

Novas Tecnologias na Genética Humana:

Avanços e Impactos para a Saúde

Maria Celeste Emerick
Karla Bernardo Mattoso Montenegro
Wim Degrave

2007

Todos os direitos reservados. É permitida a reprodução parcial desta obra desde que citada a fonte e que não seja para venda ou qualquer fim comercial.
Tiragem 1ª edição: 2.100 exemplares

Distribuição e informações:

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ - FIOCRUZ

Projeto Ghente/GESTEC-NIT/Vice-Presidência de Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico

Av. Brasil, 4365 – Castelo Mourisco – Salas. 01,03 e 06 – Manguinhos

Rio de Janeiro – RJ – CEP: 21040-360 – Tel: (21) 38851721/1731/163-3

Email: ghente@ghente.org - Home page: <http://www.ghente.org>

Administrador e Webmaster Projeto Ghente – Leonardo Silva Leite

Novas Tecnologias na Genética Humana: Avanços e Impactos para a Saúde

Organização: Maria Celeste Emerick, Karla Bernardo Mattoso Montenegro e Wim Degraeve

Edição: Karla Bernardo Mattoso Montenegro

Colaboração: Leonardo Silva Leite e Marcos Lins Langenbach

Projeto Gráfico: Capa: Adriana Montenegro. Desenho e pintura, com apropriação de “O homem vitruviano”, Leonardo da Vinci.

Diagramação: Antonielle Nunes e Impressão: Edil Artes Gráficas

Seminário: Células-Tronco: Possibilidades, riscos e limites no campo das terapias no Brasil (Maio de 2006)

Realização: Projeto Ghente/GESTEC-NIT/FIOCRUZ

Apoio: DECIT e CESUPA

Comissão Organizadora: Eliane Moreira (CESUPA), Karla Bernardo M. Montenegro (FIOCRUZ), Leonardo Leite (FIOCRUZ), Marlene Braz (IFF), Maria Celeste Emerick (FIOCRUZ), Maria Helena Lino (FIOCRUZ), Wim Degraeve (FIOCRUZ)

Seminário: Novas Tecnologias da Genética Humana: Avanços e Impactos para Saúde (Março de 2007)

Realização: Projeto Ghente/GESTEC-NIT/FIOCRUZ

Apoio: DECIT e OPAS

Comissão Organizadora: Karla Bernardo M. Montenegro (FIOCRUZ), Leonardo Leite (FIOCRUZ), Maria Celeste Emerick (FIOCRUZ), Silvio Valle (FIOCRUZ), Wim Degraeve (FIOCRUZ)

**Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Biomédicas / ICICT / FIOCRUZ - RJ**

N936 Novas tecnologias na genética humana : avanços e impactos para a saúde / organizadores Maria Celeste Emerick, Karla Bernardo Mattoso Montenegro [e] Wim Degraeve. – Rio de Janeiro : [GESTEC-Nit], 2007. 252 p.

Projeto Ghente/GESTEC-Nit.

1. Genoma humano. 2. Células-Tronco. 3. Farmacogenética. 4. Bioética. 5. Nanobiotecnologia. 6. Terapia gênica. 7. Biotecnologia – Patentes. I. Emerick, Maria Celeste. II. Montenegro, Karla Bernardo Mattoso. III. Degraeve, Wim.

CDD: 611.0181663

Células-tronco: memória, pesquisa e tecnologia

Antônio Carlos Campos de Carvalho e Cristiane del Corso

*Coordenador de Ensino e Pesquisa do Instituto Nacional de Cardiologia,
Professor titular do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho e Professora-adjunta do
Instituto Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro*

Células tronco são definidas como células indiferenciadas e não especializadas que tem a capacidade de realizar divisões simétricas e assimétricas. Da primeira, originam-se duas novas células tronco (indiferenciadas) que podem assim permanecer por sucessivas divisões celulares, promovendo a auto-renovação desse “pool” ou lote de células não especializadas. Essa capacidade de auto-renovação é característica fundamental da célula tronco. Da segunda forma de divisão celular, originam-se duas células distintas: uma indiferenciada, como descrito anteriormente e outra diferenciada (especializada), sendo que a variabilidade de células especializadas obtidas a cada divisão pode ser restrita ou mais ampla, dependendo do tipo de célula tronco em questão. Essas células-filhas, especializadas, são dotadas de funções específicas que variam de acordo com o tecido que essas novas células irão formar.

