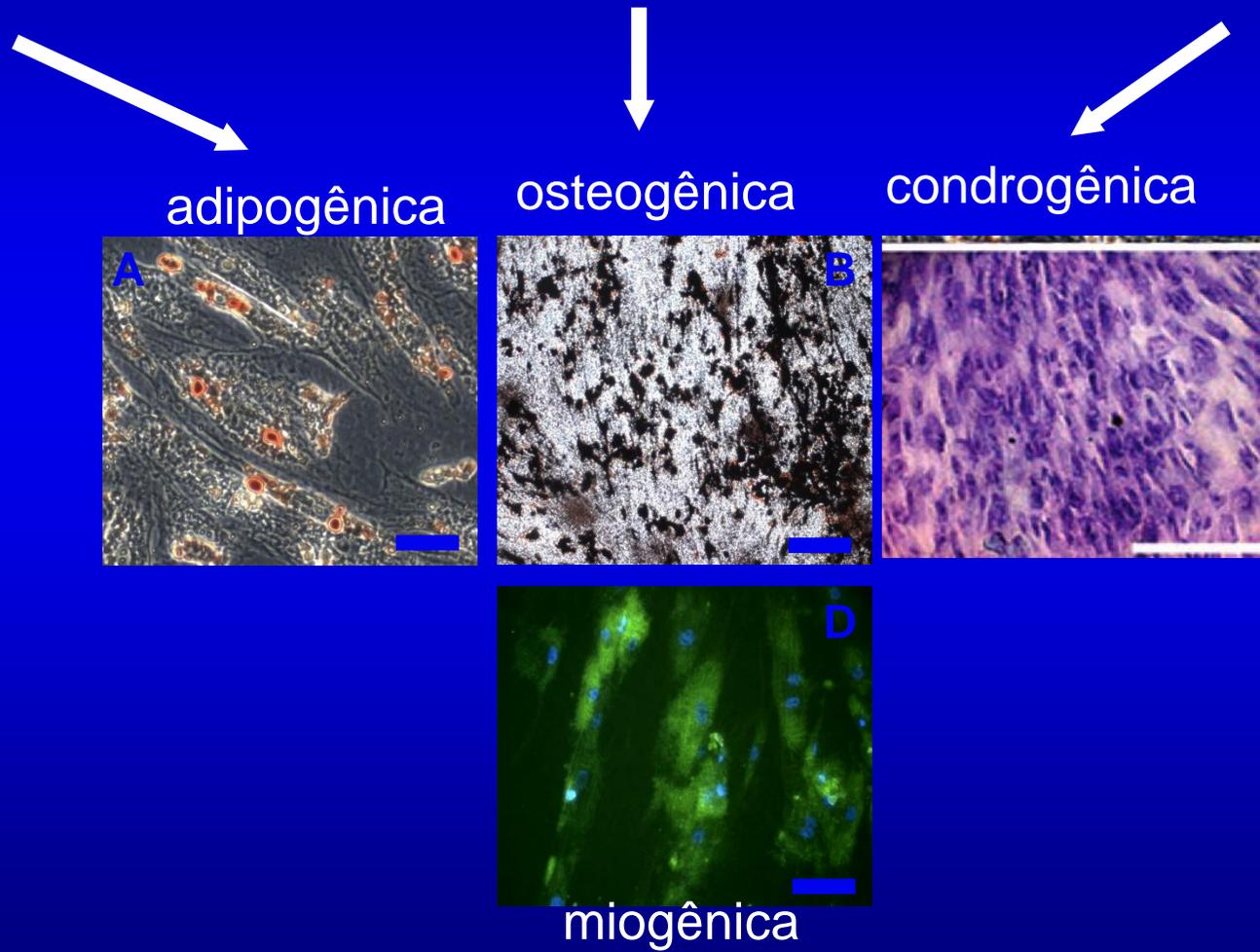
CÉLULAS-TRONCO PARA TERAPIA CELULAR

Um sub-grupo de células-tronco
adultas muito especiais

Células-tronco mesenquimais (MSCs)



Potencial para se diferenciar em linhagens

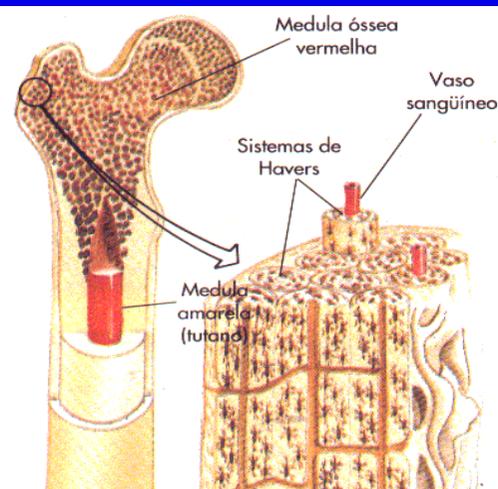


Células-tronco adultas:(multipotentes /oligopotentes)

Fontes de células-tronco adultas mesenquimais



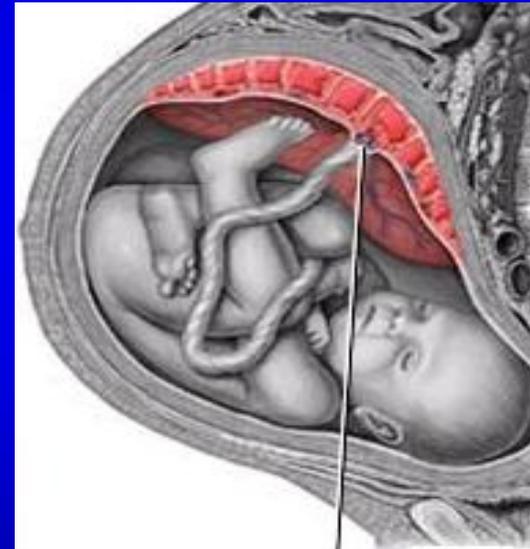
Polpa de dente



Medula óssea



Gordura de Lipoaspiração



Na placenta e no cordão umbilical

Elas não são embrionárias!

IDENTIFICANDO NOVAS FONTES DE CÉLULAS-TRONCO

Tuba uterina

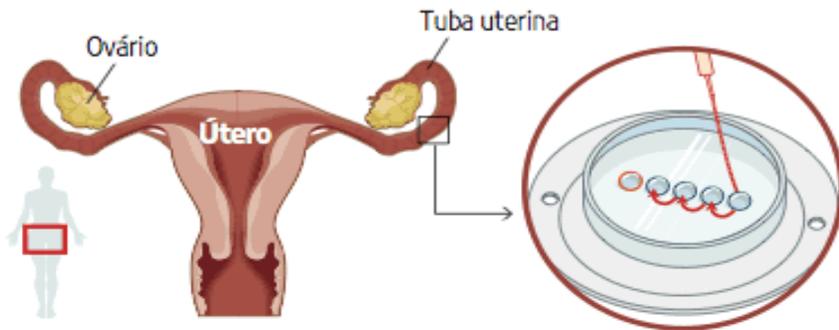
Mais uma fonte de células-tronco mesenquimais



Tatiana Jazedje

CÉLULAS-MÃE

Tuba uterina é nova fonte de células-tronco adultas



1 Acaso

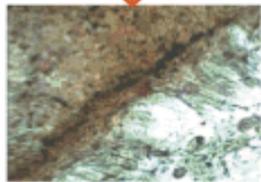
Os cientistas examinaram tecidos extraídos de pacientes que haviam sido submetidas a laqueadura ou a retirada do útero

2 Descoberta

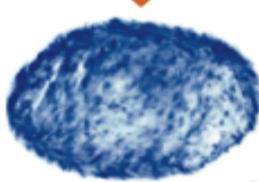
Dessas amostras eles isolaram uma população de células aparentemente capazes de se diferenciar em vários tipos de tecido

3 Comprovação

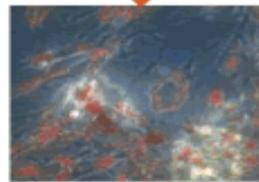
O grupo tratou de "convencer" quimicamente as células a se diferenciarem. Deu certo, e eles conseguiram produzir:



