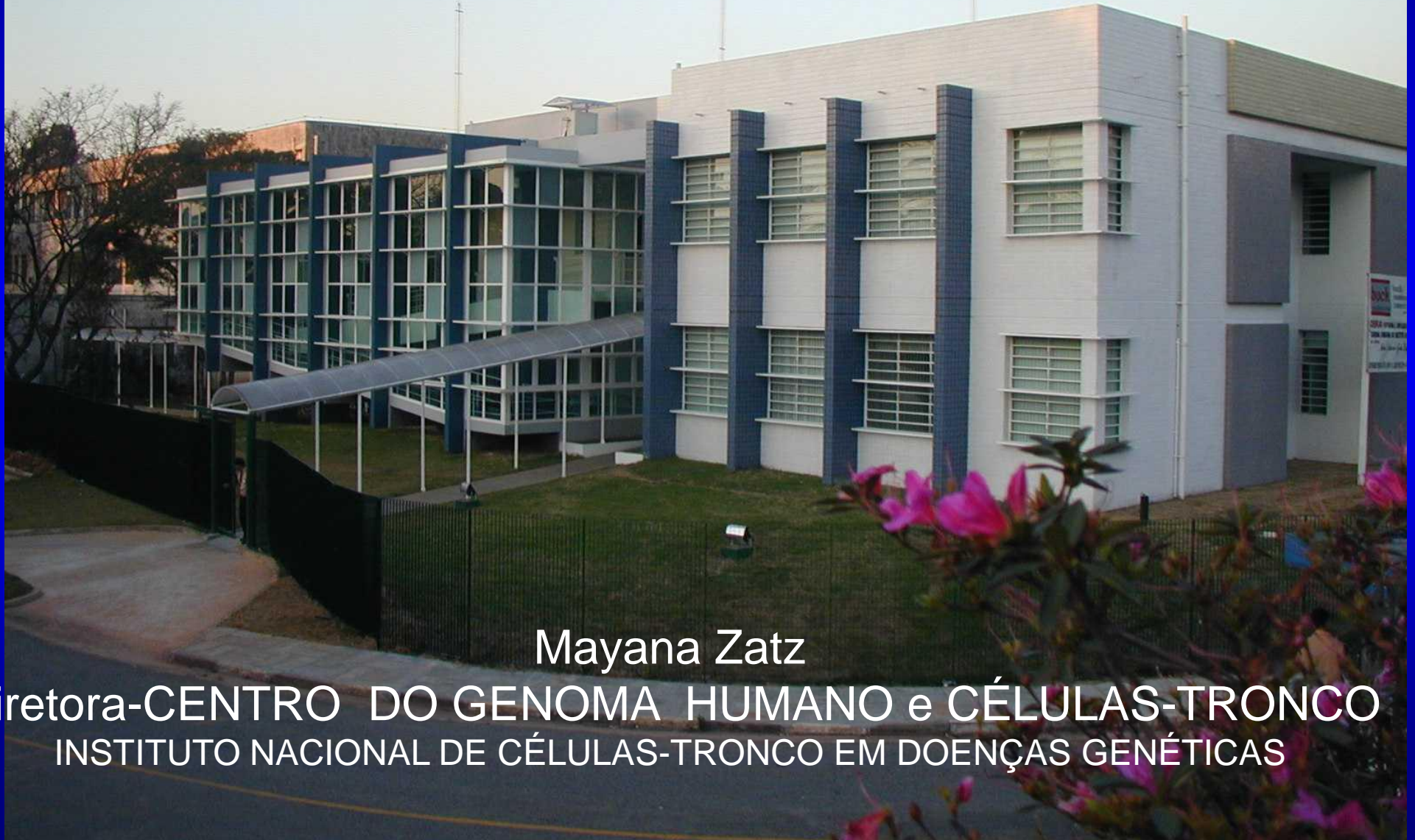


# Células-tronco e suas aplicações

## 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

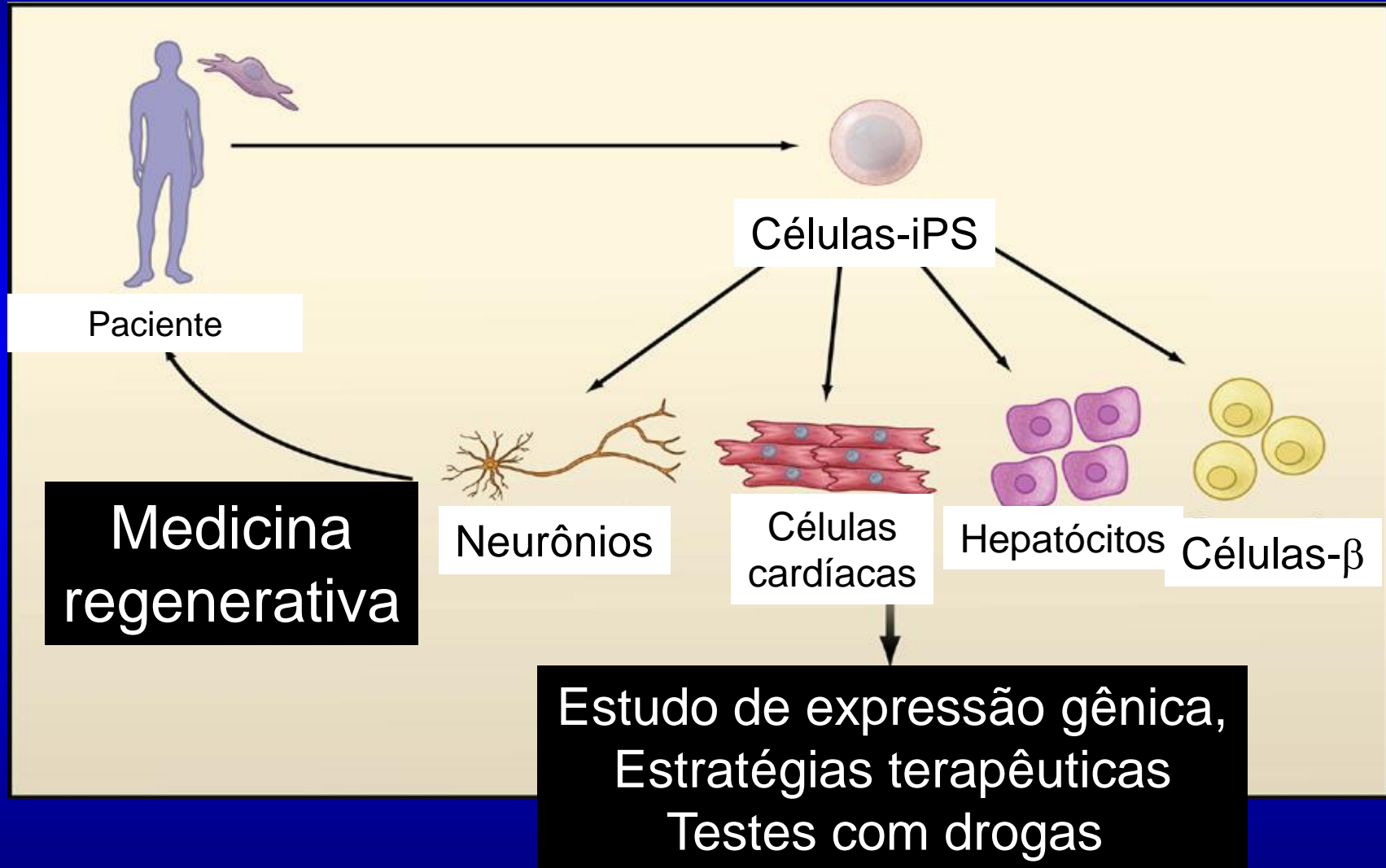
Fibroblastos



➡ 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**

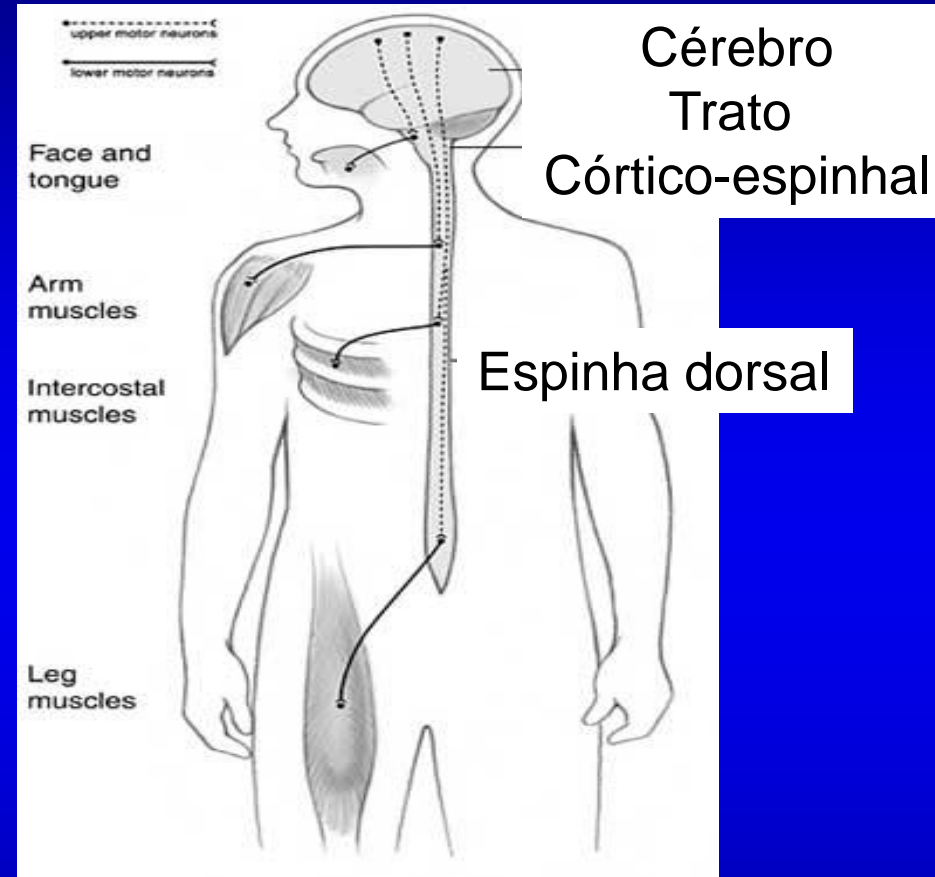
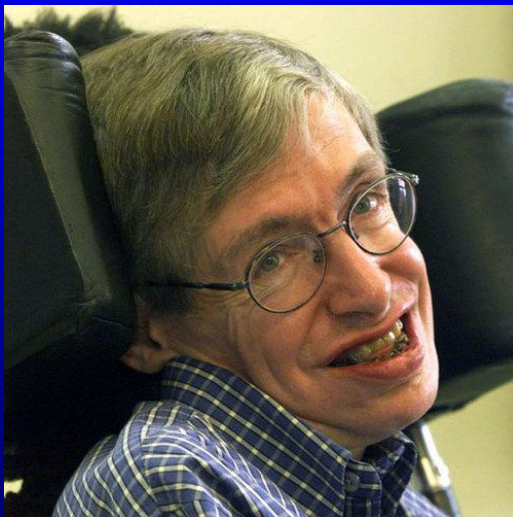
**Esclerose lateral amiotrófica (ELA)**