Em relação à fonte de obtenção, as células tronco podem ser originárias do embrião, do feto, do cordão umbilical e do adulto.

As células embrionárias são derivadas do embrião, que desenvolve-se a partir de sucessivas divisões do oócito fecundado ou zigoto (resultante da união entre o óvulo, de origem materna e o espermatozóide, de origem paterna). Durante as fases iniciais da embriogênese, o embrião passa pela fase onde é chamado de blastocisto (cerca de 4 a 5 dias após a formação do oócito fecundado). Nessa fase, o blastocisto é composto por uma camada externa e uma massa interna de células. Cada uma dessas camadas celulares dará origem a diversos tecidos e órgãos do próprio feto e também formará a placenta e outros anexos embrionários, como o âmnio e o alantóide. Se, nesse estágio de blastocisto, que é composto de aproximadamente 100-200 células, forem retiradas e cultivadas em laboratório as células que compõem a massa interna, essas darão origem à células tronco embrionárias. As células tronco embrionárias são pluripotentes. O significado dessa pluripotência é que uma célula tronco embrionária é capaz de gerar quaisquer dos tipos celulares presentes em todos tecidos do nosso organismo, com exceção da placenta.

Se continuarmos o desenvolvimento embrionário e chegarmos ao estágio de um indivíduo adulto, podemos encontrar células tronco em vários órgãos ou tecidos.

dos desse indivíduo. Nesse aspecto, o achado de células tronco residentes em órgãos ou tecidos adultos vem sendo ampliada cada vez mais. Até o presente momento, foi reportada a existência de células tronco no sistema nervoso, no sistema hematopoético, no fígado, na pele, no trato digestivo, nos olhos, no pâncreas e, mais recentemente, no coração. Essas células tronco já não são mais pluripotentes como as células tronco embrionárias, mas são chamadas de células multipotentes, pois tem a capacidade de dar origem à vários outros tipos celulares relacionados aos órgãos de onde são isoladas, e portanto com grau de diversidade limitado. Isso define a multipotência das células tronco de origem fetal, de cordão umbilical e adultas, mas não sua pluripotência, que está restrita às células tronco embrionárias.

A pluripotência das células tronco embrionárias é evidenciada por um fato que já é de conhecimento da comunidade há vários anos. No embrião, essas células formam os três folhetos embrionários: ectoderma, mesoderma e endoderma, como também as células germinativas (óvulos e espermatozóides). A partir desses três folhetos temos originadas todas as células que compõem os diversos tecidos no nosso organismo. Essa ampla capacidade de diferenciação as torna candidatas em potencial para estudos do ponto de vista clínico e/ou terapêutico, porém sua utilização efetiva deve ser cuidadosamente analisada, uma vez que seu alto grau de proliferação e sua diferenciação irrestrita faz com que as células tronco embrionárias também sejam capazes de formar teratomas, que são massas tumorais onde pode-se encontrar tecidos dos três diferentes folhetos embrionários mencionados acima. Sendo assim, são necessários mais estudos no sentido de se conhecer melhor os mecanismos de proliferação e diferenciação dessas células para que possam vir a ser usadas terapeuticamente num futuro próximo. Até o final do século XX, a situação em que nos encontrávamos era a de que o potencial de uso terapêutico de células tronco estava restrito ao uso de células tronco adultas para aplicação clínica.