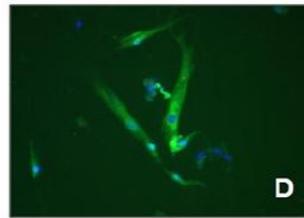
Células ósseas



Células de cartilagem



Células de gordura



✓ Em descarte cirúrgico

✓ Sem problemas éticos

Journal of Translational Medicine

Research

Human fallopian tube: a new source of multipotent adult mesenchymal stem cells discarded in surgical procedures

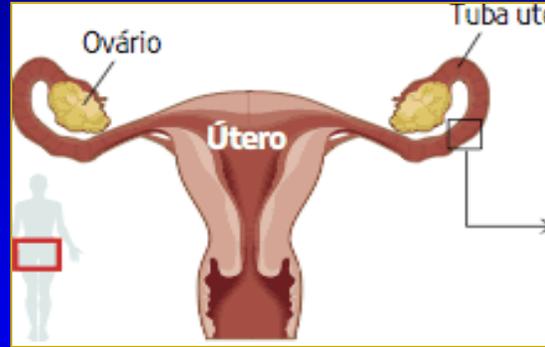
Tatiana Jazedje¹, Paulo M Perin², Carlos E Czeresnia³, Mariangela Maluf², Silvio Halpern², Mariane Secco¹, Daniela F Bueno¹, Natassia M Vieira¹, Eder Zucconi¹ and Mayana Zatz*¹

Open Access

Fontes de células-tronco mesenquimais adultas



Polpa de dente



Trompas



cordão umbilical



Sangue menstrual

Gordura de
Lipoaspiração

Aproveitando todos os
descartes biológicos...

Uma questão polêmica

COMPARAÇÃO ENTRE DIFERENTES FONTES DE CÉLULAS-TRONCO

Tecido do cordão tem 10 vezes mais células-tronco mesenquimais do que o sangue

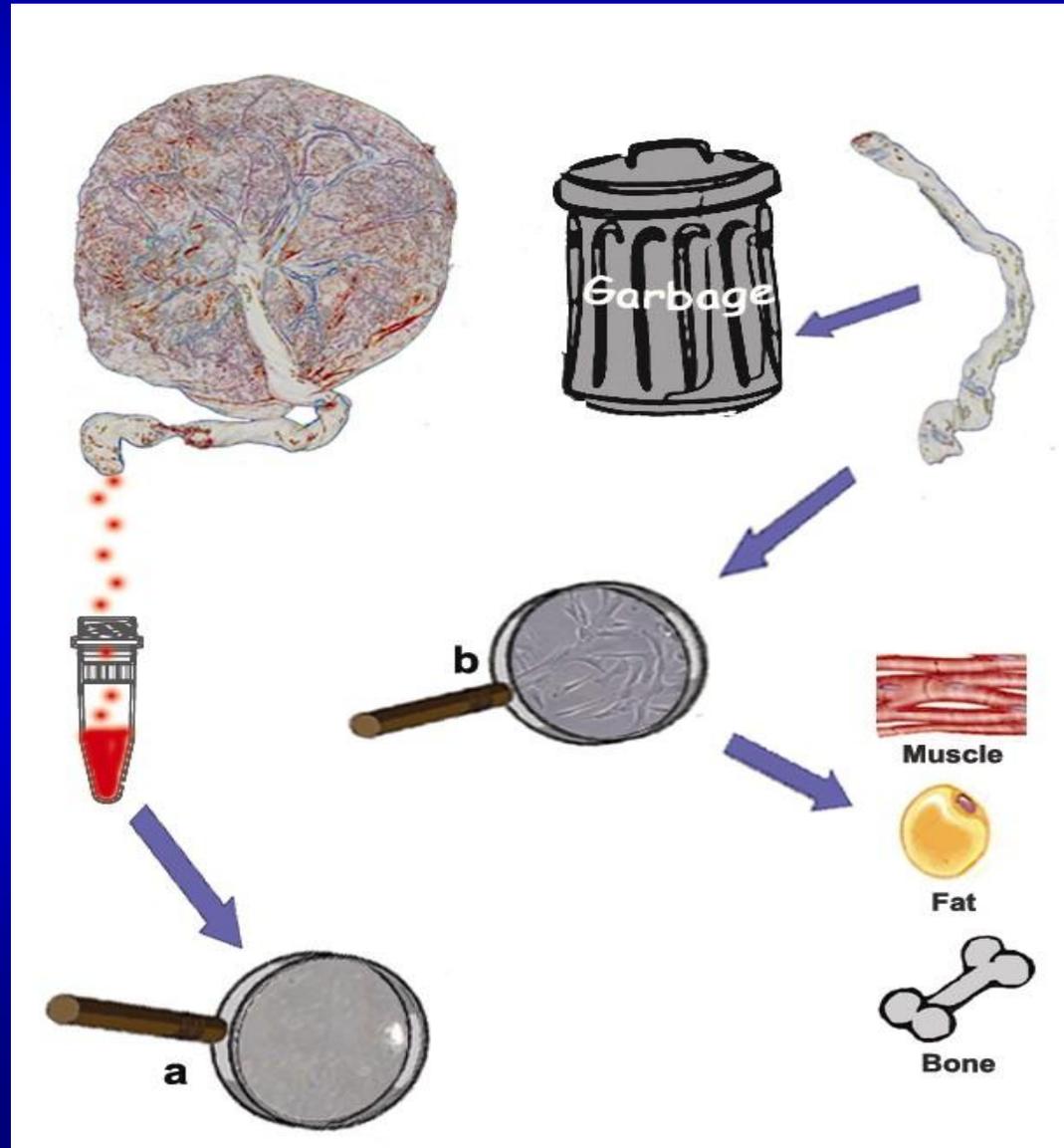


Mariane



Eder

Não descartem o cordão umbilical E nem a trompa !



CT adultas: Quais são as dúvidas ????

- ☞ Que tecidos as células-tronco adultas são **realmente** capazes de regenerar?
- ☞ Como conseguir quantidade suficiente ?
- ☞ Como fazê-las diferenciar-se no tecido que queremos? E somente nesse tecido?
- ☞ Como garantir que cheguem ou permaneçam no órgão alvo? Uma ou múltiplas injeções?
- ☞ Como evitar a rejeição? Imunosupressão é necessária?
- ☞ **Células-tronco ou fatores liberados por elas?**

Comparando a eficiência de células-tronco
de diferentes fontes para regenerar
osso e músculo “*in vitro*” e “*in vivo*”

O FUTURO DA TERAPIA CELULAR

Quais são as melhores fontes de células-tronco para regenerar tecido ósseo?

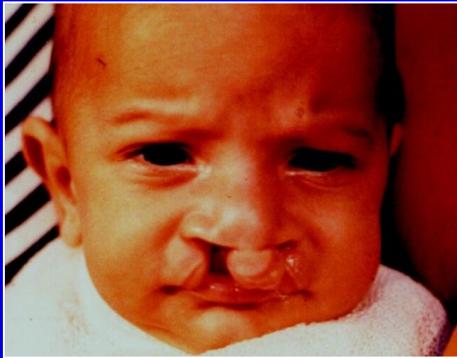
Laboratório de Desenvolvimento Craniofacial



Maria Rita Passos Bueno, BSc, PhD
Lab coordinator



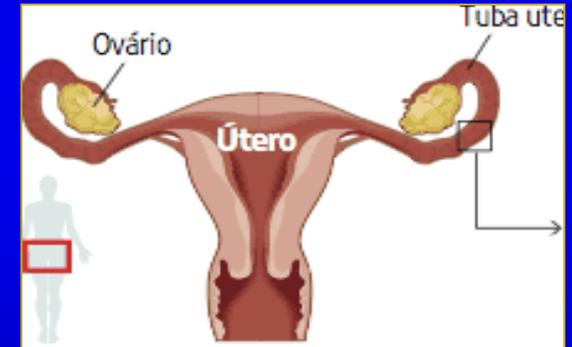
Comparação entre diferentes células-tronco



