



**INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
EGAS MONIZ**

MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**CÉLULAS ESTROMAIS MESENQUIMAIS (MSC) COMO AGENTES
TERAPÊUTICOS**

Trabalho submetido por
Ana Sofia Martins Serras
para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

outubro de 2014



**INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
EGAS MONIZ**

MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**CÉLULAS ESTROMAIS MESENQUIMAIS (MSC) COMO AGENTES
TERAPÊUTICOS**

Trabalho submetido por
Ana Sofia Martins Serras
para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Trabalho orientado por
Professora Doutora Evguenia Bekman

outubro de 2014

AGRADECIMENTOS

Com o terminar desta etapa gostaria de expressar a minha gratidão a todos aqueles que estiveram presentes e me acompanharam durante estes últimos 5 anos.

À Instituição, pelos meios colocados à disposição durante o curso, e ao seu corpo docente, que me transmitiu conhecimentos fundamentais, que inspiraram e contribuíram grandemente para a minha formação profissional.

À minha orientadora, Prof. Doutora Evguenia Bekman, como professora que me introduziu e fez despertar o interesse sobre este tema no decurso do meu percurso e, igualmente pela disponibilidade, empenho, apoio e direcionamento na elaboração desta monografia. Muito obrigada pelos comentários mais vigorosos mas também pelas gratificações.

Um muito obrigada a toda a minha família, sobretudo à minha mãe Fernanda, que sempre acreditou nas minhas capacidades, me apoiou e permitiu que tudo isto se tornasse possível, e ao Paulo e às minhas irmãs Alexandra e Catarina que sempre toleraram os meus desvaneios e participaram tanto em momentos de felicidade como de tristeza. Agradeço igualmente à Márcia e às minhas avós Conceição e Fernanda pelo interesse constantemente demonstrado durante todo o meu percurso académico.

Aos meus colegas e amigos que me acompanharam nesta jornada e que com certeza permanecerão nos tempos vindouros. Um especial obrigado à Ana Figueiredo, Patrícia Pereira e Sofia Silva, com quem percorri esta etapa com muito trabalho árduo mas também muita alegria, Laura Hebler e Tiago Ferreira, com quem posso sempre contar, e Tânia Fernandes, com quem aprender se tornou mais fácil. Obrigada por fazerem parte desta fase tão importante, obrigada pelas conversas, conselhos, vivências e até mesmo discussões que experienciámos juntos.

A todos vós, um Muito Obrigada!

Ana Sofia Martins Serras
outubro de 2014

Resumo

O conceito de Células Estromais Mesenquimais (MSC) tem vindo a ser desenvolvido com o decorrer do tempo, desde MSC que apenas eram conhecidas pelo seu potencial de diferenciação tripartido até aos dias de hoje em que as MSC poderão atuar, por exemplo, como células citoprotetoras, estimuladoras dos progenitores endógenos ou transportadoras de fármacos. As suas propriedades intrínsecas, a sua facilidade de isolamento e expansão *in vitro* e a ausência de questões éticas associadas tornam-nas células de colossal interesse terapêutico. Estas células evadem o sistema imunitário, permitindo a sua utilização *off-the-shelf*, migram aos tecidos lesados e segregam diversas moléculas imunomoduladoras que permitem atenuar a lesão e acelerar a regeneração normal do tecido. Mecanismos adicionais têm sido propostos, como a diferenciação direta das MSC nas células alvo e o seu enxerto no local de lesão, contudo os resultados são inconsistentes e poucos estudos suportam estas teorias. Alternativamente, áreas como a engenharia genética ou a engenharia de tecidos têm demonstrado competências para contornar estas últimas limitações e ainda otimizar as suas propriedades e funções. Desde o seu estudo em modelos animais até ao seu estudo em ensaios clínicos que as MSC têm vindo a demonstrar eficácia e segurança no tratamento das mais diversas doenças, principalmente do foro regenerativo e autoimune, como por exemplo, Diabetes Mellitus (DM) ou doenças cardiovasculares, atualmente muito prevalentes. No entanto, ainda terão de se esclarecer diversas controvérsias e desafios previamente à sua ampla aplicação clínica. Por integração multidisciplinar das MSC com os princípios da biologia, genética, farmacologia ou engenharia, esta área estará apta a integrar a próxima geração de medicina personalizada.

Palavras-chave: Células Estromais Mesenquimais; Imunomodulação; Regeneração de Tecidos; Ensaios Clínicos.

Abstract

The Mesenchymal Stromal Cells (MSC) concept has been developed over time, ever since MSC were only known for their tripartite potential up to today where MSC may act as, for example, cytoprotective cells, endogenous progenitor stimulators or drug carriers. Their intrinsic properties, their ease of in vitro isolation and expansion and the absence of associated ethical concerns make them cells of colossal therapeutic interest. These cells evade the immune system, allowing their off-the-shelf use, migrate to injured tissues and secrete various immunomodulatory molecules which allow them to alleviate the lesion and to accelerate normal tissue regeneration. Additional mechanisms have been proposed, such as direct differentiation of MSC into target cells and their graft at the lesion site, but the results are inconsistent and only a few studies support these theories. Alternatively, fields such as genetic engineering or tissue engineering have demonstrated the ability to overcome the latter limitations and further optimize their properties and functions. Since their study in animal models until their study in clinical trials, MSC have demonstrated efficacy and safety in the treatment of several diseases, mainly in the regenerative and autoimmune fields, such as Diabetes Mellitus (DM) or cardiovascular diseases, very prevalent these days. However, there are still several controversies and challenges that have yet to be clarified prior to their extensive clinical use. Through MSC multidisciplinary integration with biology, genetics, pharmacology or engineering principles, this area will be able to integrate the next generation of personalized medicine.

Keywords: Mesenchymal Stromal Cells; Immunomodulation; Tissue Regeneration; Clinical Trials