# Esclerose Lateral amiotrófica- ELA

Doença rapidamente progressiva

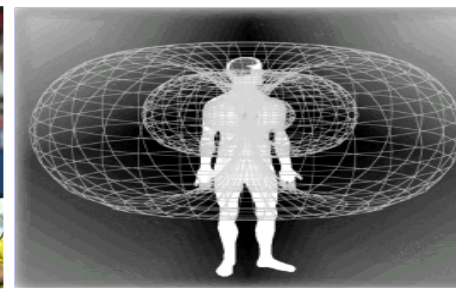
- Morte Seletiva dos Neurônios Motores
  - Heterogeneidade clínica
  - Cognição é mantida



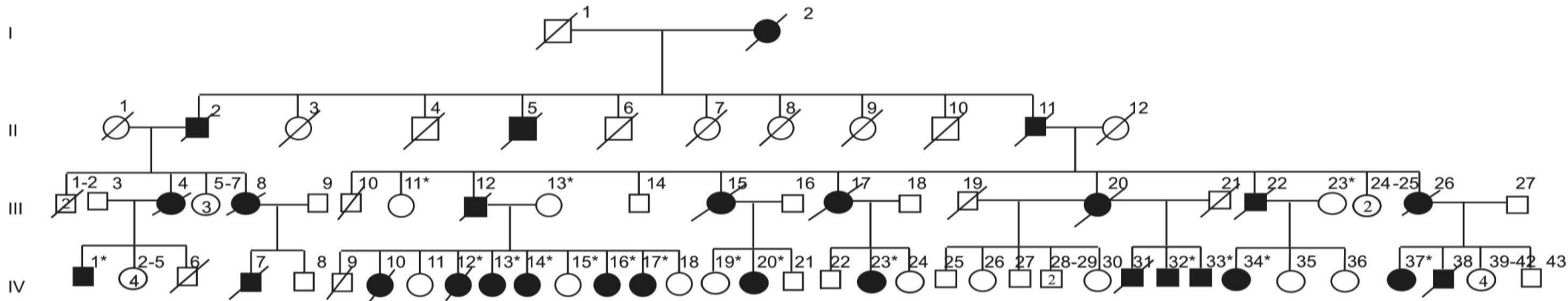
EUA: ~30.000 casos  
Brasil : ?????

# 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

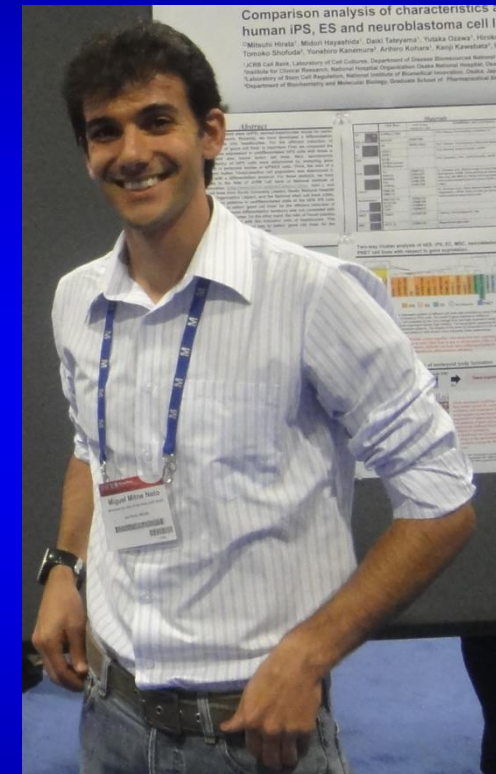
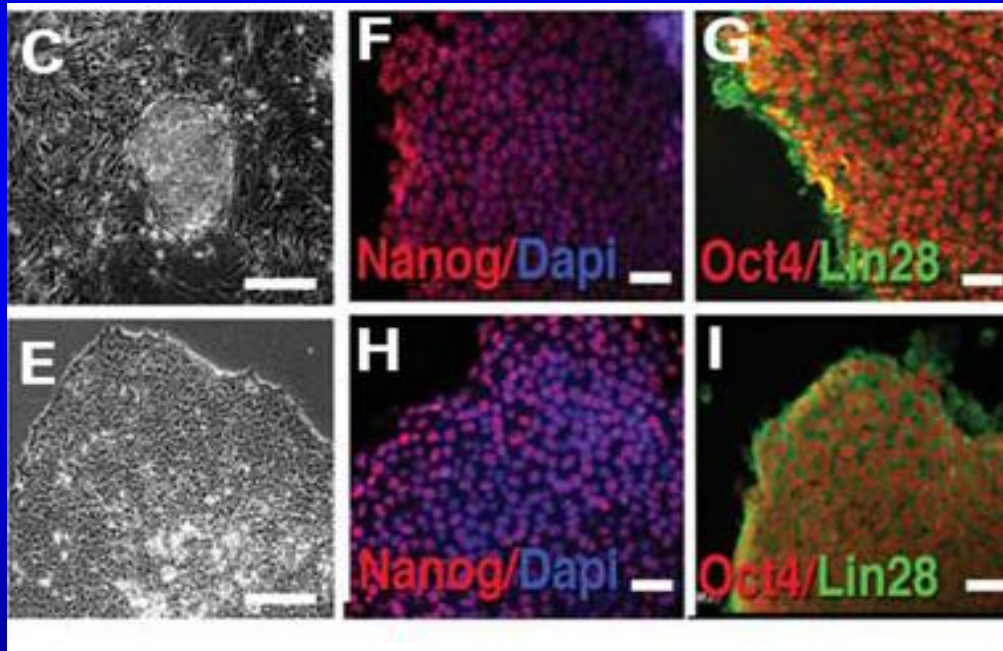
AUDITORIO  
PROFESOR BENITO RAYLE





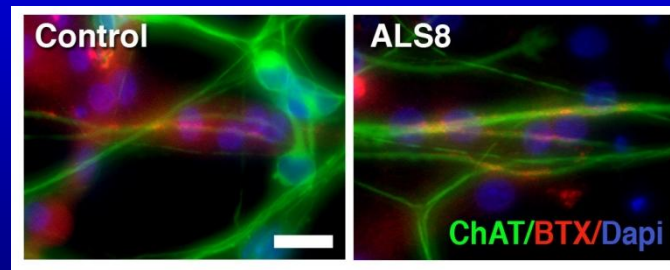
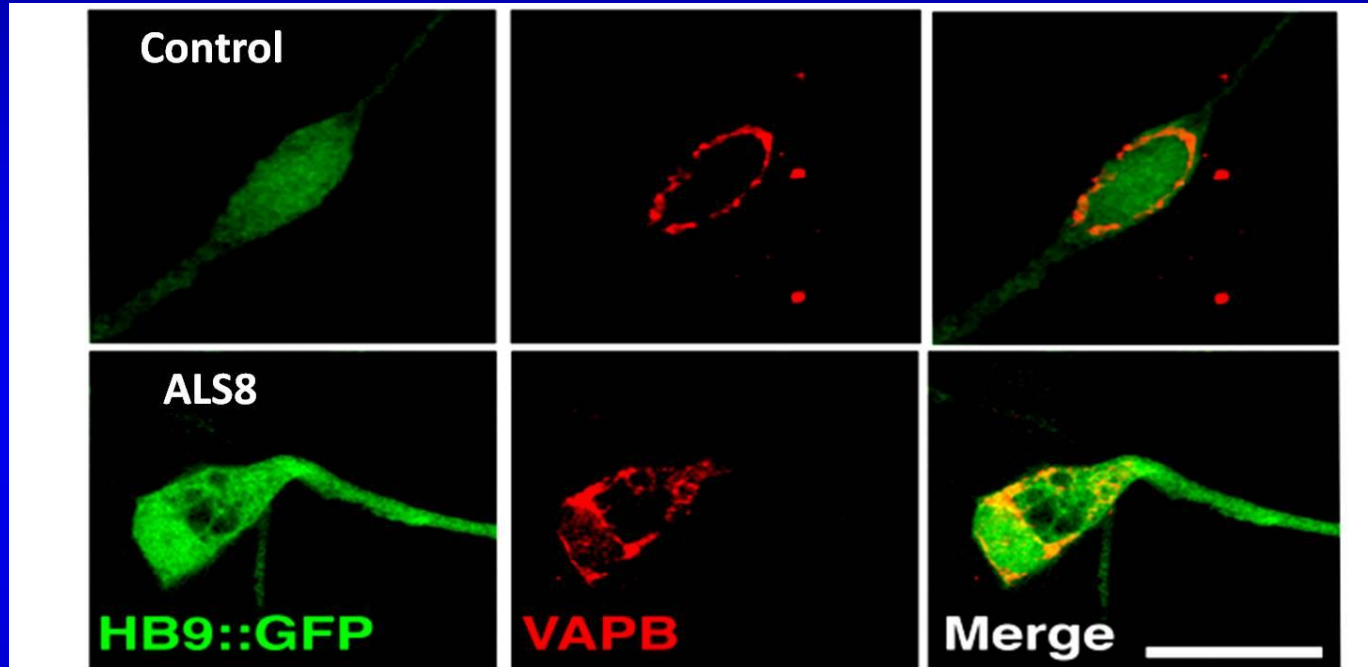
# Foram geradas células iPSc e neurônios motores