Musculo orbicular
Pálato e fenda palatina



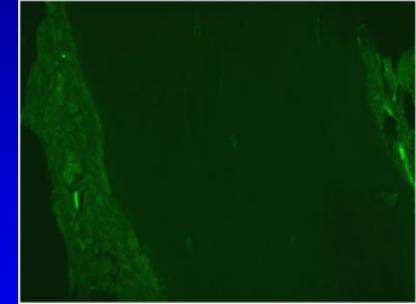
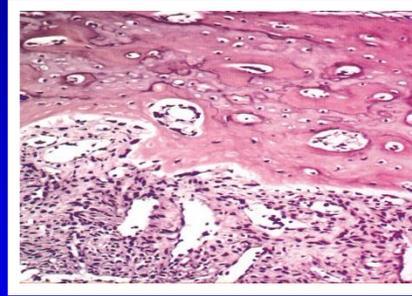
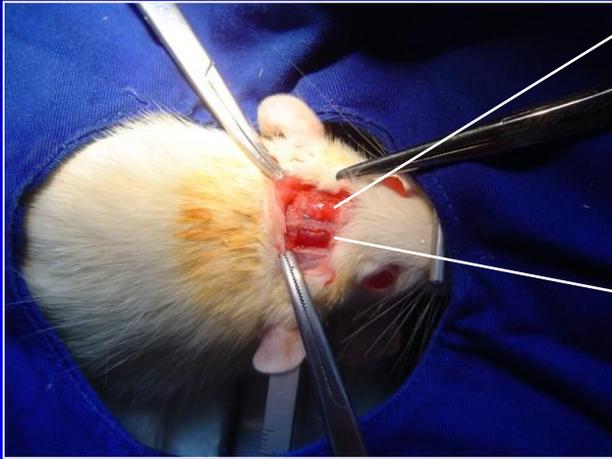
Polpa dentária



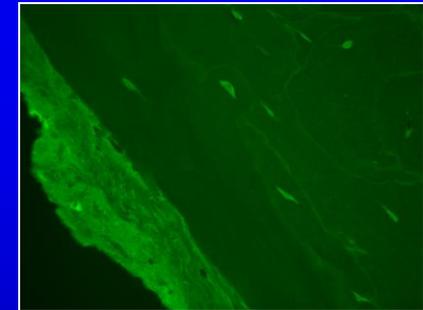
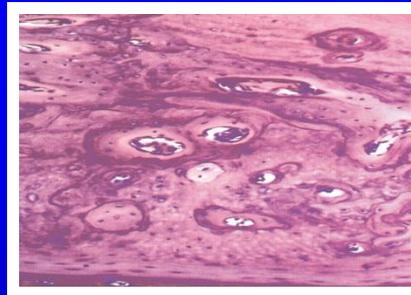
Trompas

Engenharia óssea

Esq: Membrana de colágeno (1 month)



Dir: Membrana de colágeno + céls-tronco



Ratos Wistar
Não imunossuprimidos
(9 meses), com defeito
crítico (5X8mm)

Células-tronco aceleram a regeneração óssea

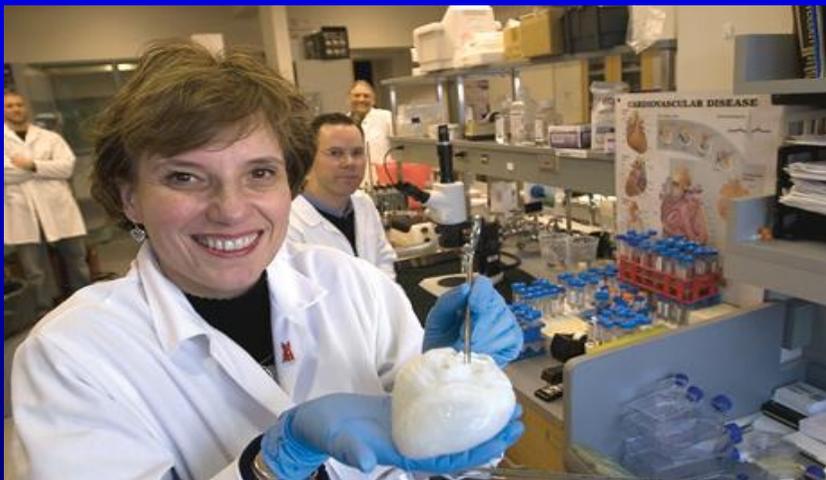
CÉLULAS-TRONCO PARA REGENERAÇÃO DE ÓRGÃOS

Um futuro promissor

Bioengenharia de Órgãos

Tissue engineering is the regeneration of biological tissue through the use of cells, with the aid of supporting structures and/or biomolecules

Técnica já foi utilizada com sucesso na produção de pele, bexiga, rim, traqueia, válvulas cardíacas, fígado, dentre outros.



PROJETO CIPETRO

Ministério da Saúde

Coordenação: Prof. Silvano Raia

Integrantes:

Centro do Genoma e células-tronco: CEGH-CEL
Faculdade de Medicina da USP
UNIFESP



No Brasil são atendidos apenas **30%** da demanda para transplante de órgãos sólidos.

- Captação insuficiente
- Descarte de órgãos (lesões celulares isquêmicas)



Como solucionar este problema?

OBJETIVOS DO CIPETRO

Sub-projeto 1:

Desenvolvimento de métodos para aumentar o número de fígados para transplante

- *Reproduzir no Brasil os dados publicados visando a produção de fígados modificados e funcionais.*
- Avaliar o repovoamento de matrizes (scaffold) com hepatócitos primários *versus* hepatócitos diferenciados a partir de células-tronco mesenquimais.

Sub-projeto 2:

Avaliação do papel (ou dos efeitos) de células-tronco mesenquimais no resgate de órgãos para transplantes

RIM

Dra. Irene
Noronha

FIGADO

Dr. Silvano
Raia



PULMAO

Dr. Paulo
Pêgo

PESQUISAS PRÉ-CLÍNICAS

DOENÇAS NEUROMUSCULARES

Incidência  **1/1000** indivíduos

~ 200.000

brasileiros afetados !

Distrofias musculares progressivas

Distrofia miotônica

Ataxias espino-cerebelares

Neuropatias periféricas

Atrofia espinhal

DISTROFIA MUSCULAR PROGRESSIVA DE DUCHENNE



Distrofia muscular de Duchenne- Ligada ao X

1/3000 nascimentos masculinos



Forma mais **comum e grave** das distrofias

Progressão **muito semelhante** em todos os afetados

DISTROFIA TIPO BECKER

INCIDENCIA

1/30.000

NASCIMENTOS
MASCULINOS

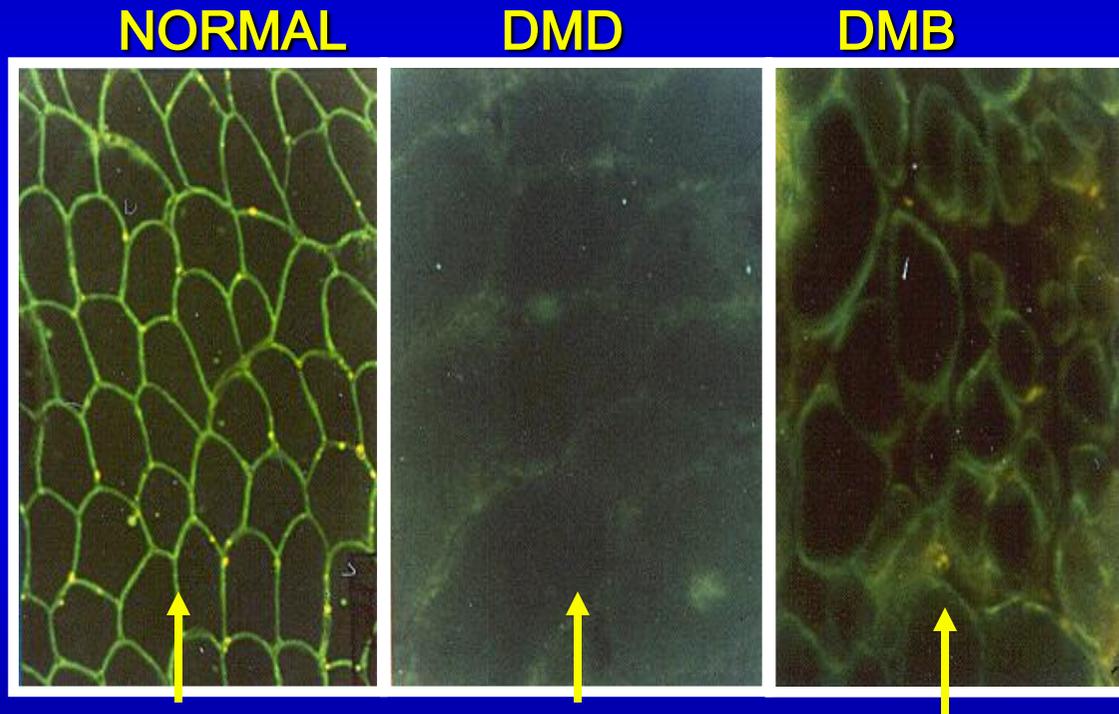
PROGNÓSTICO

MUITO VARIÁVEL!