Em 1998, Ferrari e colaboradores propõem pela primeira vez que a injeção de células tronco provenientes da medula óssea no músculo esquelético de camundongos que tinham sido previamente lesados por uma toxina, era capaz de reconstituir ou regenerar esse músculo lesado (6). Nesse trabalho, nota-se o envolvimento de tecidos provenientes de apenas um folheto embrionário: o mesoderma. No entanto, a partir de 1998, uma série de estudos reportam o que parecia ser um paradoxo para os embriologistas, pois a proposta fundamental era de que uma célula tronco derivada de medula óssea seria capaz de gerar não apenas as células sanguíneas e o músculo esquelético (ambos também derivados do mesoderma), mas seria capaz de formar hepatócitos, cardiomiócitos, neurônios, células gordurosas, células epiteliais, etc. Obviamente, isso implica no cruzamento de barreiras embriológicas clássicas, pois o pressuposto é que uma célula de um determinado folheto embrionário como mesoderma, por exemplo, que deveria estar unicamente comprometida com determinados fenótipos, agora começa a originar células cujos fenótipos derivam exclusivamente de um outro folheto, como o endoderma. Sendo assim, torna-se possível que células da medula óssea (origem mesodérmica) dêem origem à neurônios (origem ectodérmica) ou ainda a hepatócitos (origem endodérmica).

Entre os anos de 1998 e 2002, uma série de trabalhos foram publicados confirmando os achados descritos anteriormente. Em 2000, Mezey e colaboradores (8) mostraram que células tronco do sistema nervoso central eram capazes de formar tecido sanguíneo, por exemplo. Vale ressaltar que, até esse momento, acreditava-se que estruturas como o sistema nervoso central e o coração eram órgãos pós-mitóticos, ou seja, eram incapazes de qualquer grau de regeneração. A idéia que tais tecidos pudessem ser regulados por um compartimento de células tronco (2) e que essas células poderiam ainda diferenciar-se em outros tecidos quebrou esse paradigma e pôs em questionamento séculos de conhecimento acumulado, principalmente na área de embriologia.

A partir de 2002, estudos que utilizaram células tronco hematopoéticas como terapêutica alternativa de regeneração hepática sugeriram que a regeneração celular observada não ocorria por um mecanismo de transdiferenciação, ou seja, transformação de uma célula tronco hematopoética num hepatócito, mas era na realidade, resultado de um processo de fusão celular, onde a célula da medula óssea injetada fundia-se com hepatócitos no fígado do hospedeiro. Na verdade, foram feitos questionamentos em relação às observações feitas até então que levaram à conclusão de que a célula da medula transformava-se num hepatócito, por exemplo, e que isso se dava por transdiferenciação celular. Sendo assim, o paradoxo de que é possível que as células tronco possam romper os limites dos folhetos embrionários primitivos através do processo de transdiferenciação ainda é alvo de intensa investigação e discussão.

Na realidade, não foram só as células tronco hematopoéticas que foram utilizadas como protótipos de cura nos modelos experimentais. Células chamadas precursores endoteliais (oriundas do sangue), células mesenquimais (oriundas da medula óssea), células satélites (do músculo esquelético), células mesenquimais (de tecido adiposo) e células embrionárias também tem sido utilizadas em modelos experimentais na tentativa de alcançar terapias alternativas para regeneração da função de órgãos afetados.

Do ponto de vista técnico ou tecnológico, a primeira decisão que deve-se tomar é em relação ao tipo de célula que se deve escolher como proposta terapêutica para uma determinada doença. Em segundo lugar, qual é a via de aplicação/injeção que deve ser utilizada. O que é consenso, quaisquer que sejam as células escolhidas, é que, antes que se possa decidir sobre as vias de aplicação, é necessário que haja manipulação das mesmas. Sendo assim, essas células são passíveis de serem mantidas em laboratório e, em particular, no Brasil, faz-se manipulação mínima dessas células, ou seja, em questão de poucas horas as células tronco são retiradas, manipuladas e injetadas no hospedeiro que apresenta o órgão acometido.

Os primeiros ensaios clínicos envolvendo terapia celular na área de cardiologia tiveram início após a publicação dos resultados de Orlic e colaboradores (12), que mostraram que as células tronco hematopoéticas eram capazes de regenerar, com

eficácia de 67%, não só músculo cardíaco, mas também células musculares lisas e células endoteliais, quando injetadas na cicatriz do infarto no coração de camundongos. Sob o aspecto de recuperação do órgão lesado, essas células apresentavam-se com potencial terapêutico extremamente elevado, visto que seriam capazes de se diferenciar em músculo cardíaco, que irá repovoar a área infartada e também de formar novos vasos, que deverão substituir àqueles parcial ou totalmente ocluídos na tentativa de suprir a demanda metabólica exigida por esse órgão.