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



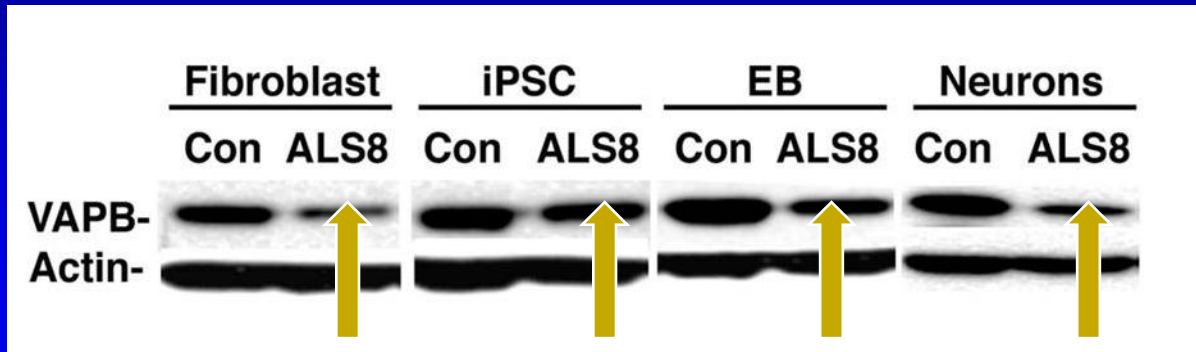
Miguel Mitne-Neto  
Colab. Alysson Muotri

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

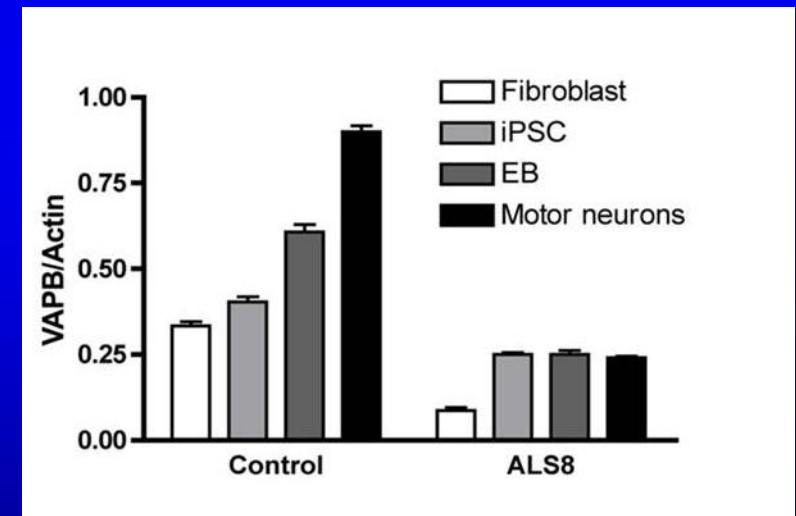


Neuromuscular junction

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



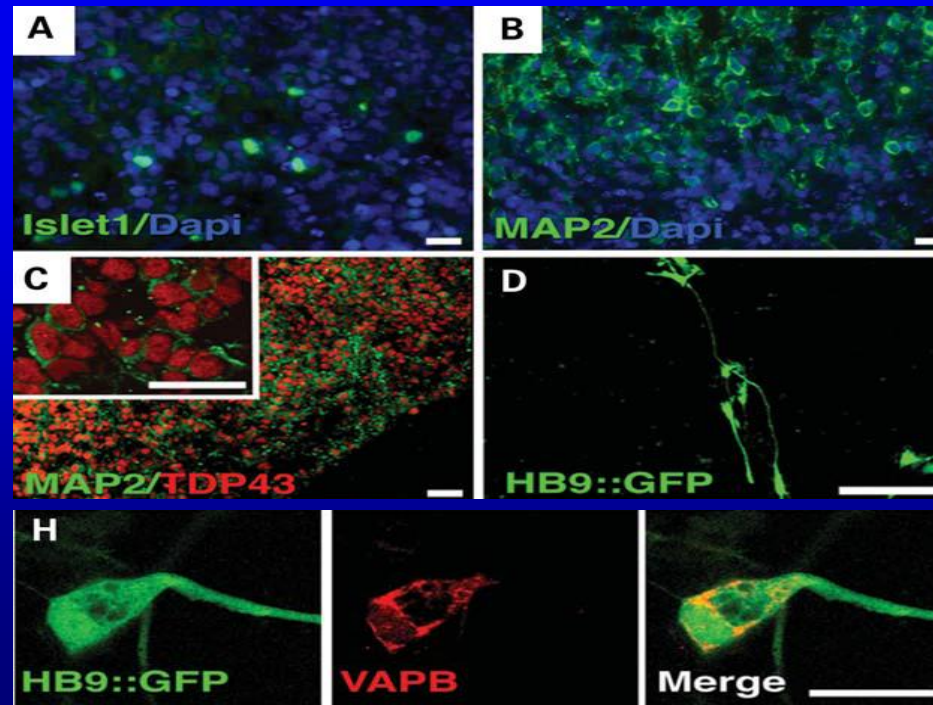
Perda de função?



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?

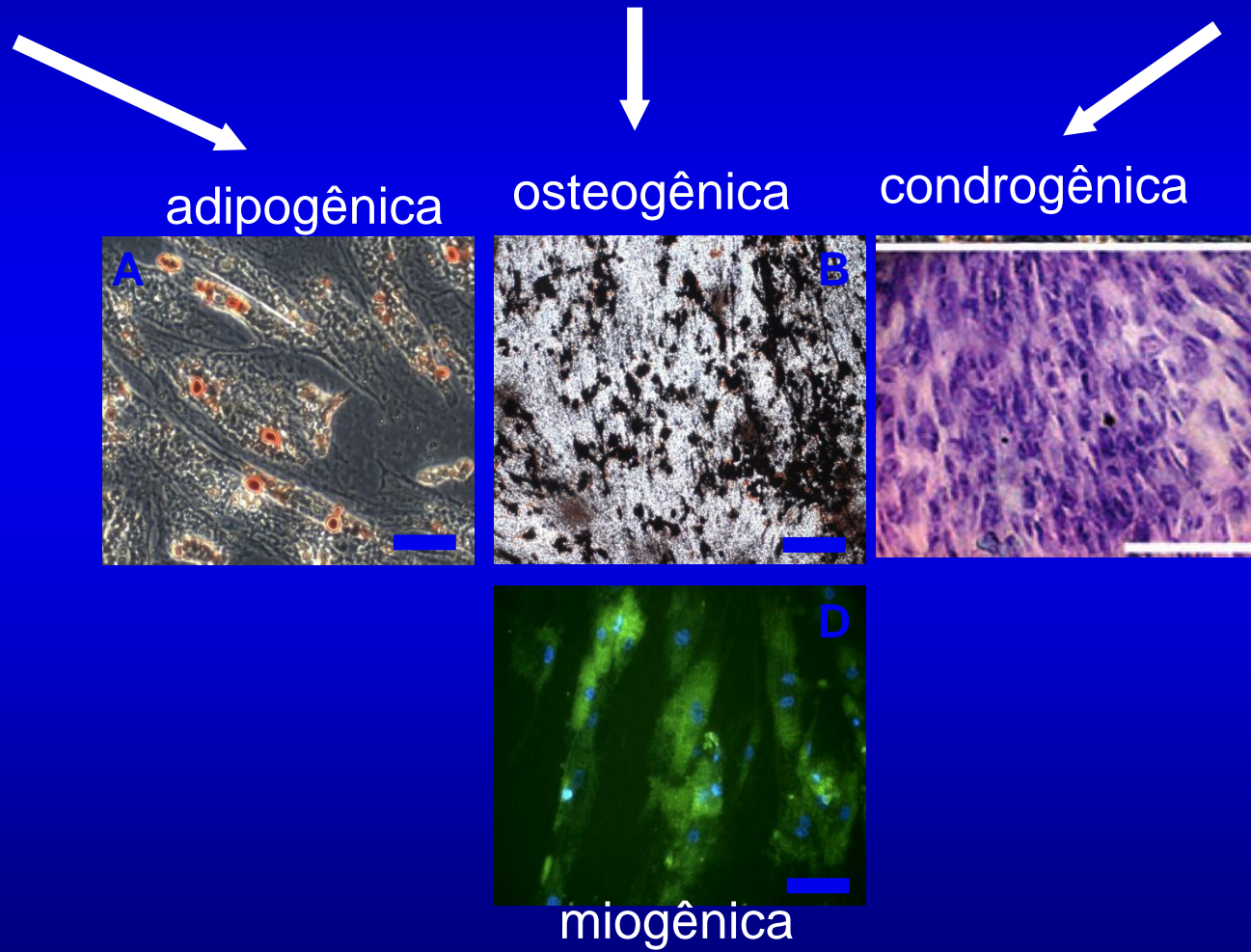
# CÉLULAS-TRONCO PARA TERAPIA CELULAR

Um sub-grupo de células-tronco  
adultas muito especiais

# Células-tronco mesenquimais (MSCs)



Potencial para se diferenciar em linhagens

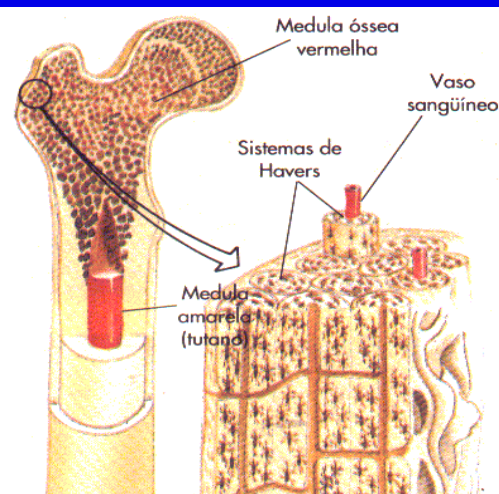


# Células-tronco adultas:(multipotentes /oligopotentes)

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

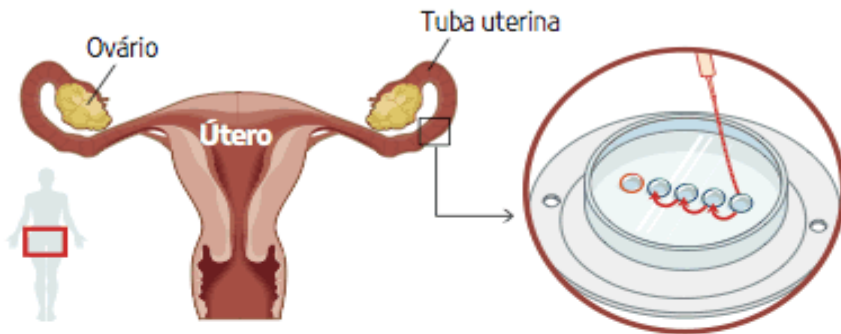
Mais uma fonte de células-tronco mesenquimais