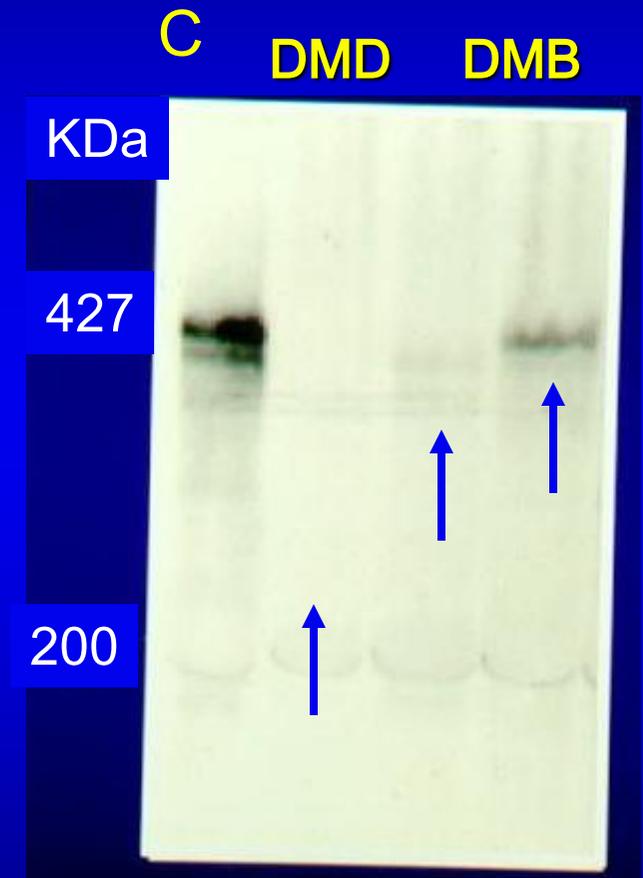


DISTROFINA NO MÚSCULO NA DMD E DMB

IMMUNOFLUORESCENCIA



WESTERN BLOT



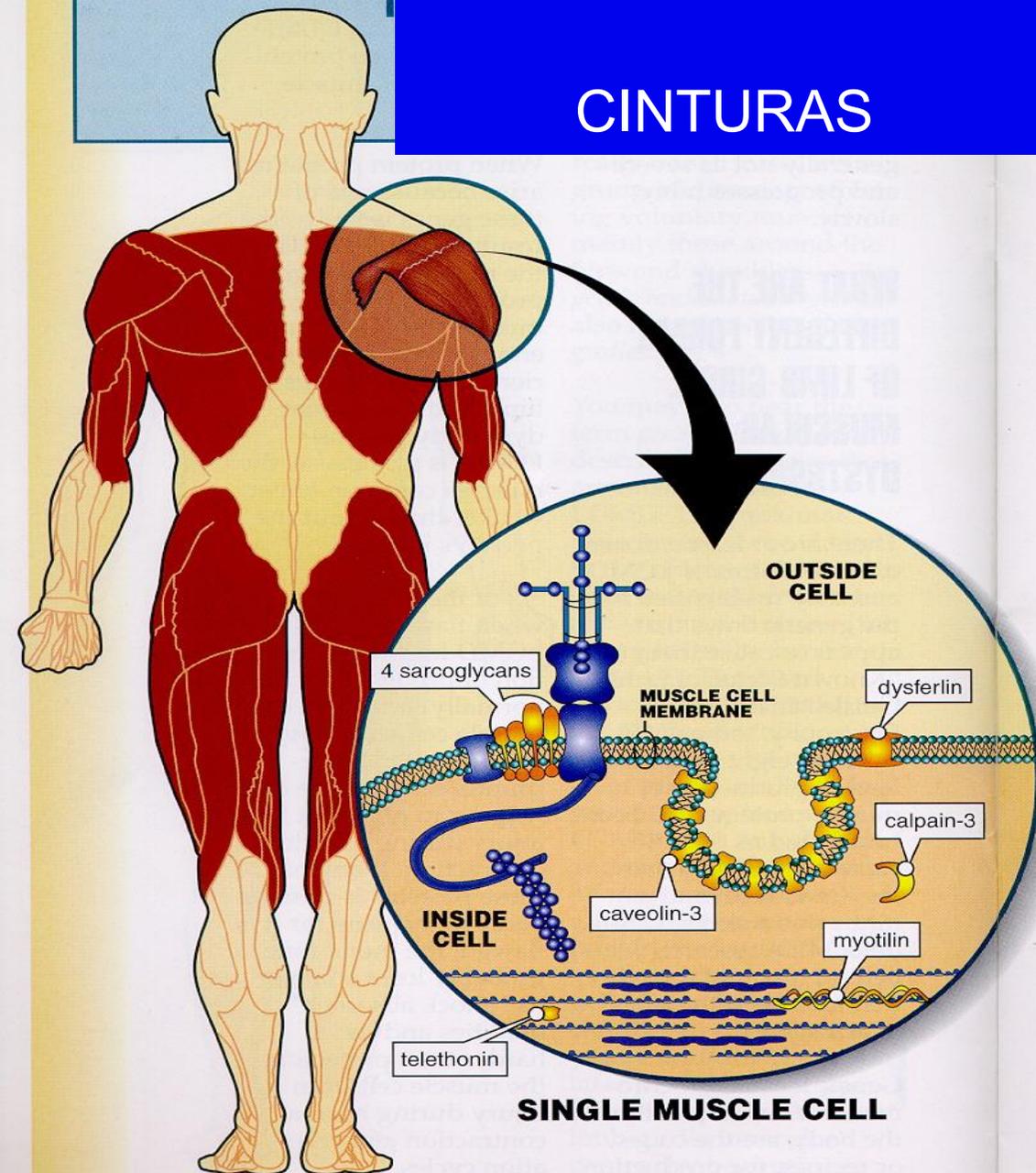
CORRELAÇÃO ENTRE QUANTIDADE DE DISTROFINA E GRAVIDADE DO FENÓTIPO

DISTROFIAS TIPO

CINTURAS

Atingem os dois
sexos

Já foram identificados
mais de **22** genes



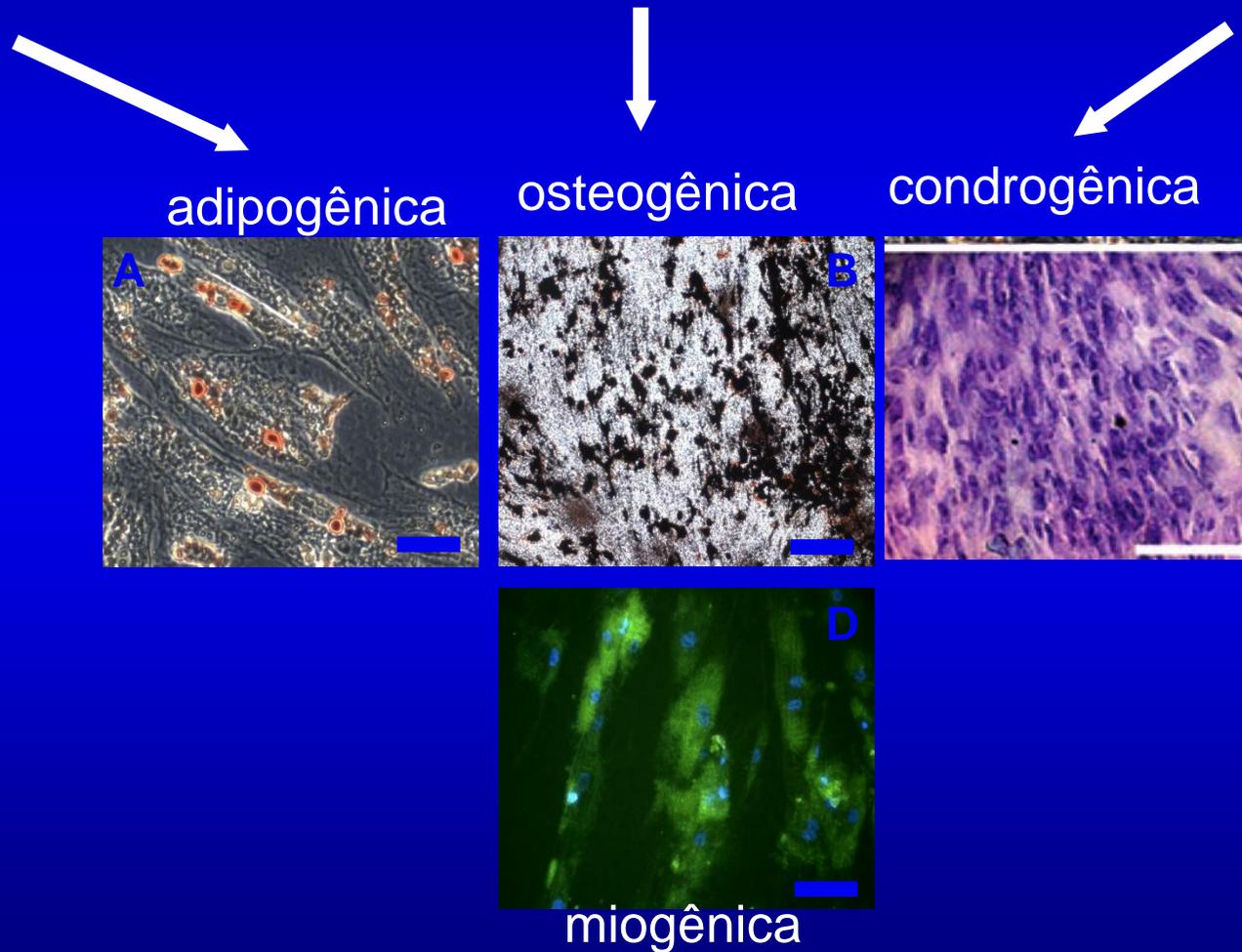
O grande desafio

Como tratar?

Células-tronco mesenquimais (MSCs)



Potencial para se diferenciar em linhagens



Qual é o potencial das células-tronco mesenquimais (CTMS) adultas de diferentes fontes para terapia celular de doenças neuromusculares?