ÍNDICE GERAL

| | |
|---|----|
| ÍNDICE DE FIGURAS | 9 |
| ÍNDICE DE TABELAS | 10 |
| LISTA DE ABREVIATURAS..... | 11 |
| GLOSSÁRIO..... | 15 |
| CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO | 17 |
| Enquadramento Histórico | 17 |
| Caracterização das MSC | 17 |
| Origem e Isolamento | 18 |
| Criopreservação e Banco de Células | 20 |
| CAPÍTULO 2 – MECANISMOS E PROPRIEDADES DAS MSC | 21 |
| Propriedades Imunomoduladoras | 22 |
| Recrutamento das MSC e <i>Homing</i> aos Tecidos Lesados | 25 |
| Segurança e Potenciais Riscos na Utilização das MSC | 29 |
| Importância das MSC na Engenharia Genética | 32 |
| Importância das MSC na Engenharia de Tecidos | 35 |
| CAPÍTULO 3 – APLICAÇÕES CLÍNICAS | 39 |
| Diabetes Mellitus (DM) | 39 |
| Doença do Enxerto contra o Hospedeiro (GvHD) | 42 |
| Doenças Ósseas e Articulares | 47 |
| Doenças Cardiovasculares | 51 |
| Doenças Neurológicas | 55 |
| CAPÍTULO 4 – PERSPETIVAS PRESENTES E FUTURAS..... | 61 |
| CAPÍTULO 5 – CONCLUSÕES | 65 |
| BIBLIOGRAFIA | 69 |
| ANEXO A – POTENCIAL MECANISMO DE IMUNOMODULAÇÃO | |
| ANEXO B – ESTUDOS RECENTES | |
| ANEXO C – ENSAIOS CLÍNICOS EM DESENVOLVIMENTO | |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|--|-----------|
| Figura 1: Exemplos de fatores mediadores da estimulação parácrina pelas MSC e suas funções..... | 21 |
| Figura 2: Ativação das MSC em condições inflamatórias | 23 |
| Figura 3: Modelo simplificado de <i>homing</i> passivo comparativamente ao <i>homing</i> ativo | 27 |
| Figura 4: Fenómeno de <i>homing</i> ativo das MSC..... | 28 |
| Figura 5: Diferentes tipos de ações das MSC na formação tumoral | 30 |
| Figura 6: Administração de transgenes mediada pelas MSC | 33 |
| Figura 7: Tipo de transporte consoante as moléculas de superfície | 35 |
| Figura 8: MSC na engenharia de tecidos | 36 |
| Figura 9: Aplicações clínicas das MSC..... | 39 |
| Figura 10: Modelo hipotético de transplante de ilhéus com e sem MSC..... | 40 |
| Figura 11: Mecanismo de ação das MSC na GvHD..... | 43 |
| Figura 12: Transfeção <i>ex vivo</i> de MSC para engenharia do osso | 48 |
| Figura 13: Procedimento de enxerto de pasta osteocondral..... | 50 |
| Figura 14: Potenciais mecanismos de ação cardíaca das MSC | 53 |
| Figura 15: Potenciais mecanismos de ação neuronal das MSC | 56 |
| Figura 16: Conhecimento atual das propriedades das MSC..... | 61 |
| Figura 17: Modelo de transplante das MSC e parâmetros a caracterizar para futura aplicação clínica..... | 63 |

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Comparação entre os principais tecidos fonte de MSC..... **19**

Tabela A: Principais fatores mediadores da ação imunomoduladora das MSC em cada tipo de célula do Sistema Imunitário.*

Tabela B 1: Principais estudos pré-clínicos em complicações crónicas da Diabetes Mellitus.*

Tabela B 2: Principais resultados da ação das MSC na GvHD obtidos em diversos ensaios clínicos.*

Tabela B 3: Principais conclusões sobre a ação das MSC na Esclerose Múltipla (MS), verificadas nos estudos mais recentes.*

Tabela B 4: Principais resultados da ação das MSC a nível cardíaco, obtidos em ensaios clínicos recentes.*

Tabela C: Avaliação atual das MSC em ensaios clínicos.*

* Tabelas em anexo

LISTA DE ABREVIATURAS

5-FC: 5-fluorocitosina (do inglês *5-fluorocytosine*)

AMI: Enfarte Agudo do Miocárdio (do inglês *Acute Myocardial Infarction*)

Ang: Angiopietina (do inglês *Angiopoietin*)

APC: Células Apresentadoras de Antígenos (do inglês *Antigen-presenting Cells*)

ATMP: Medicamentos de Terapia Avançada (do inglês *Advanced-therapy Medicinal Products*)

AT-MSc: Células Estromais Mesenquimais derivadas do Tecido Adiposo (do inglês *Adipose Tissue-derived Mesenchymal Stromal Cell*)

BDNF: Fator Neurotrófico derivado do Cérebro (do inglês *Brain-derived Neurotrophic Factor*)

bFGF: Fator de Crescimento Básico do Fibroblasto (do inglês *basic Fibroblast Growth-Factor*)

BMC: Células Mononucleares da Medula Óssea (do inglês *Bone Marrow Mononuclear Cells*)

BM-MSc: Células Estromais Mesenquimais derivadas da Medula Óssea (do inglês *Bone Marrow-derived Mesenchymal Stromal Cells*)

BMP: Proteínas Morfogenéticas do Osso (do inglês *Bone Morphogenetic Proteins*)

CFU-F: Unidades Formadoras de Colônias de Fibroblastos (do inglês *Fibroblast Colony-forming Units*)

CGH: HíbridaçãO Genômica Comparativa (do inglês *Comparative Genomic Hybridization*)

CNS: Sistema Nervoso Central (do inglês *Central Nervous System*)

CPT-11: Irinotecano (do inglês *Irinotecan*)

CSC: Células Estaminais Cardíacas (do inglês *Cardiac Stem Cells*)

CTL: Linfócitos T Citotóxicos (do inglês *Cytotoxic T-lymphocyte*), células CD8⁺

DC: Células Dendríticas (do inglês *Dendritic Cells*)

DLA: Antígeno Leucocitário Canino (do inglês *Dog Leukocyte Antigen*)

DM: Diabetes Mellitus

DMEM: *Dulbecco's modified Eagle's Medium*

DMSO: Dimetilsulfóxido (do inglês *Dimethyl Sulfoxide*)

EAE: Encefalomielite Autoimune Experimental (do inglês *Experimental Autoimmune Encephalomyelitis*)

ECM: Matriz Extracelular (do inglês *Extracellular Matrix*)

EPR: Permeabilidade e Retenção Aumentadas (do inglês *Enhanced Permeability and Retention*)

FACS: Citometria de Fluxo (do inglês *Fluorescence-activated Cell Sorting*)

FISH: Hibridação *in situ* Fluorescente (do inglês *Fluorescence in situ Hybridization*)

GAG: Glicosaminoglicanos (do inglês *Glycosaminoglycan*)

GMP: Boas Práticas de Fabrico (do inglês *Good Manufacturing Practice*)

GvHD: Doença do Enxerto contra o Hospedeiro (do inglês *Graft versus Host Disease*)

GvL: Enxerto contra Leucemia (do inglês *Graft versus Leukemia*)

HGF: Fator de Crescimento de Hepatócitos (do inglês *Hepatocyte Growth Factor*)

HIF: Fator Induzido por Hipoxia (do inglês *Hypoxia-inducible Factor*)

HLA: Antígeno Leucocitário Humano (do inglês *Human Leukocyte Antigen*)

hMSC: Células Estromais Mesenquimais Humanas (do inglês *Human Mesenchymal Stromal Cells*)

HSC: Células Estaminais Hematopoiéticas (do inglês *Hematopoietic Stem Cells*)

IDO: Indolamina 2,3-dioxigenase (do inglês *Indoleamine 2,3-dioxygenase*)

IFN: Interferão (do inglês *Interferon*)

IGF: Fator de Crescimento do tipo Insulina (do inglês *Insulin-like Growth Factor*)

IL: Interleucina (do inglês *Interleukin*)