Tatiana Jazedje

## CÉLULAS-MÃE

Tuba uterina é nova fonte de células-tronco adultas



### 1 Acaso

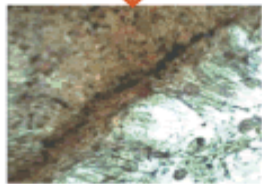
Os cientistas examinaram tecidos extraídos de pacientes que haviam sido submetidas a laqueadura ou a retirada do útero

### 2 Descoberta

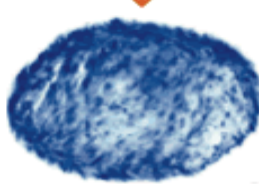
Dessas amostras eles isolaram uma população de células aparentemente capazes de se diferenciar em vários tipos de tecido

### 3 Comprovação

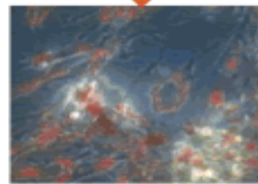
O grupo tratou de "convencer" quimicamente as células a se diferenciarem. Deu certo, e eles conseguiram produzir:



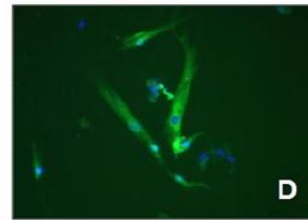
Células ósseas



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 Jazedje<sup>1</sup>, Paulo M Perin<sup>2</sup>, Carlos E Czeresnia<sup>3</sup>, Mariangela Maluf<sup>2</sup>, Silvio Halpern<sup>2</sup>, Mariane Secco<sup>1</sup>, Daniela F Bueno<sup>1</sup>, Natassia M Vieira<sup>1</sup>, Eder Zucconi<sup>1</sup> and Mayana Zatz\*<sup>1</sup>

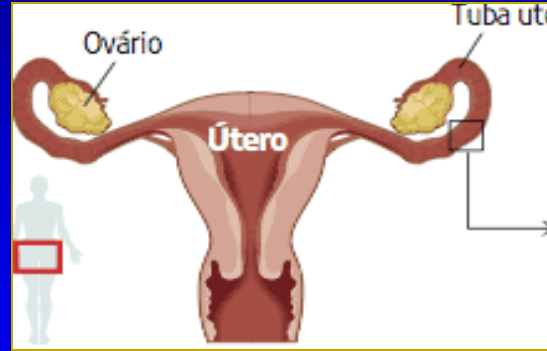
**Open Access**



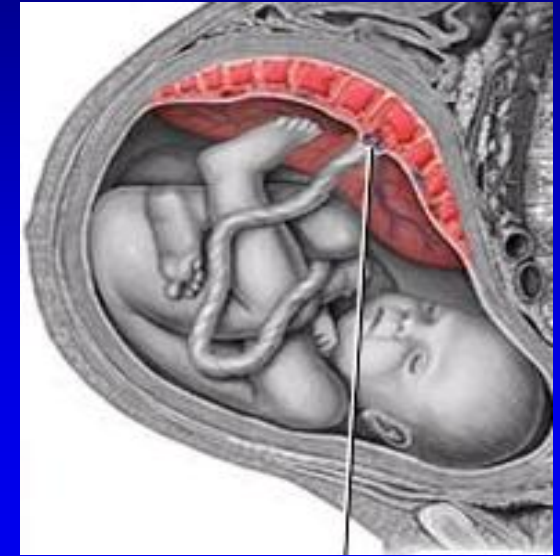
# Fontes de células-tronco mesenquimais adultas



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

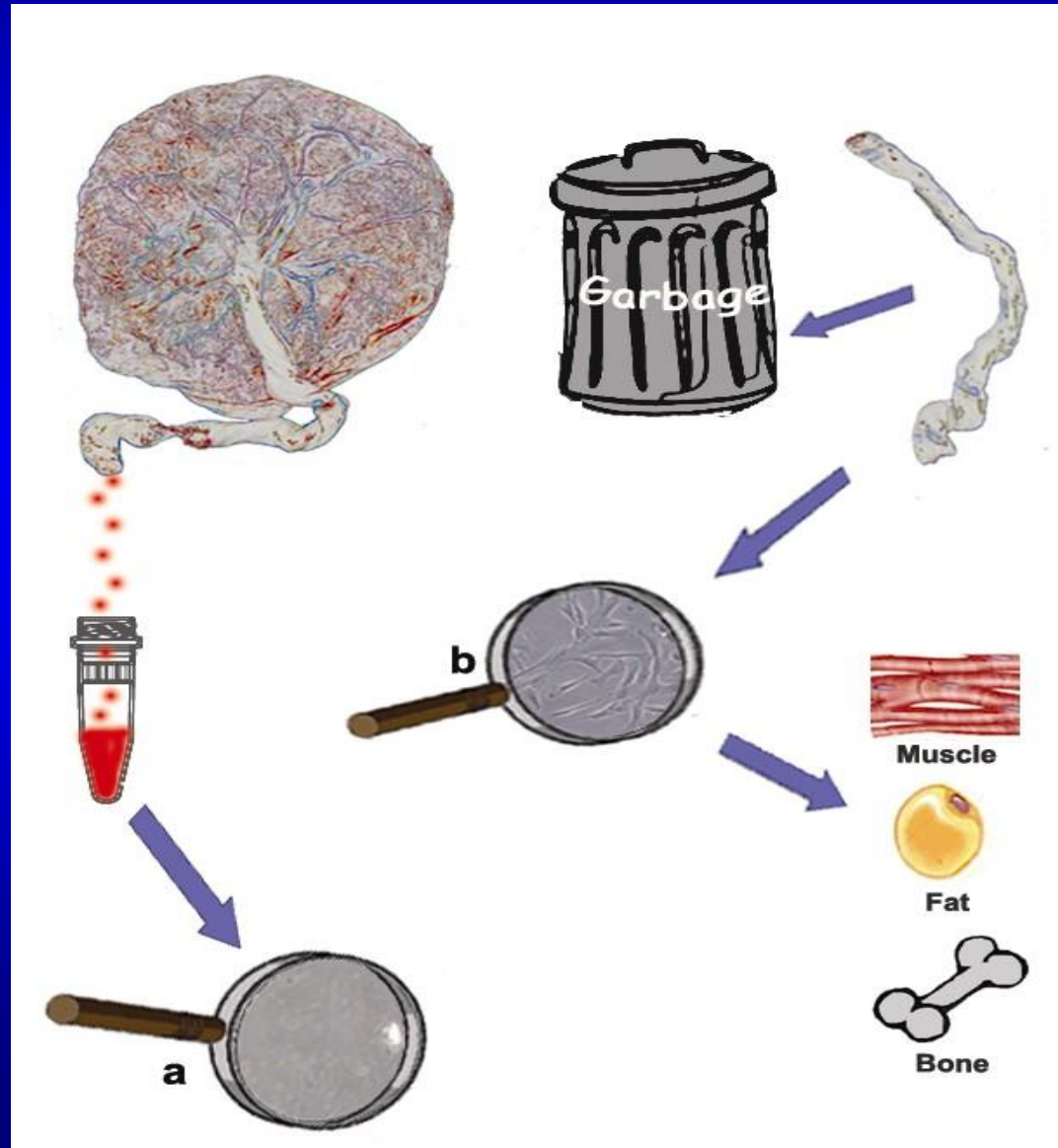


Mariane



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?

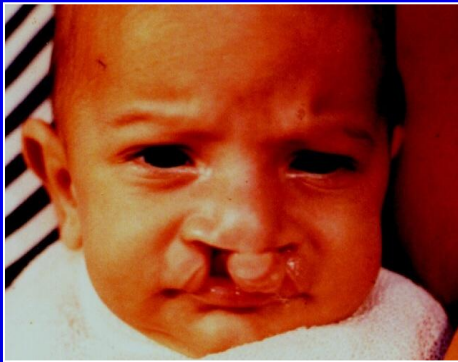
## Laboratório de Desenvolvimento Craniofacial



Maria Rita Passos Bueno, BSc, PhD  
Lab coordinator



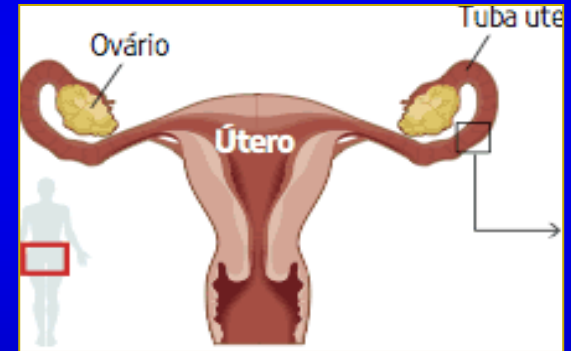
# Comparação entre diferentes células-tronco



Musculo orbicular  
Pálato e fenda palatina



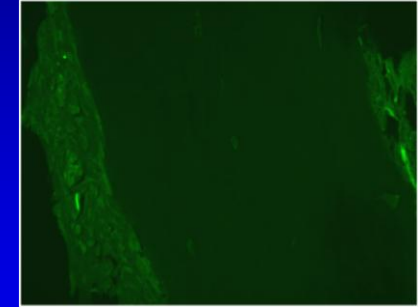
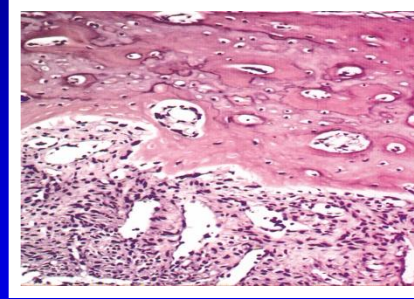
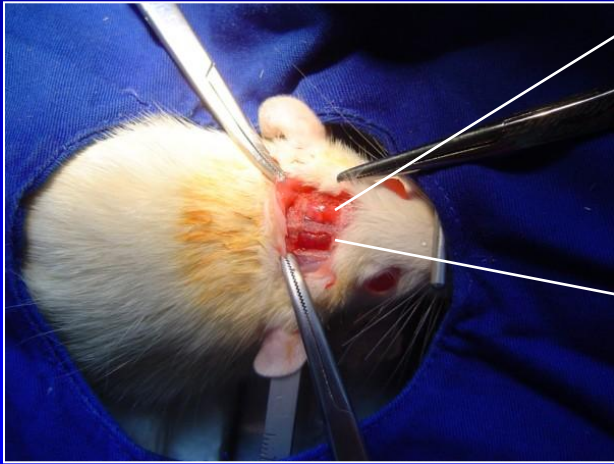
Polpa dentária