QUESTÕES

1. Qual é a melhor fonte de CT humanas adultas para se diferenciar em músculo “in vivo”
2. Injeções: locais ou sistêmicas? Uma ou múltiplas?
3. Quanto tempo as CT permanecem nos músculos injetados ?
4. Imunosupressão é necessária?
5. Qual é o efeito clínico das injeções de CT?

Experimentos com duas fontes de células-tronco adultas



Gordura de
Lipoaspiração



cordão umbilical

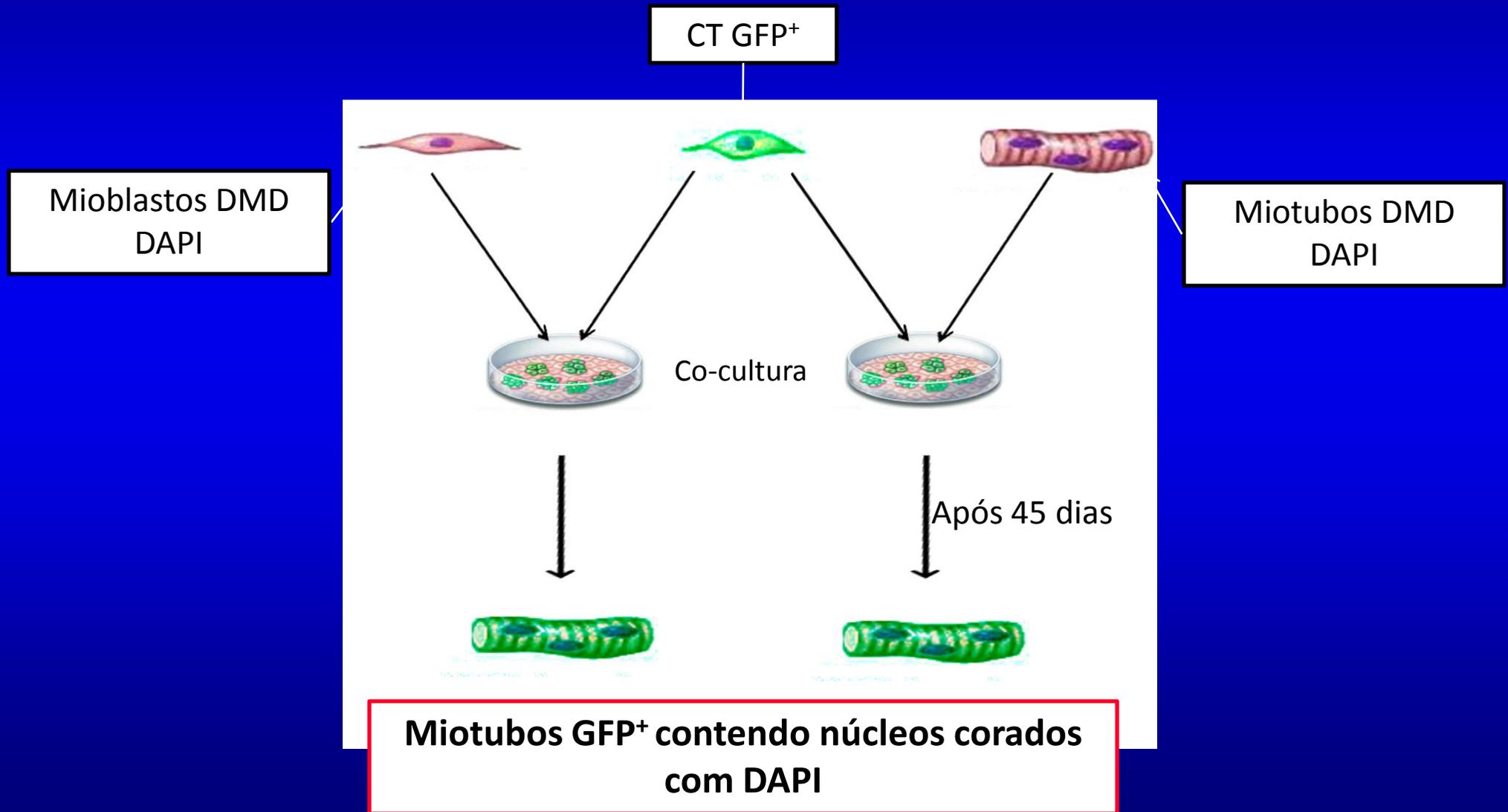
CT de lipoaspiração



Natassia
Vieira

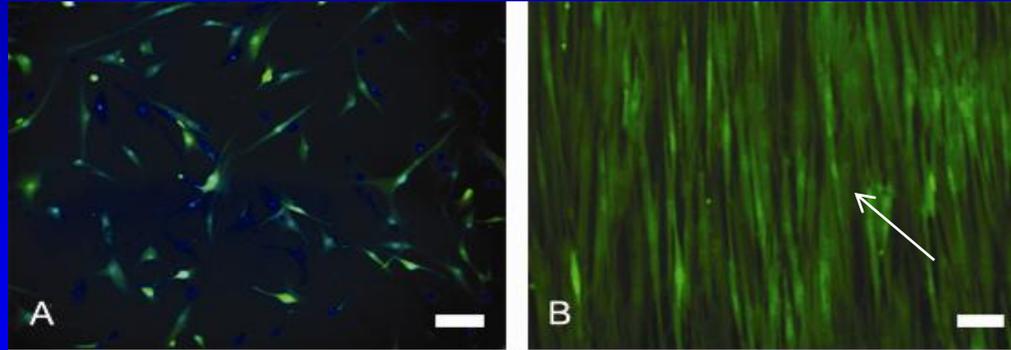


Células-tronco de tecido adiposo são capazes de restaurar a expressão de distrofina *in vitro* ?