IL-ra: Antagonista do Recetor de Interleucina (do inglês *Interleukin Receptor Antagonist*)

JAM: Moléculas Juncionais de Adesão (do inglês *Junctional Adhesion Molecules*)

MCP: Proteína Quimioatratora dos Monócitos (do inglês *Monocyte Chemotactic Protein*)

MEM: *Minimum Essential Eagle's Medium*

MHC: Complexo *Major* de Histocompatibilidade (do inglês *Major Histocompatibility Complex*)

miRNA: Ácido Ribonucleico Pequeno (do inglês *Micro-Ribonucleic Acid*)

MMP: Metaloproteinase da Matriz (do inglês *Matrix Metalloproteinase*)

MOG: Glicoproteína de Mielina dos Oligodendrócitos (do inglês *Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein*)

MS: Esclerose Múltipla (do inglês *Multiple Sclerosis*)

MSC: Células Estromais Mesenquimais (do inglês *Mesenchymal Stromal Cells*)

MT1-MMP: Metaloproteinase da Matriz de Membrana de Tipo 1 (do inglês *Membrane type 1 Matrix Metalloproteinase*)

NSC: Células Estaminais Neurais (do inglês *Neural Stem Cells*)

PD: Doença de Parkinson (do inglês *Parkinson Disease*)

PDGF: Fator de Crescimento derivado de Plaquetas (do inglês *Platelet-derived Growth Factor*)

PD-L: Ligando de Morte Celular Programada (do inglês *Programmed Death Ligand*)

Pdx: *Pancreatic and Duodenal Homeobox*

PECAM: Moléculas de Adesão das Células Endoteliais e Plaquetas (do inglês *Platelet-endothelial Cell-adhesion*)

PG: Prostaglandina (do inglês *Prostaglandin*)

PGA: Ácido Poliglicólico (do inglês *Polyglycolic acid*)

PLA: Ácido Poliláctico (do inglês *Polylactic acid*)

PLCL: Poli(L-láctico-co-ε-caprolactona) (do inglês *Poly(L-lactide-co-ε-caprolactone)*)

PLGA: Ácido Poli(D,L-láctico-co-glicólico) (do inglês *Poly(D,L-lactic-co-glycolic acid)*)

RA: Artrite Reumatoide (do inglês *Rheumatoid Arthritis*)

rCE: Carboxilesterase de Coelho (do inglês *Rabbit Carboxylesterase*)

SDF: Fator derivado das Células Estromais (do inglês *Stromal Cell-derived Factor*)

SN-38: 7-etil-10-hidroxicamptotecina (do inglês *7-ethyl-10-hydroxycamptothecin*)

SOX: *Sry-type HMG box*

sTNFR: Recetor Solúvel do Fator de Necrose Tumoral (do inglês *Soluble Tumor Necrosis Factor Receptor*)

TGF: Fator de Crescimento de Transformação (do inglês *Transforming Growth Factor*)

Th: Células T auxiliares (do inglês *T helper*), células CD4⁺

TIMP: Inibidor Tecidual da Metaloproteinase (do inglês *Tissue Inhibitor of Metalloproteinase*)

TLR: recetor *Toll-like* (do inglês *Toll-like receptor*)

TNF: Fator de Necrose Tumoral (do inglês *Tumor Necrosis Factor*)

TRAIL: Ligando indutor de Apoptose relacionado com o Fator de Necrose Tumoral (do inglês *TNF-related Apoptosis-inducing Ligand*)

Treg: Células T reguladoras (do inglês *Regulatory T Cells*), células CD4⁺CD25⁺.FoxP3

UC-MSc: Células Estromais Mesenquimais derivadas do Cordão Umbilical (do inglês *Umbilical Cord-derived Mesenchymal Stromal Cells*)

VCAM: Molécula de Adesão Vascular (do inglês *Vascular Cell-adhesion Molecule*)

VEGF: Fator de Crescimento Endotelial Vascular (do inglês *Vascular Endothelial Growth Factor*)

VLA: Antígeno de Expressão Tardia (do inglês *Very Late Antigen*)

GLOSSÁRIO

Acesso Alargado (ensaios clínicos): disponibilização de fármacos ou dispositivos promissores, mas que ainda não provaram ser eficazes ou seguros, a doentes que correm perigo de vida.

Alogénico: células de diferentes indivíduos da mesma espécie, isto é, o dador e o recipiente são dois indivíduos distintos.

Angiogénese: formação de vasos sanguíneos.

Autólogo: células do próprio indivíduo, isto é, o dador e o recipiente são o mesmo indivíduo.

Clonogénico: capacidade de auto-renovação de uma célula que ao se replicar pode dar origem a colónias geneticamente idênticas a si.

Criopreservação: conservação de material biológico por congelação a baixas temperaturas.

Haploidêntico: dador parcialmente compatível (50%).

Homing: fenómeno procedente da mobilização, em que as MSC presentes na circulação sofrem migração através do endotélio.

Imunomodulação: modulação da resposta imunitária do indivíduo.

Mobilização: saída das MSC do seu nicho para a circulação.

Nicho: microambiente em que as células estaminais adultas residem, incluindo as células e matriz extracelular circundantes, executando sinais que modulam a sua ativação ou senescência.

Off-the-shelf: utilização de células alogénicas de um dador universal, previamente isoladas e prontas a utilizar.

Parácrino: ação de moléculas bioativas nas células vizinhas à célula produtora das mesmas.

Plasticidade: capacidade de diferenciação em diferentes linhagens.

Singénico: células de um irmão gémeo, isto é, o dador partilha o genótipo do recipiente.

Unidades Formadoras de Colónias de Fibroblastos: MSC indiferenciadas em cultura, isto é, que ainda não sofreram indução em linhagens específicas.

Xenogénico: células de diferentes espécies.

CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO

Ao longo da monografia serão discutidos os aspetos mais relevantes no campo das Células Estromais Mesenquimais (MSC), com foco principal nos potenciais mecanismos pelos quais estas se guiam para exercer o seu efeito terapêutico. A par com as suas propriedades serão também ilustrados diversos exemplos, dando prevalência principalmente aos estudos publicados nos últimos 2 anos, os quais revelam o estado atual da aplicação destas células em diferentes patologias. Por último, as perspetivas futuras também serão parte integrante na definição das MSC como agentes terapêuticos.

Enquadramento Histórico

As MSC foram descobertas pela primeira vez em 1968 por Friedenstein e colaboradores como uma população de células da medula óssea, aderentes ao substrato e semelhantes a fibroblastos, com propriedades clonogénicas *in vitro* e *in vivo* (R. C. Zhao, 2013) e capacidade de regeneração do osso e suporte à hematopoiese (Hematti & Keating, 2013). Estas células foram inicialmente definidas como unidades formadoras de colónias de fibroblastos (CFU-F) e mais tarde como células estaminais mesenquimais, uma vez que demonstraram ter capacidade de se diferenciar e mediar o *turnover* e regeneração de osso e cartilagem (Caplan, 1991).