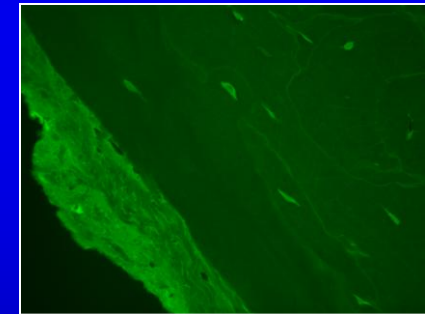
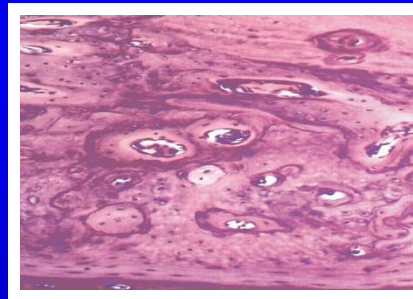
Trompas

# 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

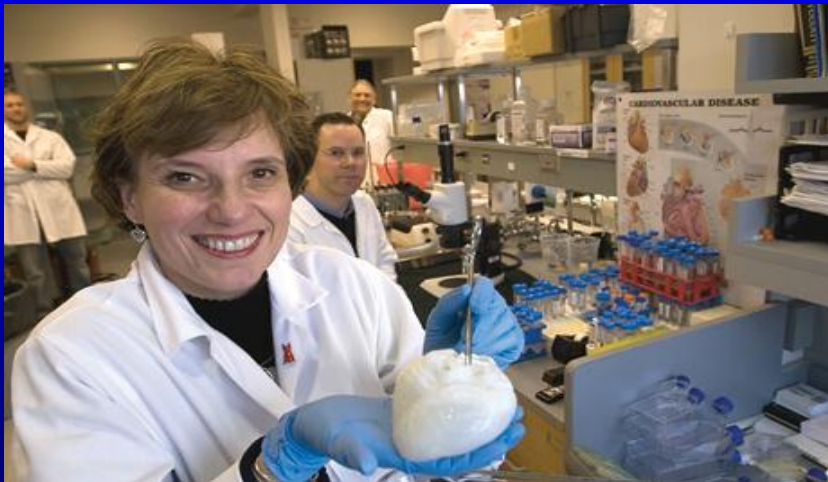
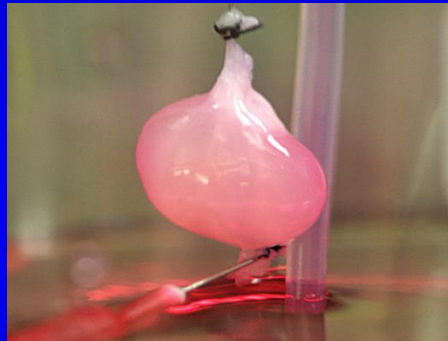
Um futuro promissor



# 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

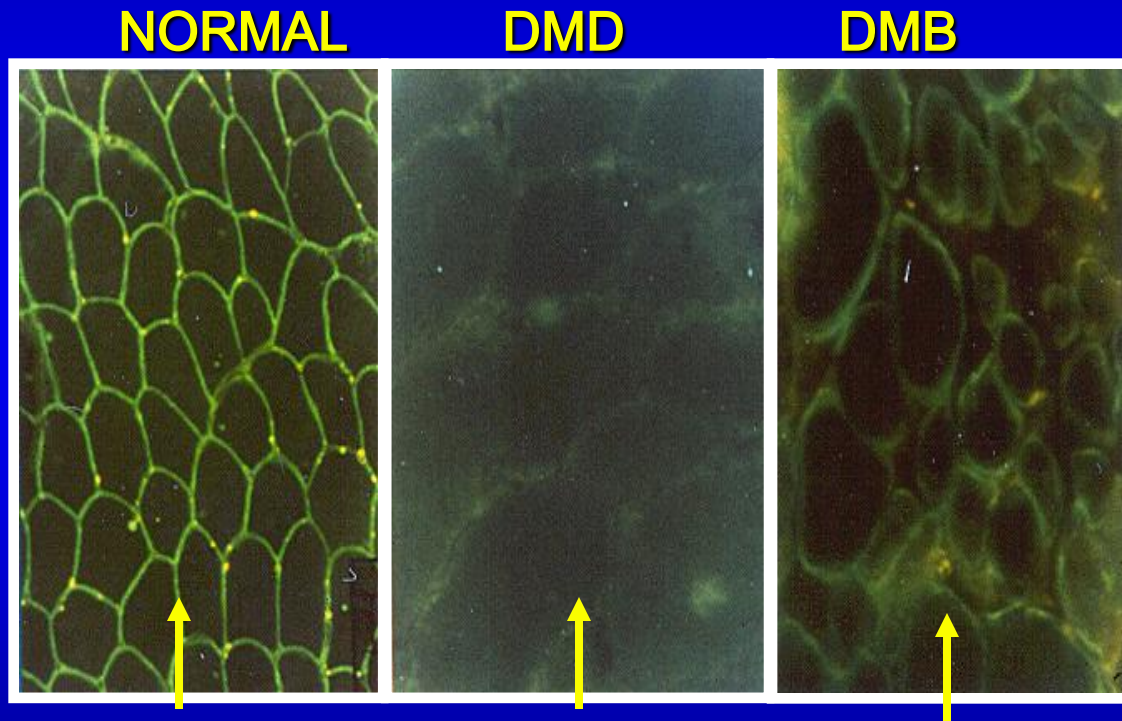
PROGNÓSTICO

MUITO VARIÁVEL!