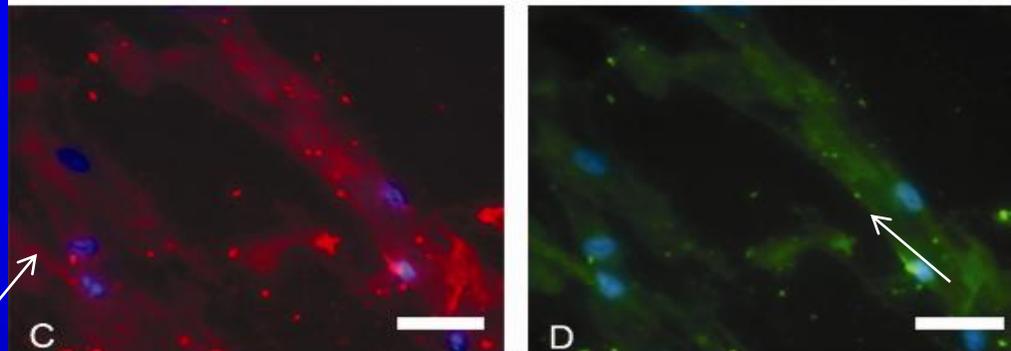
Co-cultivo CT e mioblastos DMD

Dia 1

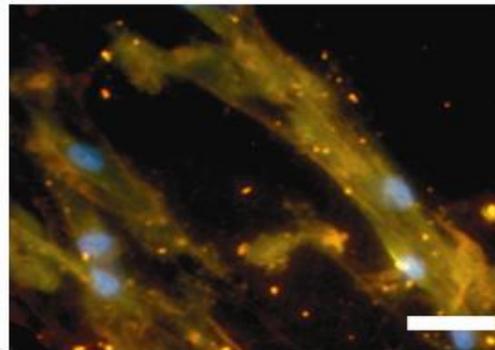


Dia 15: Miotubos
GFP⁺

Dia 45:
Miotubos
distrofina⁺ com
núcleos DAPI⁺



Dia 45: Miotubos
GFP⁺ com núcleos
DAPI⁺



A continuação do caminho



Experimentos “in vivo”

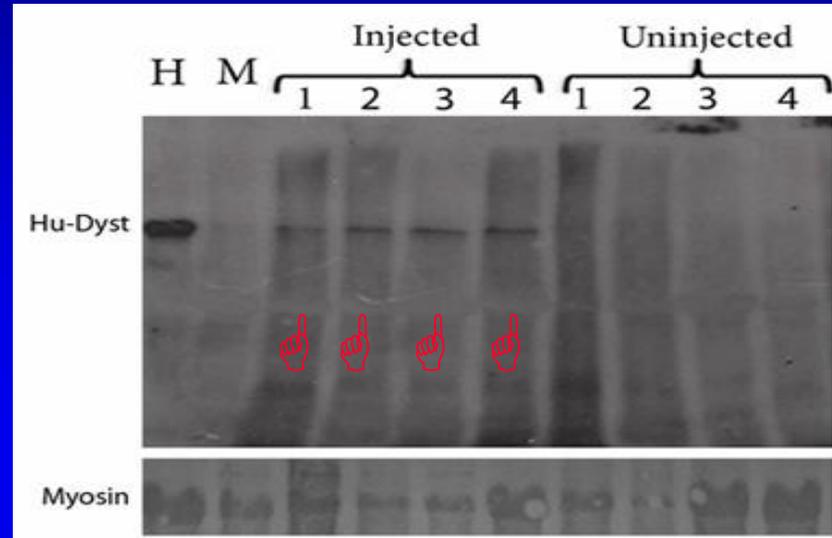
Células-tronco mesenquimais de tecido adiposo humano são capazes de expressar proteínas musculares humanas “in vivo”?



Camundongo *SJL*  modelo para distrofia de cinturas LGMD2B ou disferlinopatia

9 meses depois.....

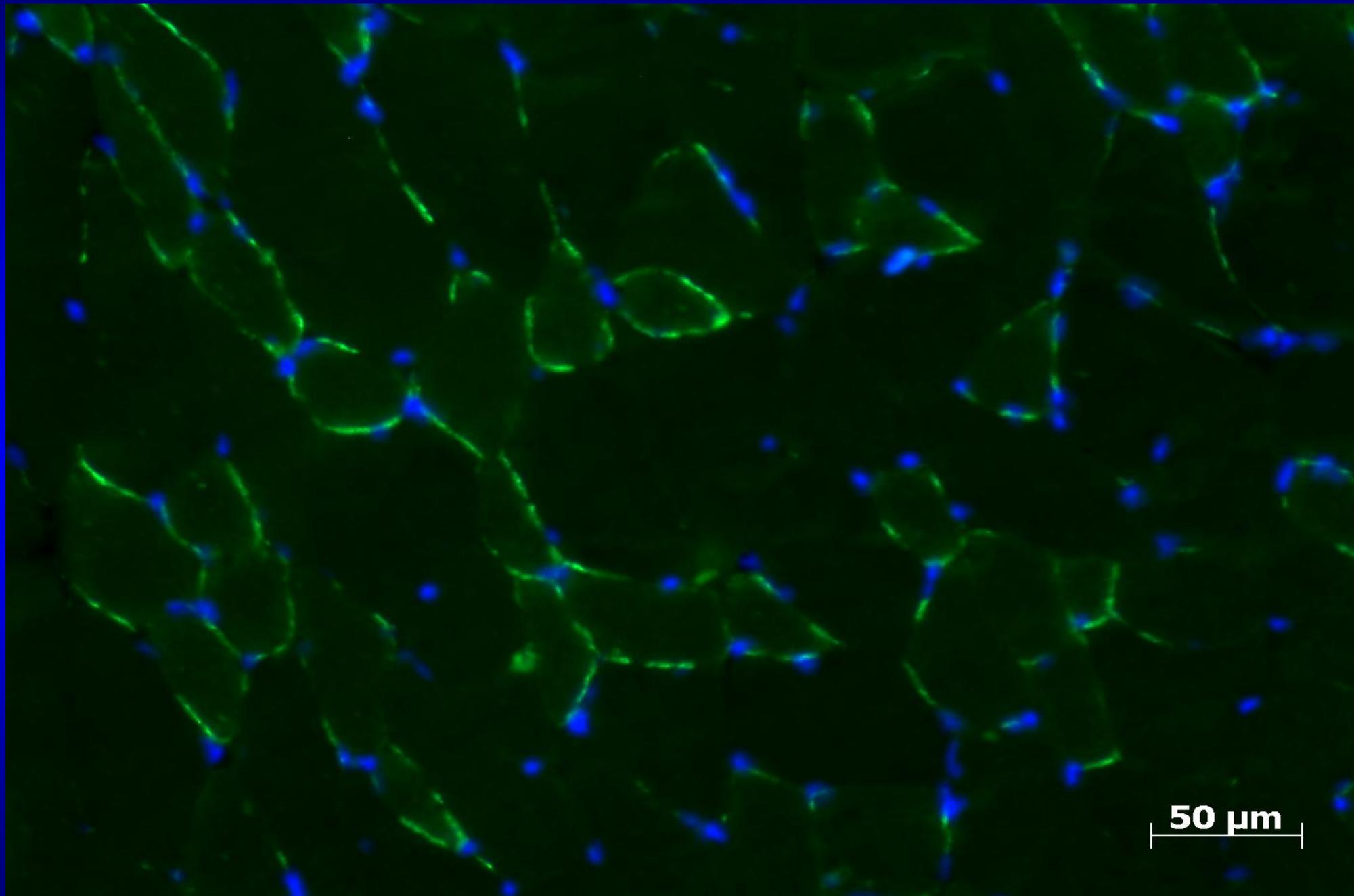
WB: presença de distrofina humana



Specific anti-human-dystrophin
MANEX 1216E2 Antibody

myosin = myosin band detected in the Ponceau S pre-stained blot.