O primeiro ensaio clínico foi realizado em 1995, o qual demonstrou a segurança do transplante de MSC autólogas (Sensebé, Gadelorge, & Fleury-Cappellesso, 2013; Shihua Wang, Qu, & Zhao, 2012), e, anos mais tarde, estas foram aplicadas pela primeira vez em associação com biomateriais para reconstrução de defeitos ósseos (Quarto et al., 2001). A par com estes acontecimentos fulcrais, Pittenger e colaboradores (1999) demonstraram efetivamente a capacidade de diferenciação das MSC nas linhagens osteogénica, condrogénica e adipogénica e até hoje, embora esta propriedade suscite alguma controvérsia, diversos ensaios validaram a capacidade de diferenciação destas células em neurónios (Kopen, Prockop, & Phinney, 1999), células epiteliais da retina (Arnhold, Absenger, Klein, Addicks, & Schraermeyer, 2007), da pele (Nakagawa, Akita, Fukui, Fujii, & Akino, 2005) e do rim (Morigi et al., 2004), entre outros.

Caracterização das MSC

O carecer de uma definição geral das características das MSC deu aso à crescente dificuldade na comparação de resultados clínicos entre diferentes investigadores que recorrem a diferentes metodologias de recolha, isolamento e diferenciação destas células.

Deste modo, em 2006, o *Mesenchymal and Tissue Stem Cell Committee* da *International Society for Cell Therapy* propôs três critérios mínimos para definir as MSC humanas (hMSC), nomeadamente, (1) a aderência ao plástico quando em condições padronizadas de cultura; (2) a expressão dos marcadores de superfície CD105, CD73 e CD90 e a ausência de expressão dos marcadores de linhagem hematopoiética e endotelial CD45, CD34, CD14 ou CD11b, CD79 α ou CD19 e HLA de classe II, determinados por citometria de fluxo (FACS); e (3) a capacidade de diferenciação em osteoblastos, adipócitos e condroblastos em condições padronizadas *in vitro* (Dominici et al., 2006). No entanto, estes critérios não são válidos na maioria das situações, uma vez que estas células apresentam diversas variações dependendo das condições de cultura (Augello, Kurth, & De Bari, 2010), do tecido e espécie de origem (Keating, 2012), entre outros.

O termo “células estaminais mesenquimais” foi considerado impreciso e traiçoeiro e como tal foi proposta uma nova terminologia para as MSC cultivadas *ex vivo*, nomeadamente “células estromais mesenquimais multipotentes”. Para serem células estaminais, os progenitores necessitariam, para além de apresentar um potencial de diferenciação multilinhagem e regenerativo de tecidos, de apresentar capacidade de auto-renovação a longo prazo, propriedade a qual é questionável nestas células (Horwitz et al., 2005).

Atualmente, as MSC são definidas como um fenómeno *in vitro* (Augello et al., 2010; Keating, 2012), ainda não tendo sido identificada a sua localização específica *in vivo* devido à ausência de marcadores específicos. Contudo, sabe-se que quando manipuladas *ex vivo* sofrem rearranjos fenotípicos, perdendo ou adquirindo marcadores de superfície, potencialmente induzidos pela alteração do microambiente em que estas células se encontram no organismo (Augello et al., 2010). Revela-se assim essencial a realização de estudos *in vivo* com MSC endógenas para uma correta caracterização das suas propriedades e funções biológicas (Keating, 2012).

Origem e Isolamento

As MSC são células originárias da mesoderme, o folheto mediano das três camadas germinativas (Salem & Thiemermann, 2010), tendo sido inicialmente isoladas da medula óssea de adultos (Pittenger et al., 1999) e então encontradas nos compartimentos perivasculares do cordão umbilical (Hass, Kasper, Böhm, & Jacobs, 2011), placenta (In 't Anker et al., 2004) e fígado fetal (Campagnoli et al., 2001), pulmões (Griffiths, Bonnet, & Janes, 2005), tecido adiposo (Rodriguez, Elabd, Amri, Ailhaud, & Dani, 2005), sangue

periférico (Tondreau et al., 2005) e polpa dentária (Gronthos, Mankani, Brahim, Robey, & Shi, 2000), entre outros. Tendo em conta que a fonte ideal de MSC para fins terapêuticos deverá ser de fácil acesso e com possibilidade de rápida expansão em cultura (Jung, Panchalingam, Rosenberg, & Behie, 2012), estes últimos tecidos adultos, a par com os tecidos de origem embrionária quando disponíveis, constituem uma alternativa viável à medula óssea, embora possam apresentar funções, expressão de marcadores de superfície ou potenciais de proliferação e diferenciação distintos (Tabela 1).

Tabela 1: Comparação entre os principais tecidos fonte de MSC.

| | <i>BM-MS</i> | <i>AT-MS</i> | <i>UC-MS</i> | <i>P-MS</i> | <i>Referências</i> |
|---------------------------------|--|---|---|---|--|
| <i>Marcadores de superfície</i> | CD105, CD73 e CD90, CD45, CD34, CD14 ou CD11b, CD79a ou CD19 e HLA classe II | = BM-MS STRO-1 ⁻ ↑ CD146 | = BM-MS ↑ CD146 | = BM-MS SSEA-1, SSEA-4, Oct4 e Nanog ↑ CD49d, CD10 e CD56 | (Hass et al., 2011; Viswanathan et al., 2014; Weyand, Dominici, Hass, Jacobs, & Kasper, 2013b) |
| <i>Vantagens</i> | Pioneiro; Colheita segura | Colheita simples e segura, obtenção de grandes quantidades de MSC | > capacidade proliferativa Colheita não invasiva, sem questões éticas, > capacidade proliferativa <i>in vitro</i> , obtenção de grandes quantidades de MSC | > expansão e enxerto | |
| <i>Desvantagens</i> | Colheita invasiva e < quantidade de MSC | População heterogénea | Em desenvolvimento | Difícil obtenção | |
| <i>Aplicações (exemplos)</i> | AA, GvHD, DM, OA, PD, SCI | GvHD, CLI, MS | AA, Colite, GvHD, DM | AA, DM, AVC | |

Legenda: ↑, Maior expressão; ↓, Menor expressão; >, Maior; <, Menor; BM, Medula Óssea; AT, Tecido Adiposo; UC, Cordão Umbilical; P, Placenta; AA, Anemia Aplástica; GvHD, Doença do Enxerto contra o Hospedeiro; DM, Diabetes Mellitus; OA, Osteoartrite; PD, Doença de Parkinson; SCI, Lesão da Medula Espinhal; CLI, Isquemia Crítica dos Membros; MS, Esclerose Múltipla; AVC, Acidente Vascular Cerebral.