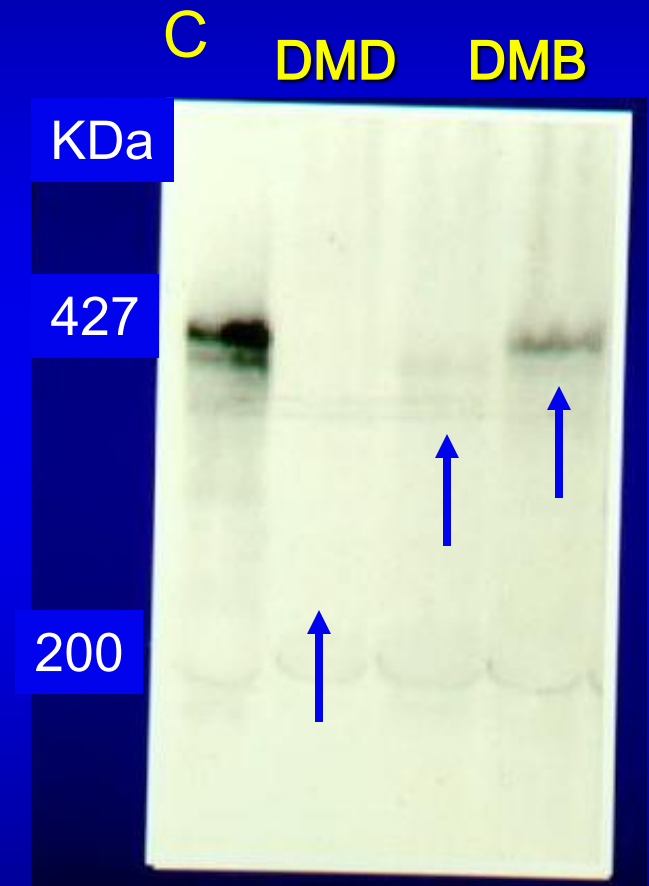


# DISTROFINA NO MÚSCULO NA DMD E DMB

IMMUNOFLUORESCENCIA



WESTERN BLOT



CORRELAÇÃO ENTRE QUANTIDADE DE DISTROFINA E GRAVIDADE DO FENÓTIPO

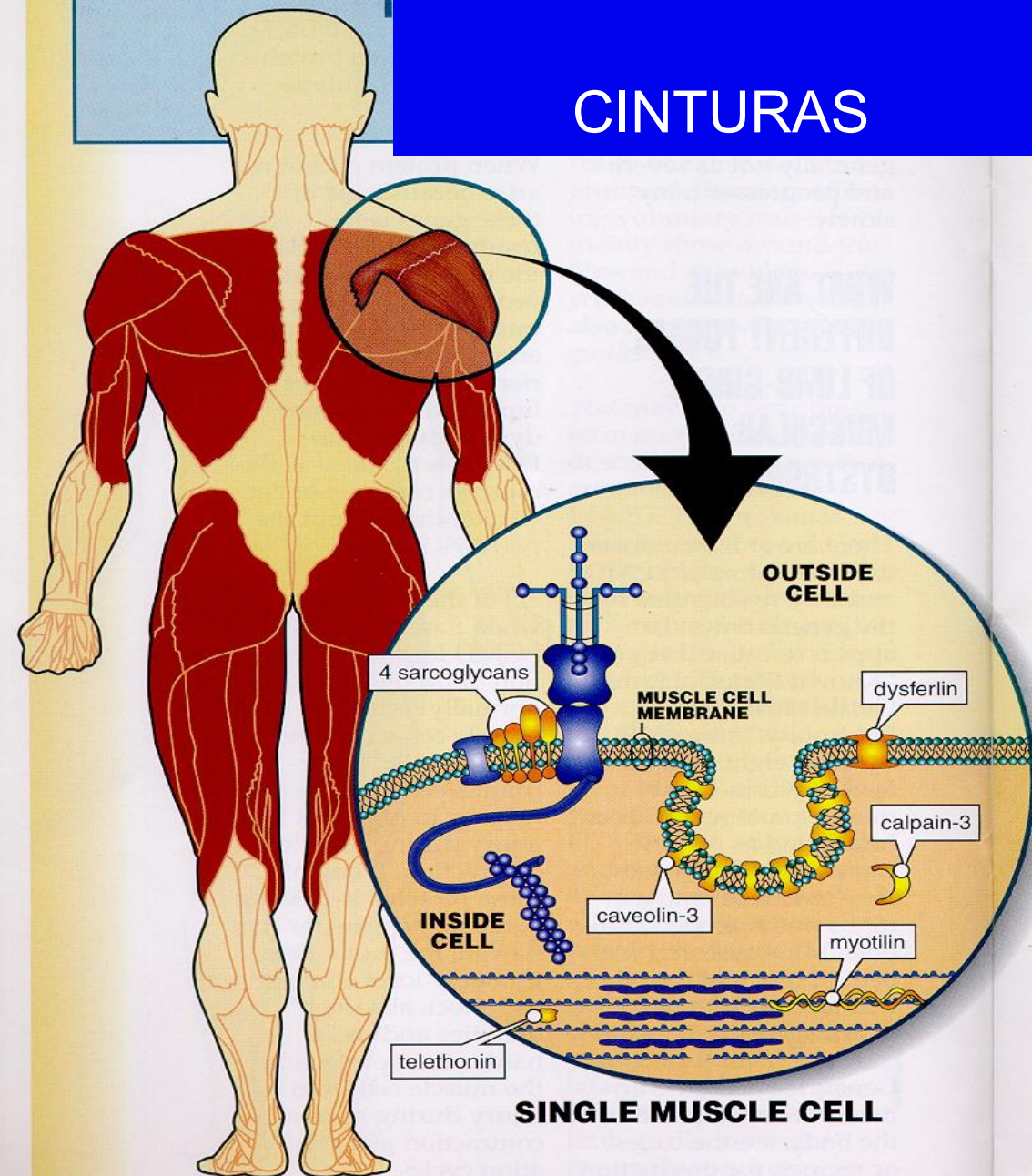


# DISTROFIAS TIPO

## CINTURAS

Atingem os dois  
sexos

Já foram identificados  
mais de **22** genes



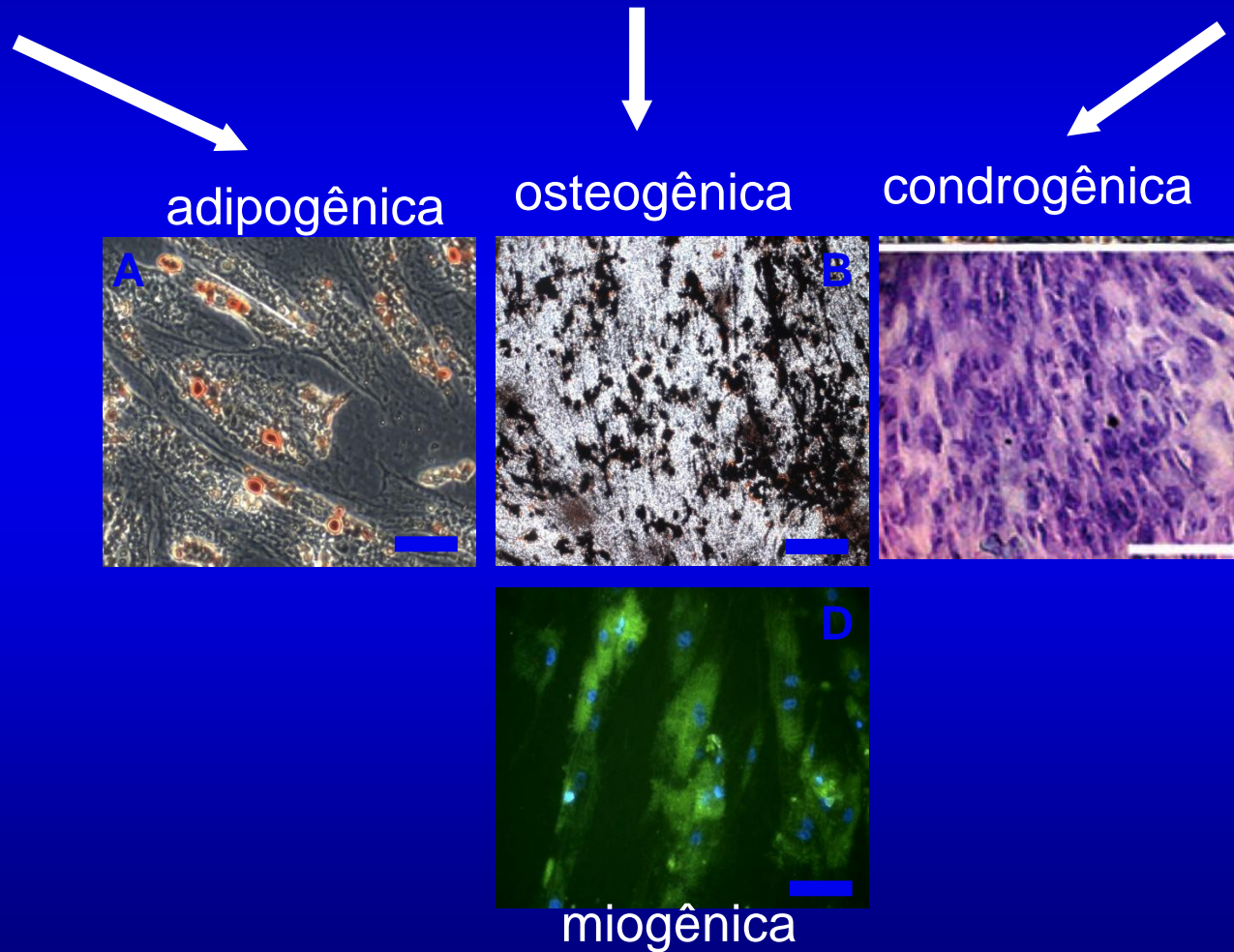
O grande desafio

**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

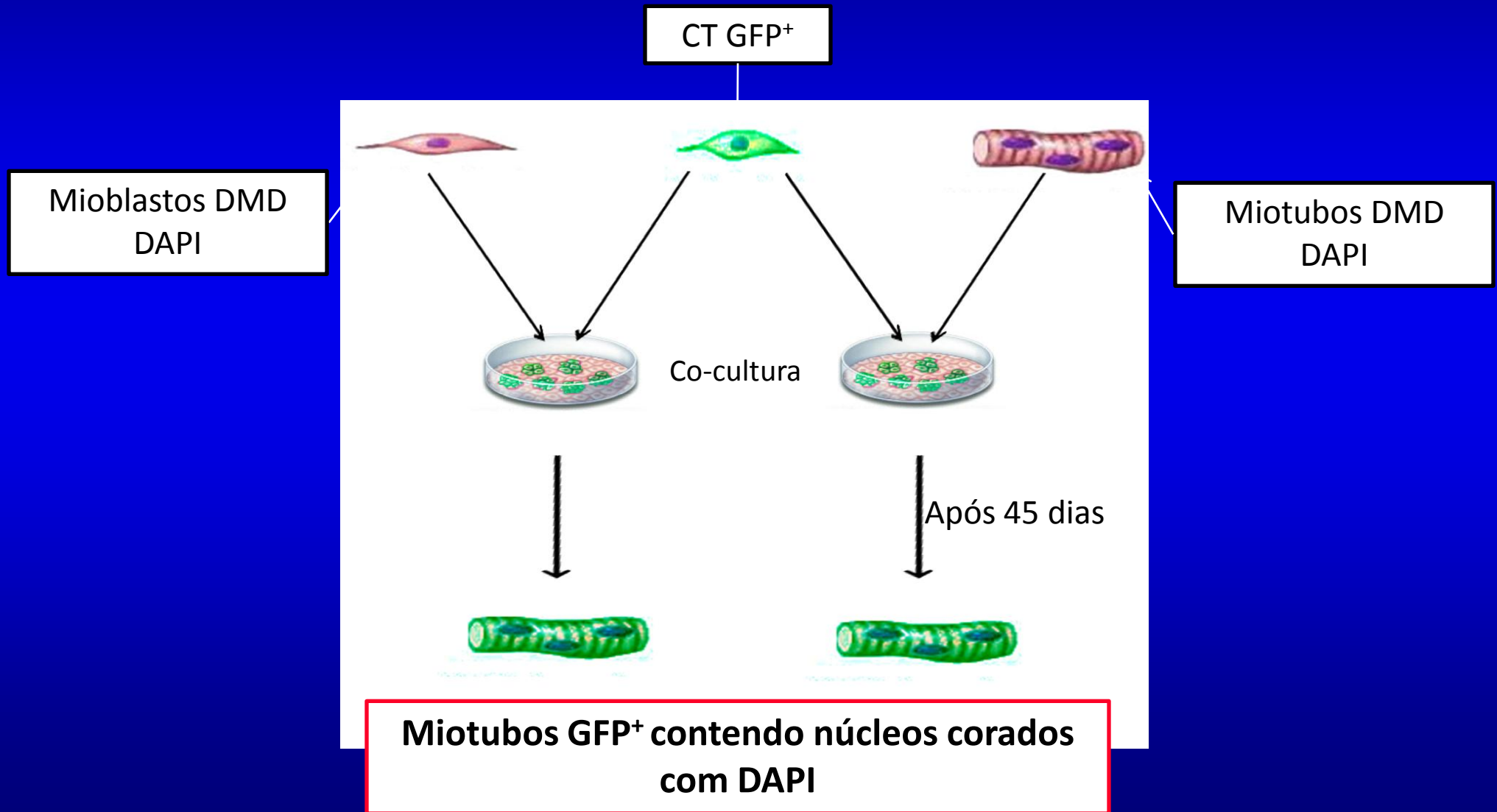
# CT de lipoaspiração



Natassia  
Vieira

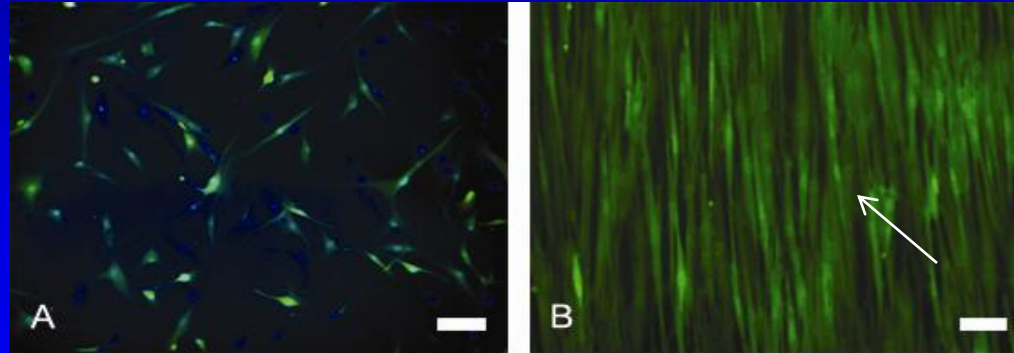


# Células-tronco de tecido adiposo são capazes de restaurar a expressão de distrofina *in vitro* ?



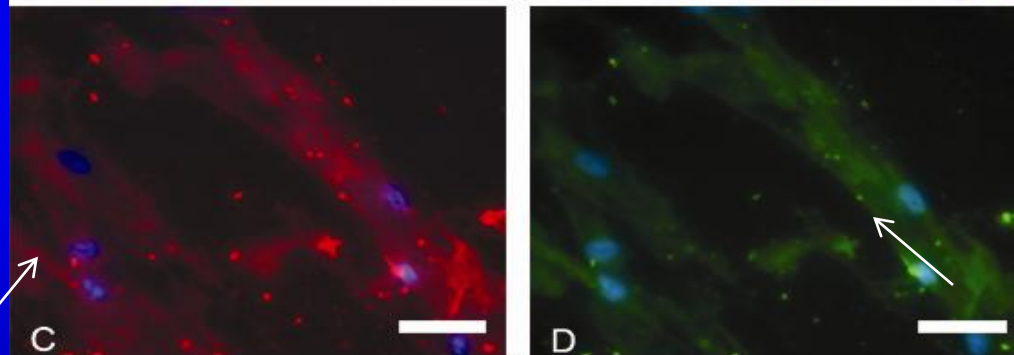
# Co-cultivo CT e mioblastos DMD

Dia 1

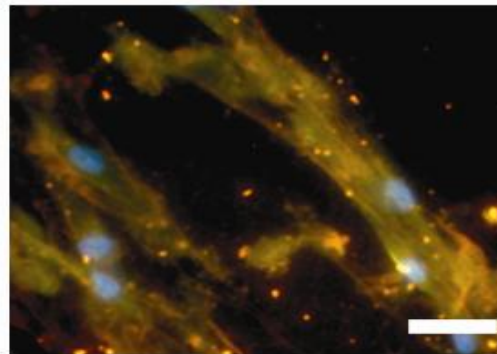


Dia 15: Miotubos  
GFP<sup>+</sup>

Dia 45:  
Miotubos  
distrofina<sup>+</sup> com  
núcleos DAPI<sup>+</sup>



Dia 45: Miotubos  
GFP<sup>+</sup> com núcleos  
DAPI<sup>+</sup>