No entanto, a idéia de que a transdiferenciação celular era o mecanismo responsável pela geração de novas células cardíacas (ou musculares lisas e do endotélio) foi novamente contestada. Em 2004, dois grupos localizados na costa oeste dos Estados Unidos publicaram, independentemente, que as células tronco provenientes de medula óssea que eram injetadas em áreas do coração infartado não se transformavam em cardiomiócitos e, ao contrário, por apresentarem marcadores moleculares específicos tornando possível a identificação das mesmas, foi possível demonstrar que estas células mantinham as características fenotípicas de linhagem hematopoiética (1; 10). Embora os autores discordem completamente do mecanismo de transdiferenciação proposto por Orlic e colaboradores (12), há consenso no fato de que a injeção de células tronco de medula óssea provê uma melhora expressiva na função miocárdica em modelos de animais infartados.

Sendo assim, os primeiros ensaios clínicos foram iniciados num momento em que a hipótese verdadeira era de que as células de medula óssea teriam capacidade de transformar-se em músculo cardíaco e/ou outras células completamente diferenciadas, como células endoteliais e de músculo liso. É importante frisar que, embora o mecanismo pudesse estar errado, havia um consenso generalizado entre os diversos grupos de investigação no mundo de que a injeção das células em modelos animais trazia benefícios, uma vez que medidas ecocardiográficas de fração de encurtamento, que dá uma idéia da capacidade de contração do coração, evidenciavam melhora funcional significativa dos corações infartados que foram tratados com células tronco de medula óssea.

Mais recentemente, surgiu a possibilidade da utilização de células tronco adultas, mais especificamente as células tronco do próprio coração, também chamadas de células progenitoras cardíacas. Essas células estão presentes no coração adulto e acredita-se que são capazes de formar os vários sub-tipos de cardiomiócitos, incluindo miócitos atriais, ventriculares e os miócitos que compõem o sistema de condução rápida no coração. A identificação das células tronco cardíacas tem sido feita por vários grupos (2) (5) (11), porém a situação ainda é bastante nebulosa no que diz respeito à sua caracterização, uma vez que não há concordância na descrição das propriedades dessas células entre os grupos.

A existência de células tronco cardíacas foi mostrada pela primeira vez pelo grupo liderado por Dr. Piero Anversa, em Nova York. Utilizando técnicas de imunofluorescência, o grupo do Prof. Anversa mostrou a presença de células que apre-

sentavam na sua superfície uma proteína denominada c-kit, que na verdade, é um receptor de tirosina kinase cujo ligante é o fator de células tronco, que é especificamente encontrado em células progenitoras. Nesse mesmo trabalho, foi visto que a morfologia descrita para as células tronco cardíacas nada tem a ver com a morfologia de um cardiomiócito adulto. Uma vez que era possível identificar as células progenitoras cardíacas através de um marcador molecular (receptor c-kit), o próximo passo foi feito no sentido de isolar essas células e utilizá-las como alternativa terapêutica em modelos animais, primeiramente. O modelo patológico utilizado foi novamente o de infarto do miocárdio e os resultados reportados por Beltrame e colaboradores (3) foram bastante promissores, uma vez que foi mostrada uma intensa regeneração cardíaca associada à melhora da função miocárdica evidenciada pela recuperação na movimentação da parede do miocárdio que, previamente à injeção das células c-kit positivas, encontrava-se totalmente acinética.

Ainda em 2003, Schneider e colaboradores também identificaram células tronco cardíacas em corações adultos, porém caracterizaram-nas através da presença de uma proteína de membrana chamada sca-1 (do inglês: stem cell antigen 1) (11). Mais tarde, Chien também mostrou a presença de células tronco no coração adulto pela presença de células positivas para o antígeno isl1, que é uma proteína que está presente no coração durante o desenvolvimento embrionário (9). Essas células isl1+ foram reportadas tanto em corações de camundongos quanto em humanos e, quando essas células eram cultivadas juntamente com cardiomiócitos adultos, verificou-se que as mesmas tinham propriedades eletrofisiológicas semelhantes àquelas descritas para os miócitos adultos.