A cultura das MSC é geralmente realizada nos meios basais *Dulbecco's modified Eagle's Medium* (DMEM) com baixo teor em glucose e α -*modified Minimum Essential Eagle's Medium* (α -MEM) com ou sem fatores de crescimento (Ayatollahi et al., 2012; Chase, Lakshmipathy, Solchaga, Rao, & Vemuri, 2010). A dose usualmente necessária para investigação ou utilização terapêutica é de, no mínimo, 10^6 MSC por Kg do doente adulto. Porém este tipo de células apenas está presente numa frequência de $1:10^4$ (cordão umbilical) a $1:10^6$ (medula óssea adulta), dependendo da idade do dador, condições de cultura e fonte das células, tornando assim imprescindível a sua expansão após isolamento (Jung et al., 2012; Sarugaser, Hanoun, Keating, Stanford, & Davies, 2009; Y. Wang, Han, & Song, 2012). Contudo estes meios têm de ser habitualmente suplementados com 10-20% de soro fetal bovino, um produto xenogénico que transporta diversos riscos, tendo

sido propostos métodos alternativos como meios humanizados que utilizam soro de origem humana, porém, também estes não estão isentos de limitações. Como tal, existem já diversos estudos em curso para o desenvolvimento de meios de cultura sem soro, com propriedades e composição definidas que permitam a estabilidade genética das células. No entanto, ainda nenhum destes meios se adequa à aplicação clínica (Chase et al., 2010; Jung et al., 2012; Sensebé et al., 2013; Y. Wang et al., 2012).

Criopreservação e Banco de Células

O estudo das MSC em ensaios clínicos é realizado recorrendo principalmente a produtos criopreservados e armazenados, os quais são descongelados e administrados ao doente no espaço de poucas horas (Galipeau, 2013). Diversos estudos comprovam a criopreservação de MSC de diversas fontes, como tecido adiposo, polpa dentária, medula óssea (Davies, Smith, Cooper, Shelton, & Scheven, 2014), cordão umbilical (Chatzistamatiou et al., 2014; Polchow et al., 2012) e placenta (Y. Wang et al., 2012), entre outros, e, embora o banco de células e a sua criopreservação confirmem uma oportunidade única à sua aplicação clínica, ainda estão associados a diversas limitações.

A capacidade das MSC em sobreviver a um armazenamento a longo prazo e manter as suas características fenotípicas mediante congelamento constituem fatores críticos para futura utilização terapêutica. Desta forma, são geralmente utilizadas substâncias crioprotetoras potencialmente tóxicas, como o dimetilsulfóxido (DMSO) (Davies et al., 2014; Ock & Rho, 2011), que vão prevenir a formação de cristais durante o processo de congelamento (Davies et al., 2014). Adicionalmente, a maioria dos protocolos de criopreservação incluem proteínas do soro de origem animal e, embora estes meios sejam posteriormente eliminados num processo de lavagem, qualquer resíduo que permaneça pode originar reações adversas (Thirumala, Goebel, & Woods, 2009).

Os efeitos da criopreservação nestas células, abordados em diversos estudos, são difíceis de comparar entre si, uma vez que estas células podem ser isoladas de diferentes tecidos e ainda armazenadas por períodos de tempo variados entre protocolos (Davies et al., 2014). Deste modo, é essencial a padronização de protocolos concordantes com as Boas Práticas de Fabrico (GMP) que permitam a produção de produtos celulares a larga escala a par com a avaliação da sua qualidade e segurança antes da sua utilização na prática clínica.

CAPÍTULO 2 – MECANISMOS E PROPRIEDADES DAS MSC

Inicialmente considerava-se a diferenciação como o mecanismo de ação terapêutica das MSC, contudo, diversos estudos verificaram que este fenômeno não seria preponderante às suas funções. Foi proposto um mecanismo alternativo baseado na promoção dos mecanismos de reparação endógenos em vários tecidos, por meio de estímulos parácrinos e dinâmicos que levariam à criação de um microambiente na lesão (Casiraghi, Remuzzi, Abbate, & Perico, 2013; Jung et al., 2012; Parekkadan & Milwid, 2010). Desta forma, com exceção a nível da reparação óssea onde as MSC se diferenciam diretamente em osteoblastos e condrócitos (Allan & Strunk, 2011), foi sugerido que estas células atuariam pela libertação de moléculas bioativas que poderão deter diferentes funções (Figura 1), nomeadamente, ação de suporte na hematopoiese e angiogénese, ação anti-inflamatória, anti-fibrótica, anti-apoptótica, quimiotática ou imunomoduladora (Allan & Strunk, 2011; Gebler, Zabel, & Seliger, 2012).