- 1) Distal foreleg muscle
- 2) Proximal foreleg muscle
- 3) Distal hindleg muscle
- 4) Proximal hindleg muscle
- H) Human skeletal muscle
- M) Mouse skeletal muscle



Testes Clínicos

Resultados – Estudos funcionais

- O grupo tratado mostrou uma melhora no seu desempenho de $15.2 \pm 7.0\%$
- O grupo controle mostrou piora em seu desempenho de $6.12 \pm 6.0\%$ ($p = 0.013$, *t-Student test*, $n=7$).

Teste da corda Não injetado



Teste da corda Injetado



Que CTM são melhores para
formar músculo?
Tecido adiposo ou cordão
umbilical?



Natassia



Eder

SJL

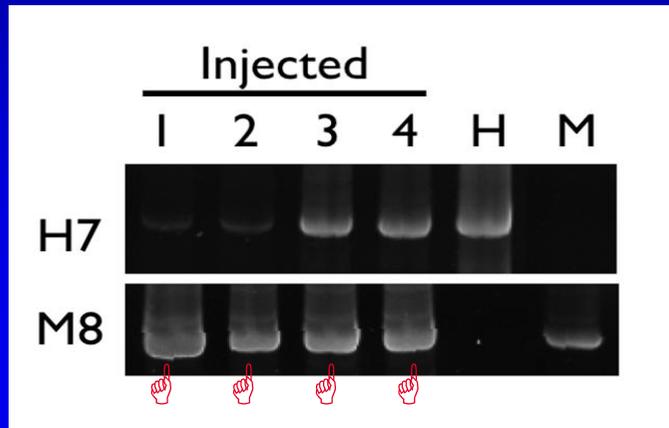


Modelo de distrofia
Tipo cinturas

EXPERIMENTO SEMELHANTE COM CAMUNDONGOS SJL

- 6  Células-mesenquimais de cordão umbilical humano
- 6  Controles não injetados

PRESENÇA DE DNA HUMANO

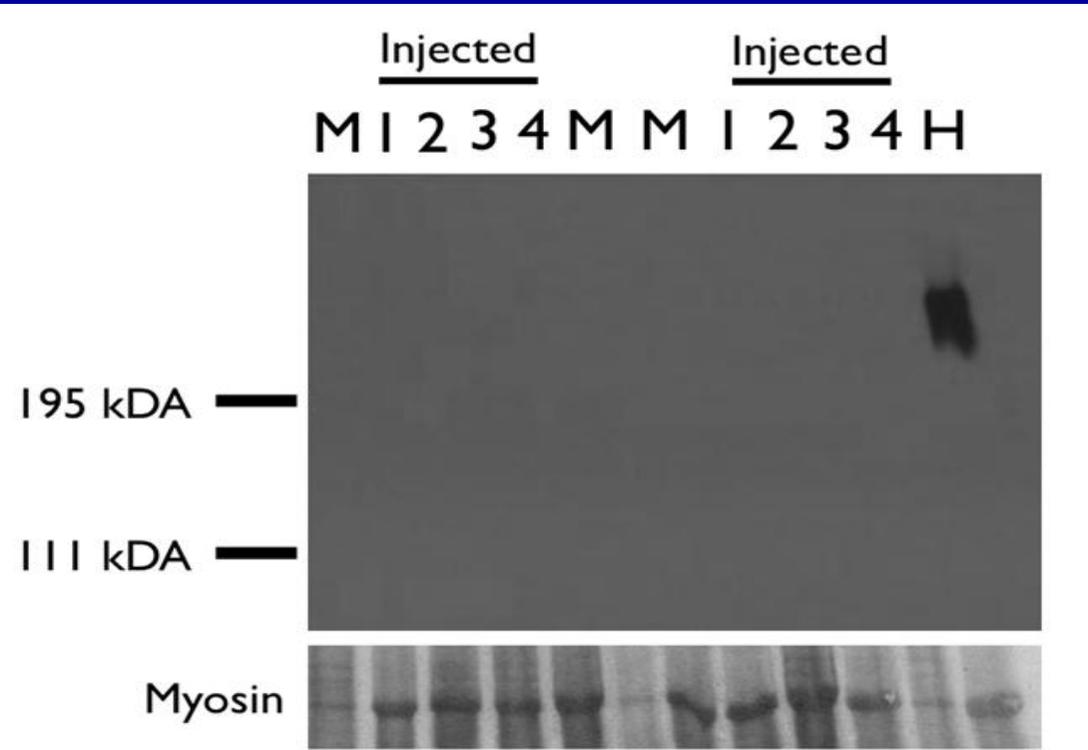


1. Músculo anterior distal
 2. Músculo anterior proximal
 3. Músculo posterior distal
 4. Músculo posterior proximal
- H. DNA humano
M. DNA murino

H7 – PCR seqüência alfa-satélite cromossomo 7 (humano)
M8 – PCR seqüência centromérica do cromossomo 8 (murino)

DNA humano encontrado nos músculos de camundongos injetados com células humanas do cordão umbilical

Mas não foi detectada distrofina humana



Anti-distrofina humana(MANDYS108-4D8)

Expressão de proteínas humanas – Western blot

1. Músculo anterior distal
 2. Músculo anterior proximal
 3. Músculo posterior distal
 4. Músculo posterior proximal
- H. Músculo esquelético humano
M. Músculo esquelético murino

Testes funcionais

- Natação
- Esteira
- **Rotarod**
- Inclinação
- Força (grip)
- Força (sustentação)



Grupo injetado manteve-se estável

Grupo não injetado piorou

Mesmo sem expressar distrofina houve um efeito benéfico

Vieira et al., 2010

**Transplante de células-tronco
mesenquimais de tecido adiposo
humano em cães GRMD**

CÃES GOLDEN-RETRIEVER MUSCULAR DYSTROPHY (GRMD)



Tem uma mutação no gene da distrofina que causa ausência total da proteína

Tem um quadro geralmente muito grave. Morte perinatal é frequente

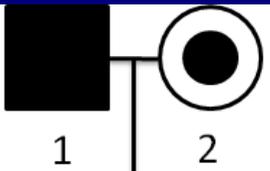
80% não vivem mais que 2 anos

Mas o quadro é muito variável

O que aconteceu com os cães injetados

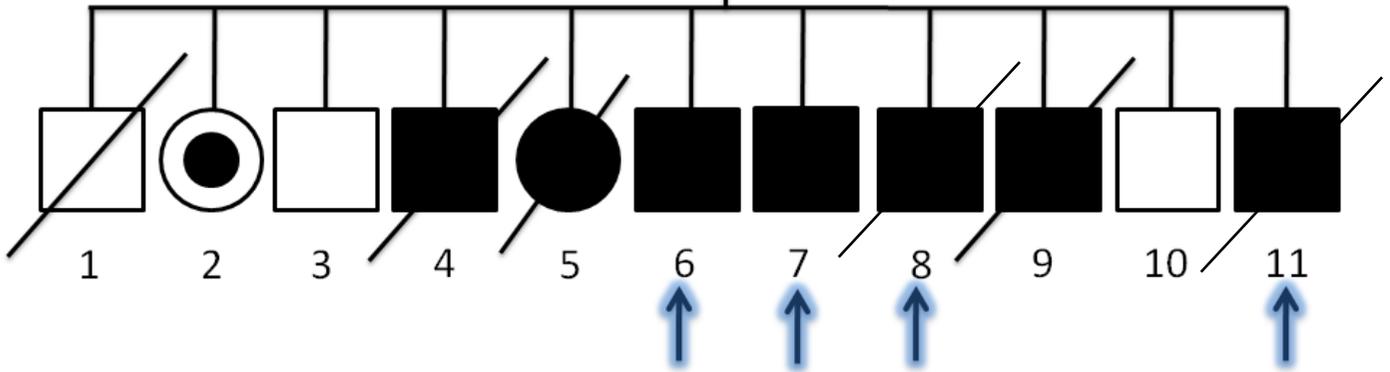
?