Nesse contexto, foram identificados três tipos de células tronco cardíacas: c-kit⁺; c-kit/sca-1⁺ e c-kit/isl1⁺. No entanto, ainda é difícil imaginar o porquê da existência de três tipos diferentes de células tronco num órgão como o coração, que tem uma capacidade regenerativa tão limitada.

Em relação aos mecanismos responsáveis pela regeneração tecidual e melhora funcional observada nos modelos animais de infarto do miocárdio tanto por injeção de células tronco provenientes da medula óssea, quanto por injeção de células tronco provenientes de coração adulto, ficamos com poucas opções, uma vez que há grande controvérsia quanto à real ocorrência de transdiferenciação celular. Adicionalmente, foi mostrado que o fenômeno de fusão celular ocorre numa frequência extremamente baixa, de modo que não parece possível que esse o fenômeno de fusão celular, ocorrendo isoladamente, explique os efeitos benéficos observados.

Sendo assim, não mais as próprias células tronco, mas sim, fatores liberados por essas células aparecem como uma nova possibilidade para explicar o mecanismo responsável pelo efeito benéfico observado quando da terapia celular nos casos de infarto do miocárdio. Em 2005, o grupo de Dzau (7) propõe que o efeito resultante da terapia com células tronco ocorra através de um mecanismo de ação

que chamamos de parácrino, ou seja, é devido à secreção de certos fatores pelas células tronco. Segundo esses autores, uma proteína chamada AKT-1 (ou porteiraina kinase B) controlaria certas vias de sinalização celular que poderiam acarretar em diminuição da morte celular, aumento da proliferação de células progenitoras cardíacas, que levam, em última instância, à proteção do miocárdio isquêmico.

Em 2004, Bock-Marquette e colaboradores mostraram que animais infartados que foram submetidos ao tratamento com timosina $\beta 4$ por via intra-cardíaca ou intra-peritoneal tiveram melhora significativa das propriedades contráteis do coração (4). Nesse caso, sabe-se que uma das funções da timosina $\beta 4$ é de ativar AKT, que, como já foi mencionado, tem papel-chave na questão da regeneração cardíaca. Nesse trabalho, também foi mostrado que há aumento significativo na forma fosforilada da proteína AKT nos animais que foram tratados com timosina $\beta 4$, sugerindo fortemente, que a via de sinalização que envolve a kinase B pode ser responsável pelos efeitos benéficos observados.

Como pode-se depreender a partir dos estudos supra citados, começamos a trabalhar com terapias celulares, principalmente em cardiologia, baseados no paradigma que o processo de transdiferenciação era o mecanismo responsável pela formação de novos cardiomiócitos a partir das células tronco. Depois passamos para um paradigma de fusão, em que a célula tronco se fundiria com o cardiomiócito. Atualmente acreditamos que os efeitos parácrinos, onde a secreção de fatores pela célula tronco que produz angiogênese, diminuição da apoptose (morte celular programada) e também estimula as células tronco ou progenitoras existentes no coração adulto, seja de fato, o principal mecanismo responsável pelos efeitos benéficos até então observados.

No Brasil, a possibilidade do uso de células tronco como alternativa terapêutica em doenças cardiovasculares tem sido abordada com projetos que envolvem estudos sobre o infarto do miocárdio e a doença de Chagas.

No primeiro é produzido infarto no miocárdio do coração de camundongos, através da ligadura da artéria coronária descendente anterior. Uma vez confirmado o infarto, as células tronco são injetadas e a partir daí, os animais são monitorados por sete semanas com realização periódica de testes funcionais como ecocardiograma, eletrocardiograma (ECG) e ergoespirometria. Ao final desse período, os animais são sacrificados e são feitas análises histológicas e imunocitoquímicas a fim de se localizar as células injetadas.