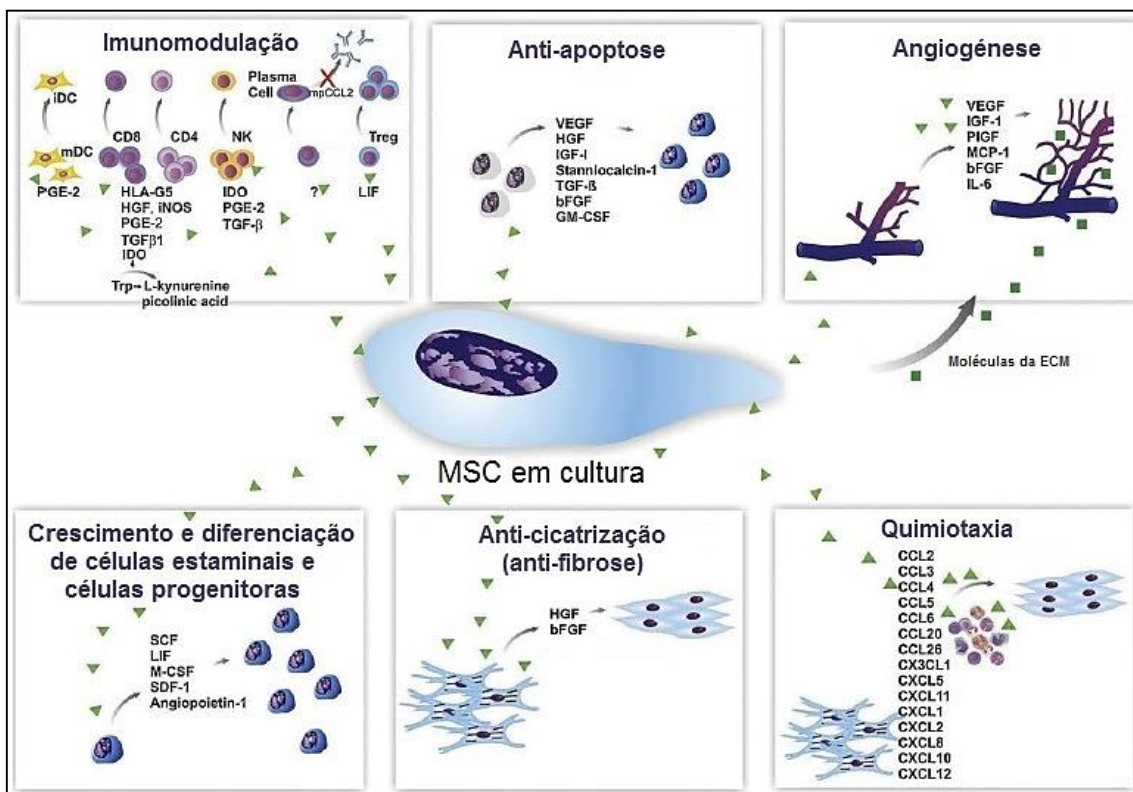


Figura 1: Exemplos de fatores mediadores da estimulação parácrina pelas MSC e suas funções. Aquando da lesão, a libertação de diferentes moléculas bioativas pelas MSC, como IDO, IGF, VEGF, entre outras, constitui o principal mecanismo de ação terapêutica destas células. IDO, Indolamina 2,3-dioxigenase; IGF, Fator de Crescimento do tipo Insulina; VEGF, Fator de Crescimento Endotelial Vascular (Adaptado com modificações de Meirelles, L. D. S., Fontes, A. M., Covas, D. T., & Caplan, A. I. (2009). Mechanisms involved in the therapeutic properties of mesenchymal stem cells. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 20, 419–27. doi:10.1016/j.cytogfr.2009.10.002).

Apesar de se reconhecerem as propriedades imunomoduladora e regenerativa das MSC, ainda não foi possível concretizar ensaios clínicos, persistindo assim diversas falhas na avaliação do seu potencial terapêutico (Parekkadan & Milwid, 2010). Deste modo, será necessário utilizar modelos de doença em animais filogeneticamente semelhantes aos humanos, de forma a determinar previamente o mecanismo biológico por detrás das suas ações terapêuticas (Bernardo, Pagliara, & Locatelli, 2012).

Propriedades Imunomoduladoras

O interesse inicial nas MSC baseava-se na sua aplicação terapêutica em regeneração celular, contudo, verificou-se que não se desenvolvia rejeição aquando do transplante alogénico ou autólogo destas células (Parekkadan & Milwid, 2010; Yagi et al., 2010). Esta descoberta abriu portas à determinação dos potenciais mecanismos por detrás desta ação e, embora ainda não completamente definidos, verificou-se que as MSC provenientes de diversos tecidos de origem (Krampera, 2011) também modulavam as células do sistema imunitário e endócrino.

Primeiramente, é necessário ressaltar que a migração (Yagi et al., 2010), a ação imunomoduladora e a proliferação e diferenciação das MSC são controladas pela expressão de recetores *Toll-like* (TLR) na sua superfície. Estes recetores reconhecem moléculas patogénicas ou sinais endógenos potencialmente perigosos e estão envolvidos na indução das respostas inata e adaptativa. Pode dar-se especial relevância ao TLR-3, ativo em condições inflamatórias como imunossupressor – por estimulação da libertação de CCL5, CCL10, IL-4, IL-10, antagonista do recetor de IL-1 (IL-1ra), indolamina 2,3-dioxigenase (IDO) ou prostaglandina E2 (PGE2) – e ao TLR-4, como pró-inflamatório na ausência de fatores inflamatórios – por estimulação da libertação de IL-6 e IL-8, do ligando indutor de apoptose relacionado com o fator de necrose tumoral (TRAIL) ou do fator de crescimento de transformação β (TGF- β) (Figuroa, Carrión, Villanueva, & Khoury, 2012; Krampera, 2011).

A ação imunomoduladora passa principalmente pela secreção de diversas moléculas bioativas (Kuhn & Tuan, 2010; Parekkadan & Milwid, 2010; Shihua Wang et al., 2012) e pela interação entre as MSC e as células alvo (Haddad, 2011). Esta interação é mediada por moléculas de adesão, nomeadamente por interação do ligando B7-H1 (PD-L1) com o recetor de morte celular programada 1 (PD-1). Contudo, como demonstrado na Figura 2, esta ação não é constitutiva, uma vez que tem de ser precedida por uma ativação pelos linfócitos T. Estes linfócitos são por sua vez ativados pela secreção de IFN- γ (Christensen

et al., 2010) acompanhado ou não do fator de necrose tumoral alfa ($TNF\alpha$), $IL-1\alpha$ e $IL-1\beta$ aquando de uma condição inflamatória (Ghannam, Bouffi, Djouad, Jorgensen, & Noël, 2010; Haddad, 2011; Hematti & Keating, 2013; Krampera, 2011). Deste modo, a polarização das MSC num fenótipo imunomodulador estará particularmente favorecida em doenças autoimunes (Dazzi & Krampera, 2011; S. K. Kang, Shin, Ko, Jo, & Ra, 2012).

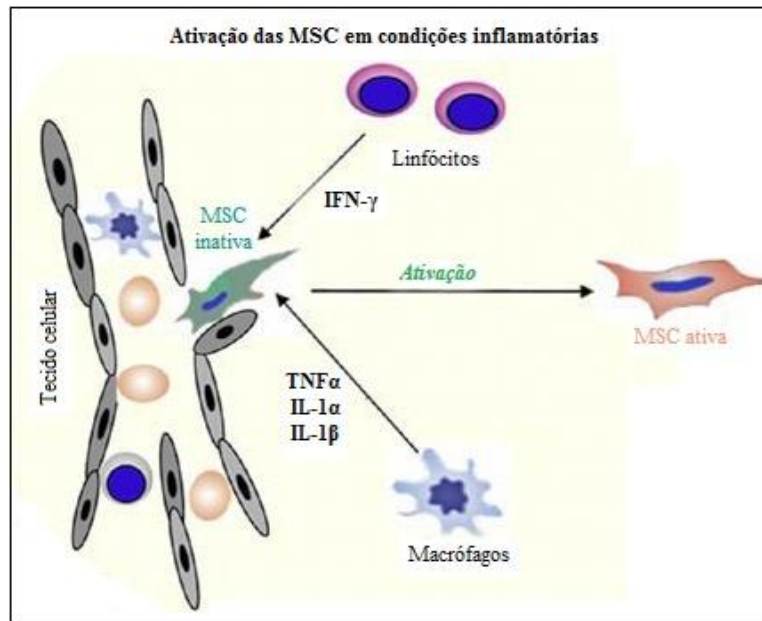


Figura 2: Ativação das MSC em condições inflamatórias. As MSC inativas são recrutadas ao local de lesão, onde sofrem ativação mediada pela secreção dos fatores $IFN-\gamma$, pelos linfócitos T, e $TNF\alpha$, $IL-1\alpha$ e $IL-1\beta$, pelos monócitos, permitindo posterior ação reparadora ou imunomoduladora (Adaptado com modificações de Shi et al. 2010).