I



- = Affected male
- = Affected female
- ⊙ = Carrier female

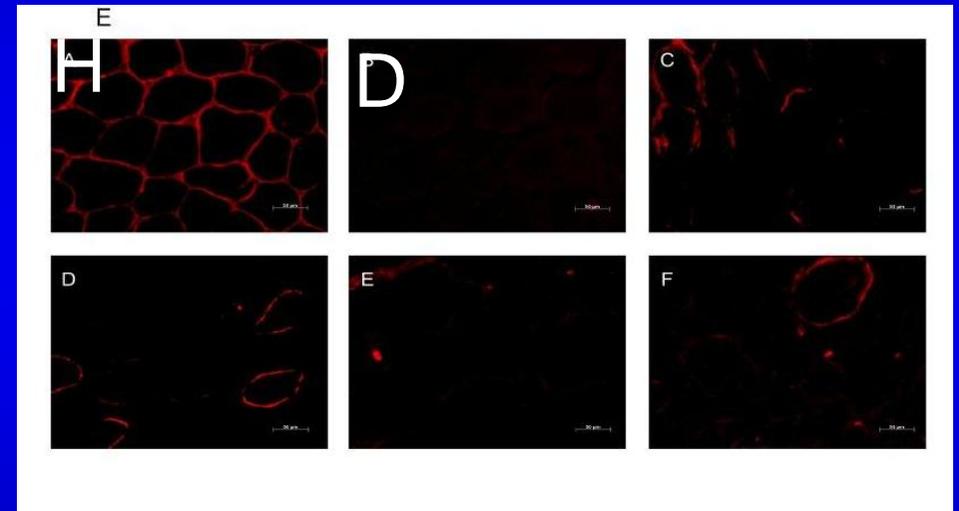
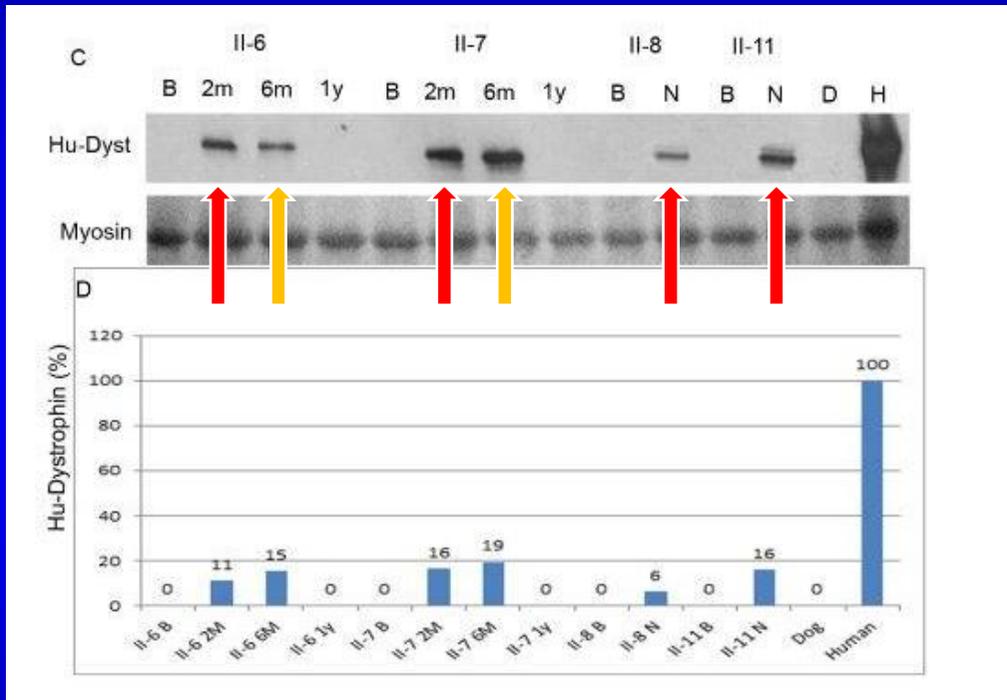
II



Injected animals

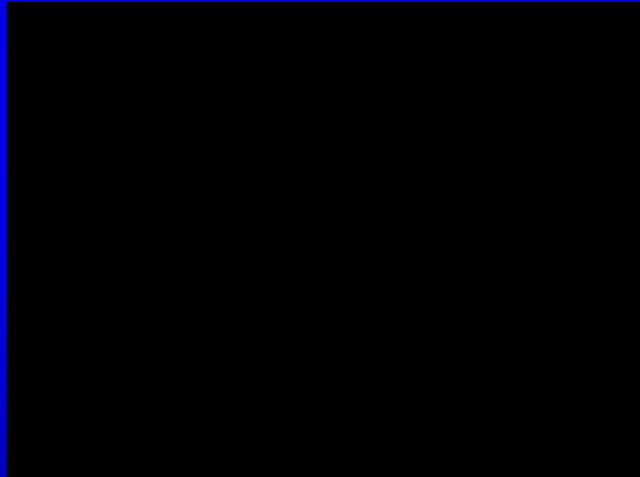


Distrofina humana

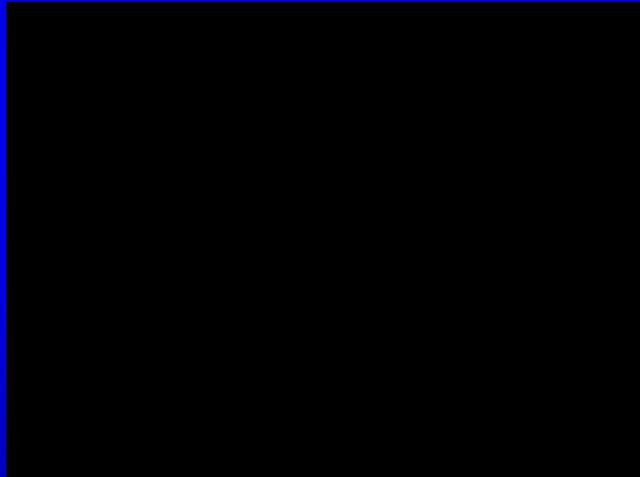


Encontrada depois de 2 e 6 meses
Mas não depois de 12 meses !!!

Dolar

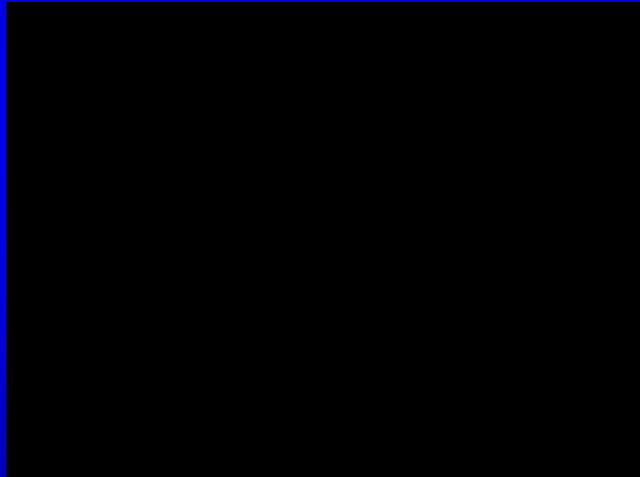


Yuan



Vieira et al. 2012

Rum



Não encontramos distrofina nas biopsias musculares

Efeito benéfico é causado pela incorporação das células injetadas ou por fatores liberados por elas?

O que são células-tronco mesenquimais?



Arnold Caplan

☞ “Células medicinais sinalizadoras”

Propriedades terapêuticas ?

CTMs atuam secretando poderosas moléculas bioativas, com duas áreas de ação:

(1) Inibição da imunovigilância

(2) Efeitos tróficos:

a) anti- apoptose e cicatrização,

b) Estímulo da angiogênese

c) Efeito mitótico nas células circundantes

O QUE APRENDEMOS ATÉ AGORA?

1. CTM de cordão umbilical humanas foram encontradas no músculo de camundongos distróficos após injeções sistêmicas e mostraram benefício clínico.
2. CTM de tecido adiposo humano injetadas sistemicamente melhoraram o fenótipo de camundongos e cães distróficos.
3. Com exceção de uma linhagem específica de CTM de tecido adiposo, não encontramos distrofina nos animais injetados
4. Quadro nos cães manteve-se estável até quase 4 anos após a última injeção

Considerações finais

É fundamental acompanhar os animais por longo tempo







Apoios

FAPESP/CEPID

CNPQ

Finep

Ministério de Ciência e Tecnologia

Ministério da Saúde

Institutos Nacionais de Ciência e Tecnologia

Associação Brasileira de distrofia muscular

Vivian e Thais