Dentre os critérios para avaliar se o animal estava devidamente infartado, previamente à injeção das células tronco, destacam-se a utilização de indicadores de necrose miocárdica, medidas através do nível sérico de Troponina C, que no caso dos animais infartados, apresenta valores maiores que o normal. Adicionalmente, verifica-se a presença da onda Q profunda no eletrocardiograma. Pode-se ainda comparar a polaridade do complexo QRS, que nos animais normais são essencialmente positivos e, após o infarto consolidado, passam a ter polaridade predominantemente negativa na derivação DI.

Cerca de dez dias após o infarto, faz-se a injeção intra-cardíaca das células tronco, ou seja, injeta-se as células diretamente no coração. A primeira evidência que sugere que as células tronco injetadas estão atuando no sentido de promover a recuperação daquele miocárdio pode ser avaliada pelo padrão da onda Q do eletrocardiograma. Previamente à injeção, o eletrocardiograma (derivação DI) apresenta-se com uma onda Q profunda e francamente negativa; depois da terapia com as células de medula óssea a onda Q praticamente desaparece, fazendo com que o eletrocardiograma volte a ter um padrão muito próximo do normal.

Do ponto de vista funcional ainda, utiliza-se técnica de ergoespirometria, onde é avaliada a função cardíaca dos animais durante a realização de exercício (corrida em esteira). Nesses casos, observa-se também uma diferença significativa no consumo máximo de oxigênio quando compara-se animais que foram infartados e tratados com solução salina (grupo controle) aos animais que foram tratados com as células da medula óssea.

Em relação aos achados histológicos, mostrou-se que é possível encontrar as células tronco no coração tratado até duas semanas depois da injeção, porém após esse período não é possível identificar mais nenhuma célula que foi injetada. Nesse caso, as células infundidas são identificadas pela cor verde, pois são provenientes da medula óssea de camundongos transgênicos que expressam a proteína GFP (do inglês, Green Fluorescent Protein). Sendo assim, esses resultados sugerem que as células injetadas não se transdiferenciaram, não se fundiram aos miócitos do hospedeiro, e que, muito provavelmente, já abandonaram o coração ou morreram. Apesar disso, os efeitos benéficos são claramente observados.

Uma das evidências mais expressivas de que essas células estão efetivamente fazendo algo benéfico pode ser depreendida a partir de experimentos utilizando microarranjos de DNA. Como isso é feito? Extrai-se o RNA dos corações dos animais infartados que foram tratados com salina (grupo controle) e também dos animais que foram tratados com as células tronco. Depois faz-se a transcrição reversa (produção de DNA a partir de RNA) e marca-se esse DNA obtido com sondas fluorescentes. Por exemplo, pode-se marcar em vermelho o DNA que veio do coração do animal infartado que recebeu as células tronco e com verde, o DNA proveniente do coração do animal controle. A seguir, faz um ensaio onde esse material é hibridizado em uma plataforma onde tem-se representados mais ou menos dez mil genes do genoma do camundongo. O resultado é avaliado através da identificação das cores: onde o ensaio aparecer vermelho, indica que os genes estão mais expressos no animal infartado que foi tratado com células quando comparados ao controle. Por outro lado, se a coloração do ensaio ficar amarela, significa que houve uma combinação equilibrada entre as cores verde e vermelha, portanto dos DNAs marcados em vermelho e os marcados em verde, indicando não haver diferença entre os genes expressos em ambos grupos experimentais.

A análise quantitativa desses micro-arranjos de DNA revelou que o simples infarto do miocárdio levou à alteração de cerca de 1900 genes desses camundongos. Em particular, desses 1900 genes, a maioria teve sua expressão aumentada. Em contra-partida, quando os animais infartados foram tratados com células tronco mononucleares, o número de genes com expressão alterada caiu para 512, ou seja, apenas 26% dos genes permanecem alterados após a terapia celular. O tratamento com células mononucleares leva, porém, à alteração na expressão de 754 novos genes. Quando, por outro lado, tratou-se esses animais infartados com células provenientes da fração mesenquimal medula óssea, o resultado é ainda mais chocante. Dos 1.900 genes inicialmente alterados pelo infarto, somente 51 permanecem alterados após a terapia celular, ou seja, apenas 3% dos genes inicialmente afetados. Da mesma forma que no tratamento anterior com células mononucleares, houve mudança na expressão de 291 novos genes. Uma simples interpretação desses dados mostra, de maneira incisiva, que essas células estão de fato fazendo algo. No caso dos ensaios com microarranjo de DNA, é necessário que se possa enfocar e discriminar o impacto da terapia celular num número mais restrito de genes, visto que é bastante complicado tirar conclusões acerca de mecanismos quando se tem mais de 2.000 genes que possam estar envolvidos no processo.