A tolerância imunitária às MSC parece derivar do seu caráter hipoimunogénico, uma vez que há uma carência na expressão do complexo *major* de histocompatibilidade de classe I (MHC-I) e ausência de expressão de moléculas MHC-II ou outras co-estimuladoras, como CD40, CD80 e CD86 (Hoogduijn et al., 2010; Salem & Thiemermann, 2010; R. C. Zhao, 2013). Contudo, sob condições específicas, como uma infeção, há expressão de MHC-II devido à prevalência de baixas concentrações de $IFN-\gamma$. A ação das MSC nas células T depende assim da dose desta citocina. Em baixas concentrações, as MSC comportar-se-ão como células apresentadoras de antígenos (APC), o que ativa as células T que, por sua vez, produzirão $IFN-\gamma$. Estas condições são propícias à imunossupressão, uma vez que há a diminuição da expressão de MHC-II, com subsequente diminuição do comportamento APC, e um aumento de PD-L1, com subsequente inibição das células T ativadas (Haddad, 2011; Hoogduijn et al., 2010; Krampera, 2011; Yagi et al., 2010).

A ação das MSC nas células T é independente do MHC e não se baseia na apoptose mas sim na indução da anergia destas células por inibição da sua proliferação mediada por antígenos, anticorpos ou mitógenos (Gebler et al., 2012; Haddad, 2011). Deste modo, a sua propriedade passa pela estimulação do seu fenótipo anti-inflamatório. A promoção da diferenciação das células T1 auxiliares (Th1 ou T naïve) em Th2 e a estimulação das células Th3 e células T reguladoras (Treg) originam um comportamento imunomodulador. Também contribuem para esta propriedade a inibição da proliferação e citotoxicidade mediada pelos linfócitos T citotóxicos (CTL) e pelas células NK em repouso (Chase & Vemuri, 2012; Ghannam et al., 2010). Por sua vez, a anergia celular deriva da ausência de expressão de moléculas co-estimuladoras, enquanto a indução das células Treg depende tanto do contacto entre as células Th e as MSC como da libertação de fatores controladores da ativação, proliferação e citotoxicidade das células T, como a PGE2, TGF- β 1, indolamina 2,3-dioxigenase (IDO), isoforma G do antígeno leucocitário humano (HLA-G) e a molécula PD-L1 (Chase & Vemuri, 2012; Gebler et al., 2012).

As células B ativadas são controladas pela inibição da proliferação por aprisionamento do ciclo celular em fase G0/G1 independentemente do contacto entre células. Adicionalmente, a diferenciação destas células promovida pelas células dendríticas (DC) também é inibida, com diminuição da produção de imunoglobulinas e da secreção de quimiocinas e fatores solúveis. Embora o contacto entre células não constitua um aspeto indispensável, detém capacidade de aumento da função das MSC por interação entre o ligando PD-L1 e o seu recetor PD-1 (Chase & Vemuri, 2012; Gebler et al., 2012; Haddad, 2011). Por último, a atividade das células B está grandemente dependente das células T e, como tal, será influenciado pela ação inibidora das MSC sobre estas células (Haddad, 2011).

As células *Natural Killer* (NK) sofrem modulação pelo contacto direto com as MSC e pela secreção dos fatores TGF- β , HLA-G e PGE2 pelas MSC. As MSC inibem a proliferação induzida por IL-2 e IL-15 e a produção de IFN- γ , a par com a diminuição da citotoxicidade das células NK. Estas ações ocorrem por meio da menor expressão dos recetores ativadores nestas últimas e por libertação de IDO e PGE2. Todavia, verifica-se que as células NK ativadas e em repouso têm capacidade de lise das MSC numa relação inversamente proporcional à expressão de MHC-I nestas últimas (Gebler et al., 2012; Ghannam et al., 2010; Haddad, 2011). Deste modo, a incubação das MSC com IFN- γ

poderá oferecer proteção neste campo devido à estimulação, como visto anteriormente, da expressão de MHC-I na superfície das MSC (Haddad, 2011).

As MSC atuam nos estágios iniciais da maturação das DC. A inibição da expressão das moléculas co-estimuladoras, com interferência na sua função de APC, e a inibição da diferenciação e maturação dos monócitos e células hematopoéticas progenitoras CD34⁺, por secreção de IL-6 ou PGE2, geram um fenótipo de DC com baixa expressão de IL-12, TNF α e MHC-II e elevada expressão de IL-1 β e IL-10 (Gebler et al., 2012; Shi et al., 2010; Yagi et al., 2010). Desta forma, o fenótipo maduro estará reduzido, enquanto o imaturo prevalece, levando a um encaminhamento da resposta imune para a estimulação de células Th2 em detrimento das células Th1. Adicionalmente, a indução da produção de IL-10 estimulará a produção de células Treg, as quais por sua vez segregam TGF- β , o qual também apresenta como função a indução da angiogénese após lesão (Haddad, 2011).

De forma semelhante às anteriores, os macrófagos são modulados pelas MSC através da libertação de PGE2, com estimulação do fenótipo M2, anti-inflamatório e produtor de IL-10, em detrimento do fenótipo M1, pró-inflamatório e produtor de TNF α . Subsequentemente, a capacidade de APC é alterada, uma vez que este fenótipo leva à diminuição da expressão de MHC-II e CD86 pelos macrófagos (Chase & Vemuri, 2012).

Os neutrófilos, na sequência da secreção de IL-6 pelas MSC, não sofrem apoptose nem a chamada explosão ou *burst* respiratório, uma vez que há a inibição da sua produção de oxigénio reativo. Aquando do contacto com endotoxinas verifica-se a estimulação da expressão dos recetores de quimiocinas e a mobilização das MSC. Estas segregam PGE2, que por sua vez estimulará a produção de IL-10 pelos monócitos e macrófagos, inibindo subsequentemente a migração dos neutrófilos e o *stress* oxidativo nos tecidos alvo (Chase & Vemuri, 2012; Ghannam et al., 2010; Haddad, 2011).

A Tabela A em anexo reúne as ações imunomoduladoras das MSC e alguns exemplos para a sua aplicação. Demonstra ainda os principais fatores bioativos que estas libertam e que medeiam ou são mediados pelos fatores expressos pelas células do Sistema Imunitário.

Recrutamento das MSC e *Homing* aos Tecidos Lesados

O fenómeno de *homing* pode ser precedido pela estimulação da mobilização das MSC do hospedeiro ou pela infusão de MSC exógenas (Karp & Leng Teo, 2009). Esta última pode

ser realizada quer por administração direta no tecido-alvo, em que as variáveis a ter em conta constituem a proliferação e diferenciação das células, quer por administração sistémica (administração intravenosa, intraperitoneal, intra-arterial ou intracardíaca), a qual apresenta uma variável adicional, uma vez que as células ainda necessitam de sofrer o fenómeno de *homing* para atingir o tecido lesado (Z.-J. Liu, Zhuge, & Velazquez, 2009).

Quando a infusão sistémica das MSC se realiza num indivíduo saudável, estas células alojam-se preferencialmente nos vasos sanguíneos dos pulmões, fígado, baço e osso e em menor extensão nos restantes órgãos. Todavia, em condições de lesão tecidual ou formação tumoral, estas células exibem tropismo e, como tal, são redirecionadas para esses locais (Casiraghi et al., 2013; Roisin M Dwyer, Khan, Barry, O'Brien, & Kerin, 2010; Jung et al., 2012; S. K. Kang et al., 2012; Karp & Leng Teo, 2009). Embora a distribuição por outros órgãos e tecidos seja menor, é necessário controlar não apenas a localização inicial das MSC como também a localização algum tempo após a infusão (Karp & Leng Teo, 2009).