# A continuação do caminho




Experimentos “in vivo”



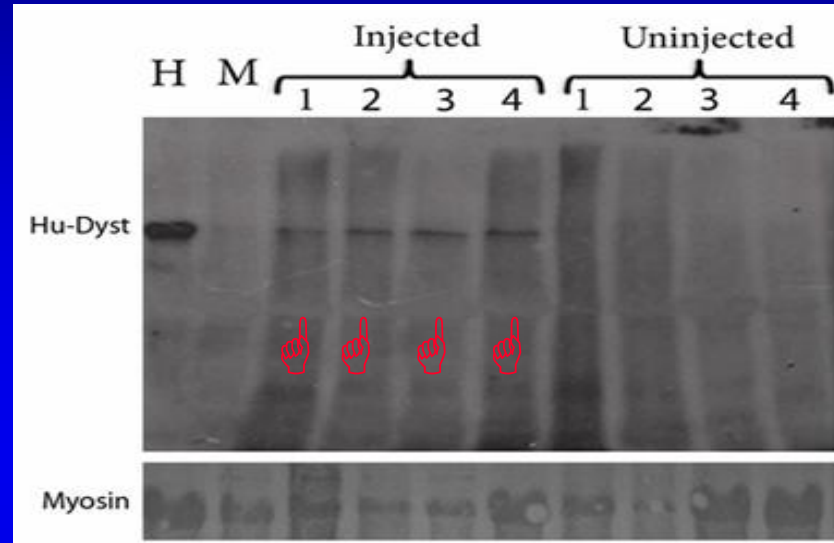
Células-tronco mesenquimais de tecido adiposo humano são capazes de expressar proteínas musculares humanas “in vivo”?



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

9 meses depois.....

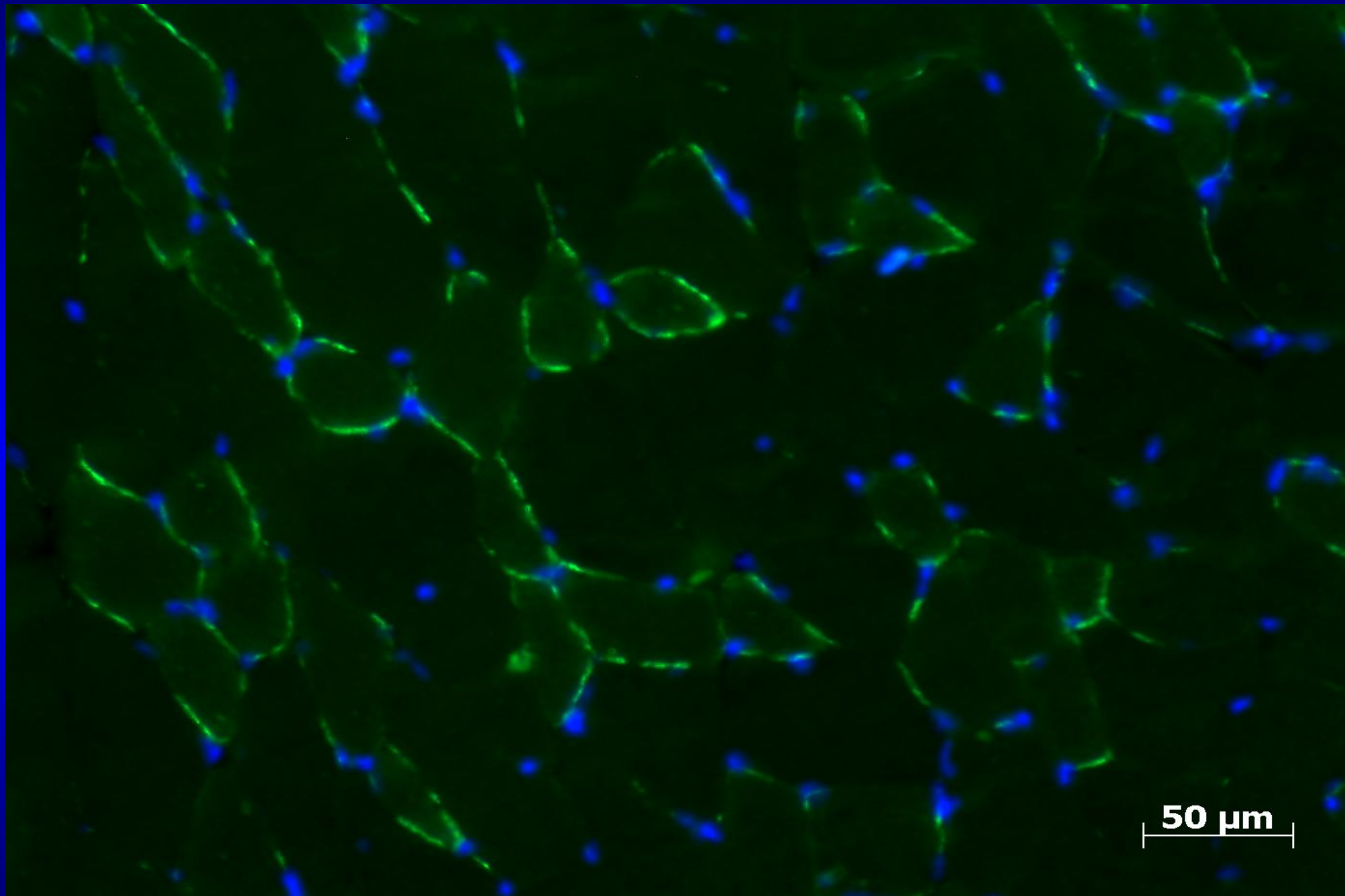
# WB: presença de distrofina humana



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

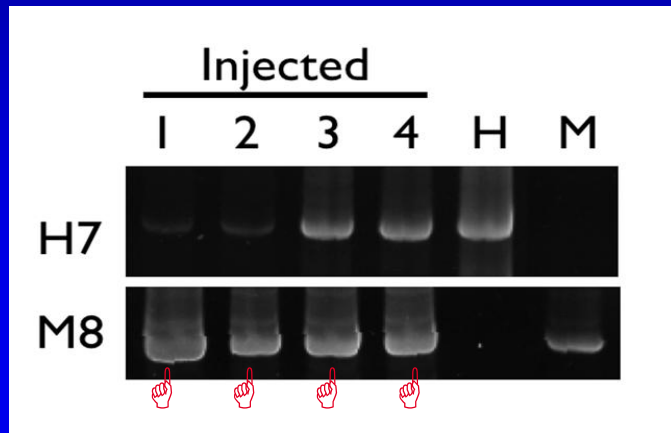


Modelo de distrofia  
Tipo cinturas

# EXPERIMENTO SEMELHANTE COM CAMUNDONGOS SJL

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

# PRESENÇA DE DNA HUMANO



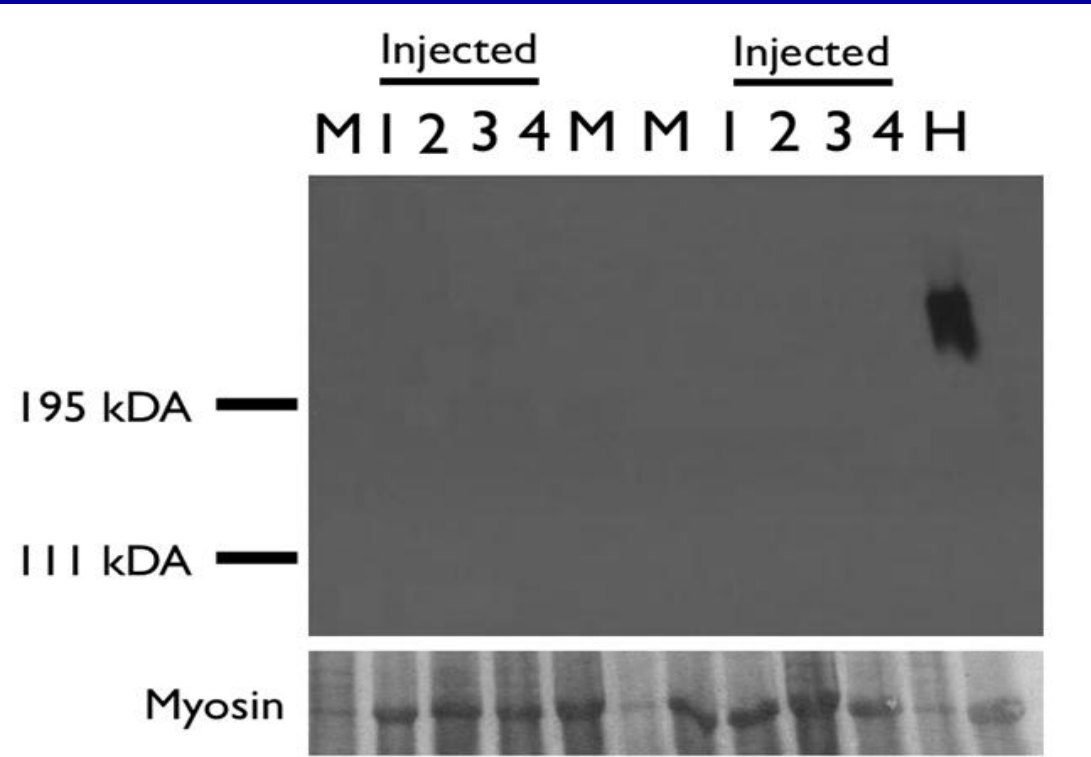
1. Músculo anterior distal
  2. Músculo anterior proximal
  3. Músculo posterior distal
  4. Músculo posterior proximal
- H. DNA humano  
M. DNA murino

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

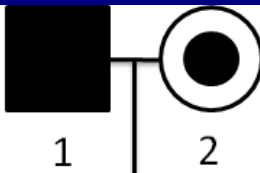
Mas o quadro é muito variável

O que aconteceu com os cães injetados

?