Esse trabalho vem sendo desenvolvido pelo nosso grupo na Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) e conta com a colaboração de professores, médicos e alunos de pós graduação desta e também vinculados à outras instituições nacionais, como a Universidade Federal Fluminense, o Hospital Pró Cardíaco do Rio de Janeiro além de instituições estrangeiras como o Albert Einstein College Medicine, em Nova York.

O segundo modelo que está sendo investigado é o de cardiopatia Chagásica. Esse projeto é liderado pelo grupo do Dr. Ricardo Ribeiro dos Santos, na FIOCRUZ da Bahia e conta com a colaboração do nosso grupo na UFRJ, do Instituto Nacional de Cardiologia de Laranjeiras e do Albert Einstein College of Medicine, em Nova York. Nesse modelo, camundongos são infectados com a cepa Colombiana do *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), de forma que os animais desenvolvem uma cardiomiopatia muito semelhante à cardiopatia chagásica humana, na qual observa-se intensa destruição do músculo cardíaco pelo infiltrado inflamatório e uma fibrose exuberante. Tal qual é feito no modelo de infarto do miocárdio, o objetivo principal desse projeto é de tratar esse animais com células mononucleares de medula óssea, utilizando, nesses casos, as células provenientes da medula óssea de camundongos transgênicos, que possuem as células marcadas em verde pela expressão da GFP.

Como a Cardiopatia Chagásica é uma doença difusa, diferente portanto do infarto, onde o comprometimento é mais focal, optou-se por injetar as células tronco sistemicamente e não diretamente no coração, como foi feito no modelo anterior. A questão óbvia foi a seguinte: será que as células injetadas na circulação periférica chegariam ao coração? Os resultados desses experimentos evidenciaram a presença de células verdes no coração dos animais chagásicos, o que de fato, prova que as mesmas chegam ao coração.

Em relação ao potencial efeito benéfico dessas células, foi mostrado que havia diminuição da inflamação e da fibrose nos corações dos animais chagásicos crônicos tratados com célula mononuclear de medula óssea de animais transgênicos.

Como a idéia do projeto inicial era de aplicar a terapia celular em indivíduos chagásicos, testou-se a própria medula óssea de camundongos chagásicos crônicos e viu-se que as células vindas medula de um camundongo doente também eram capazes de diminuir significativamente a inflamação e a fibrose previamente observadas.

Algumas das análises nesse estudo foram feitas utilizando a técnica de ressonância nuclear magnética que mostrou que os camundongos infectados por *T. cruzi* desenvolvem uma enorme dilatação cardíaca, principalmente do ventrículo direito. Quando os animais são tratados, ocorre uma melhora funcional expressiva e o retorno das dimensões das câmaras cardíacas aos valores normais.

Foram feitos ensaios de microarranjo de DNA para o modelo Chagásico também. Nesse casos, foram encontramos 1.300 genes alterados pela infecção chagásica crônica, sendo que apenas 9% desses genes permaneceram alterados após terapia celular e 131 novos genes foram regulados. Um desses novos genes regulados, era o gene que codifica para o receptor de G-CSF (do inglês Granulocyte-Colony Stimulating Factor). De maneira bem simplificada, pode-se dizer que o G-CSF é um fator de crescimento que estimula a medula óssea a produzir e liberar mais células. Sendo assim, foram feitos experimentos onde tratou-se camundongos chagásicos crônicos com G-CSF; nesse caso observou-se uma redução significativa da fibrose quando os animais foram tratados com G-CSF por uma semana e uma diminuição acentuada da inflamação quando o esquema terapêutico prolongou-se por três semanas.

Desse modo, esperamos ter contribuído no sentido de nortear os leitores de que estamos fazendo testes nos modelos animais para que, numa fase posterior, possamos aplicar esses conhecimentos na prática clínica. Na verdade, no próximo texto serão discutidos alguns protocolos clínicos que já foram iniciados e, de fato, uma série de questões estão sendo geradas a partir dos resultados obtidos nos ensaios clínicos, de modo que, para que tais perguntas possam ser respondidas, é necessário que o tema seja revisto e analisado sob o ponto de vista básico novamente. Obviamente, devemos enfatizar que a interação entre a área básica e área clínica é condição sine qua non para que possamos prosperar cientificamente.

Referências

1. **Balsam LB, Wagers AJ, Christensen JL, Kofidis T, Weissman IL and Robbins RC.** Haematopoietic stem cells adopt mature haematopoietic fates in ischaemic myocardium. *Nature* 428: 668-673, 2004.

2. **Bearzi C, Rota M, Hosoda T, Tillmanns J, Nascimbene A, De Angelis A, Yasuzawa-Amano S, Trofimova I, Siggins RW, Lecapitaine N, Cascapera S, Beltrami AP, D'Alessandro DA, Zias E, Quaini F, Urbanek K, Michler RE, Bolli R, Kajstura J, Leri A and Anversa P.** Human cardiac stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 14068-14073, 2007.
3. **Beltrami AP, Barlucchi L, Torella D, Baker M, Limana F, Chimenti S, Kasahara H, Rota M, Musso E, Urbanek K, Leri A, Kajstura J, Nadal-Ginard B and Anversa P.** Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell* 114: 763-776, 2003.
4. **Bock-Marquette I, Saxena A, White MD, Dimaio JM and Srivastava D.** Thymosin beta4 activates integrin-linked kinase and promotes cardiac cell migration, survival and cardiac repair. *Nature* 432: 466-472, 2004.
5. **Chien KR.** Lost and found: cardiac stem cell therapy revisited. *J Clin Invest* 116: 1838-1840, 2006.
6. **Ferrari G, Cusella-De Angelis G, Coletta M, Paolucci E, Stornaiuolo A, Cossu G and Mavilio F.** Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science* 279: 1528-1530, 1998.
7. **Gnecchi M, He H, Liang OD, Melo LG, Morello F, Mu H, Noiseux N, Zhang L, Pratt RE, Ingwall JS and Dzau VJ.** Paracrine action accounts for marked protection of ischemic heart by Akt-modified mesenchymal stem cells. *Nat Med* 11: 367-368, 2005.
8. **Mezey E, Chandross KJ, Harta G, Maki RA and McKercher SR.** Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow. *Science* 290: 1779-1782, 2000.
9. **Moretti A, Caron L, Nakano A, Lam JT, Bernshausen A, Chen Y, Qyang Y, Bu L, Sasaki M, Martin-Puig S, Sun Y, Evans SM, Laugwitz KL and Chien KR.** Multipotent embryonic isl1+ progenitor cells lead to cardiac, smooth muscle, and endothelial cell diversification. *Cell* 127: 1151-1165, 2006.
10. **Murry CE, Soonpaa MH, Reinecke H, Nakajima H, Nakajima HO, Rubart M, Pasumarthi KB, Virag JI, Bartelmez SH, Poppa V, Bradford G, Dowell JD, Williams DA and Field LJ.** Haematopoietic stem cells do not transdifferentiate into cardiac myocytes in myocardial infarcts. *Nature* 428: 664-668, 2004.
11. **Oh H, Bradfute SB, Gallardo TD, Nakamura T, Gaussin V, Mishina Y, Poicjous J, Michael LH, Behringer RR, Garry DJ, Entman ML and Schneider MD.** Cardiac progenitor cells from adult myocardium: homing, differentiation, and fusion after infarction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 12313-12318, 2003.
12. **Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Jakoniuk I, Anderson SM, Li B, Pickel J, McKay R, Nadal-Ginard B, Bodine DM, Leri A and Anversa P.** Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* 410: 701-705, 2001.