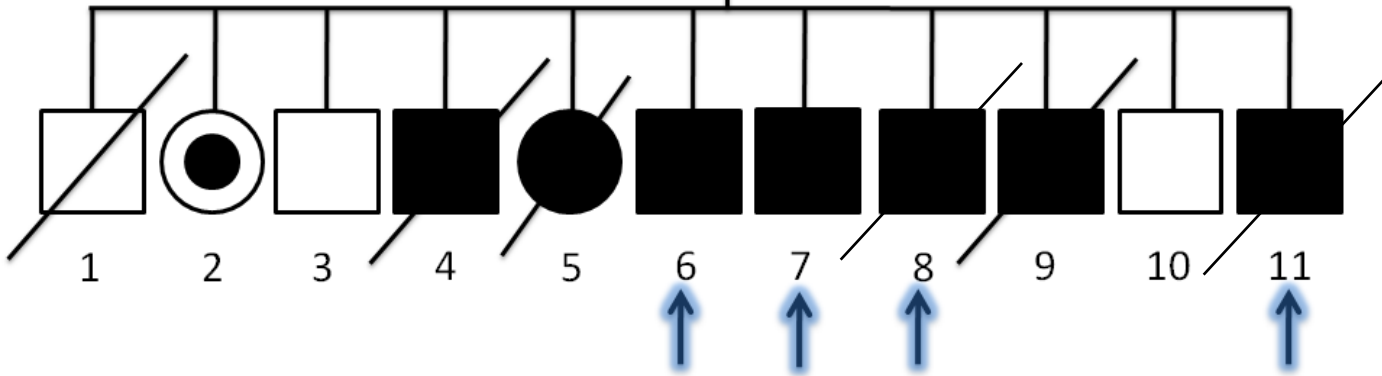


I



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

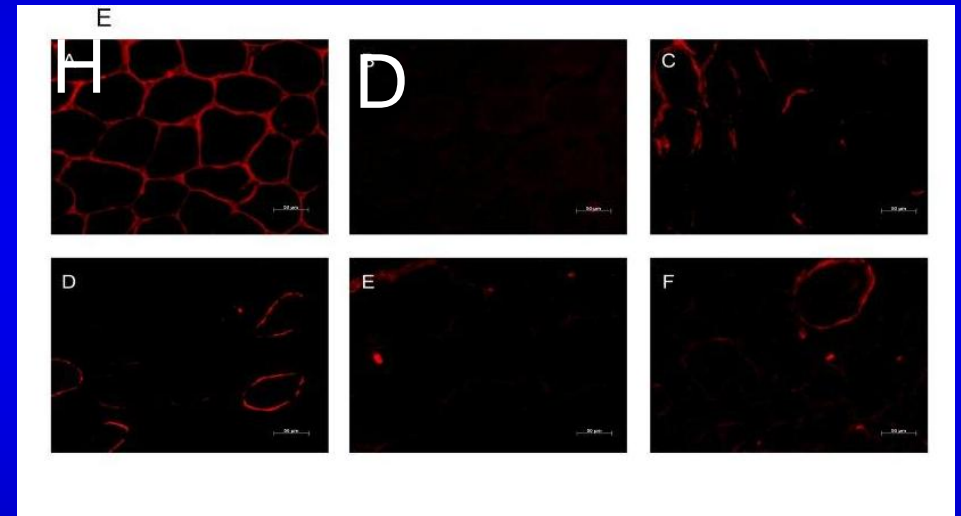
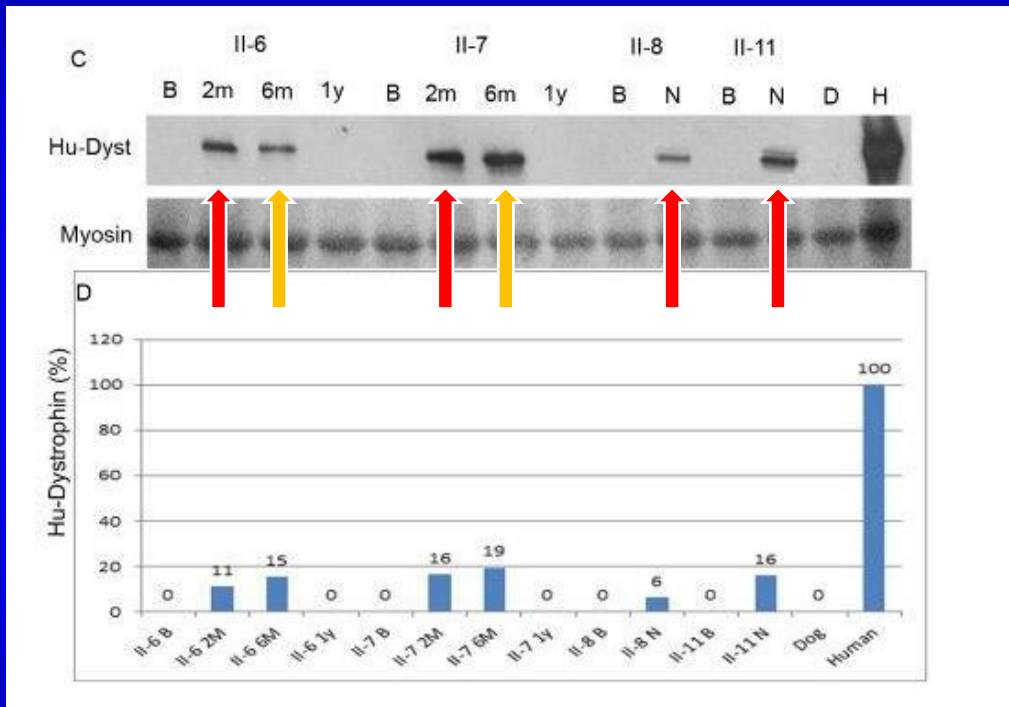
II



Injected animals

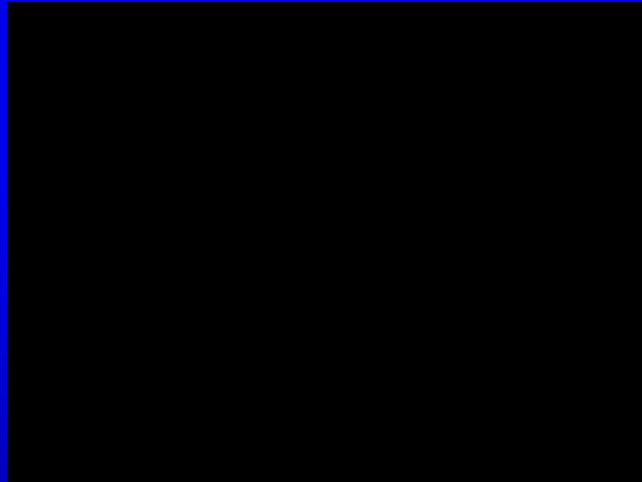


# Distrofina humana

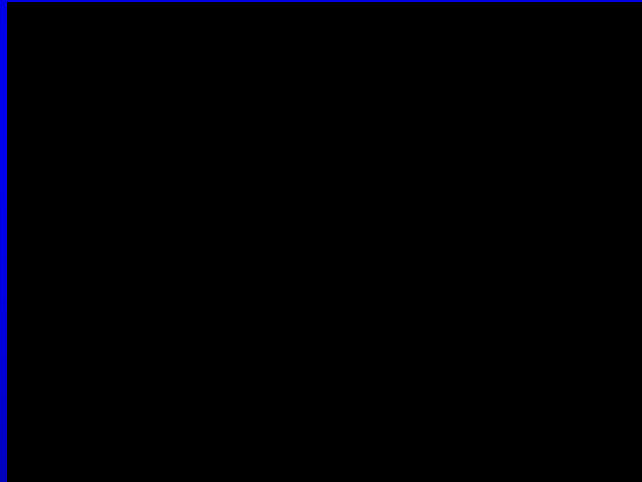


Encontrada depois de 2 e 6 meses  
Mas não depois de 12 meses !!!

Dolar

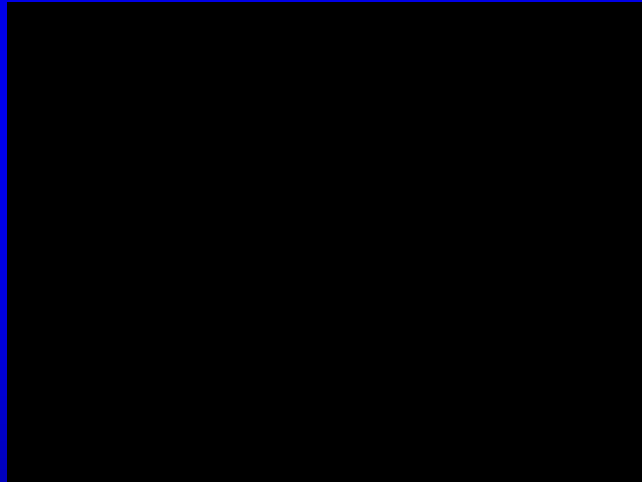


Yuan



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