Os mecanismos por detrás deste processo *in vivo* carecem de confirmação e os estudos a ser realizados neste campo procuram avaliar os potenciais fenómenos que possam ocorrer relativamente ao *homing* dos leucócitos e das células estaminais hematopoiéticas (HSC) (Chase & Vemuri, 2012; Z.-J. Liu et al., 2009; Salem & Thiemermann, 2010). No entanto, alguns autores sugerem que as MSC podem não exibir exatamente o mesmo tipo de mecanismo que as HSC. As MSC apresentam maiores dimensões que estas últimas e, como tal, a par com o *homing* ativo clássico, podem atingir o tecido alvo por *homing* passivo (Allan & Strunk, 2011; Chase & Vemuri, 2012; Karp & Leng Teo, 2009).

A cultura *in vitro* destas células resulta no aumento do seu tamanho e, como tal, poderá verificar-se o seu aprisionamento em pequenos capilares. Haverá assim uma alteração do seu fluxo sanguíneo com diminuição da velocidade das MSC e subsequente translocação passiva pelo endotélio. Desta forma, o *homing* passivo é função do tamanho das células e da sua deformabilidade, ao contrário da sua outra variante, a qual apresenta um mecanismo semelhante à transmigração endotelial dos leucócitos (Allan & Strunk, 2011; Chase & Vemuri, 2012; Karp & Leng Teo, 2009), conforme ilustrado na Figura 3.

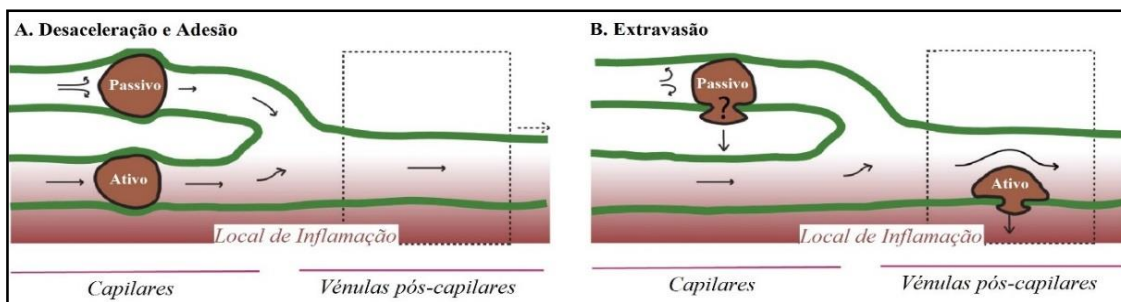


Figura 3: Modelo simplificado de homing passivo comparativamente ao homing ativo. A desaceleração e a adesão (A) passivas das MSC devem-se ao seu elevado tamanho e conseqüentes interações físicas com o endotélio, levando a uma diminuição do fluxo sanguíneo. Pelo contrário, no fenómeno ativo, as MSC acopladas ao endotélio atravessam facilmente os capilares sem alteração do fluxo. A extravasão (B) por translocação passiva ocorre a nível dos capilares e o seu destino é ainda incerto, enquanto o fenómeno ativo ocorre a nível das vénulas e está dependente de diversas moléculas (Adaptado com modificações de Karp & Leng Teo, 2009).

Durante a inflamação, o recrutamento das MSC ocorre segundo uma cascata de eventos coordenados. São inicialmente libertadas citoquinas, quimiocinas e fatores de crescimento no local da lesão, sinalizando a necessidade de ação das MSC, as quais apresentam recetores de superfície capazes de as reconhecer (Chase & Vemuri, 2012). O primeiro passo é então a mobilização, ou seja, a estimulação da saída das MSC do seu nicho por moléculas quimioatratoras, como o fator 1α derivado das células estromais (SDF- 1α ou quimiocina CXCL12) que interage com o recetor de superfície CXCR4 das MSC. Esta quimiocina, produzida pelas células estromais da medula óssea, apresenta uma expressão aumentada aquando do contacto com TNF α ou IL-1 e exerce o recrutamento dos leucócitos à lesão, apresentando também um papel preponderante na migração das MSC administradas por via sistémica (Z.-J. Liu et al., 2009; Salem & Thiernemann, 2010). Adicionalmente, embora em menor extensão, também foi documentado um possível efeito sinérgico entre a quimiocina SDF- 1α e o fator de crescimento de hepatócitos (HGF) no direcionamento das MSC ao tecido alvo (Chase & Vemuri, 2012; Rajasekhar, 2009) e o aumento do recrutamento e migração destas células mediante interação dos eixos CCL21/CCR7 (Salem & Thiernemann, 2010) e CX3CL/CX3CR1 (Yagi et al., 2010).

As células endoteliais, por estimulação pelas citoquinas inflamatórias, expressam ácido hialurónico, ligandos de integrinas, como a molécula de adesão celular vascular 1 (VCAM-1), e seletinas E e P, que por sua vez originam, entre outros, o resíduo CD44 (Baaten, Tinoco, Chen, & Bradley, 2012; Chase & Vemuri, 2012; Salem & Thiernemann, 2010). Assim, como verificado na Figura 5, ao atingirem o tecido alvo, as MSC ligam-se às células endoteliais pela seletina P, atrasando o fluxo das primeiras e

permitindo o subsequente fenómeno de *rolling* e adesão às células endoteliais, mediados pela interação da molécula VCAM-1 com o antígeno de expressão tardia 4 (VLA-4 ou integrina $\alpha 4\beta 1$), que constitui uma molécula de adesão expressa nas MSC (Allan & Strunk, 2011; Z.-J. Liu et al., 2009; Salem & Thiemermann, 2010). Por último, resta a migração transendotelial em que o mecanismo ainda está por esclarecer, porém algumas hipóteses têm sido propostas. A extravasão das MSC da circulação para os tecidos será mediada pela degradação da camada endotelial a nível enzimático, nomeadamente por proteínases como a metaloproteinase da matriz 2 (MMP-2), MMP de membrana de tipo 1 (MT1-MMP) e inibidores tecidulares da metaloproteinase 1 e 2 (TIMP-1 e TIMP-2) (Allan & Strunk, 2011; Karp & Leng Teo, 2009; Salem & Thiemermann, 2010), a par com o emprego de moléculas juncionais de adesão (JAM), caderinas e moléculas de adesão das células endoteliais e plaquetas (PECAM-1/CD31) (Salem & Thiemermann, 2010). Todavia, é de notar que todos os mecanismos propostos apenas foram comprovados *in vitro* e, como tal, é necessária a realização de novos estudos *in vivo* de forma a preencher a falha deixada pelos estudos anteriores.

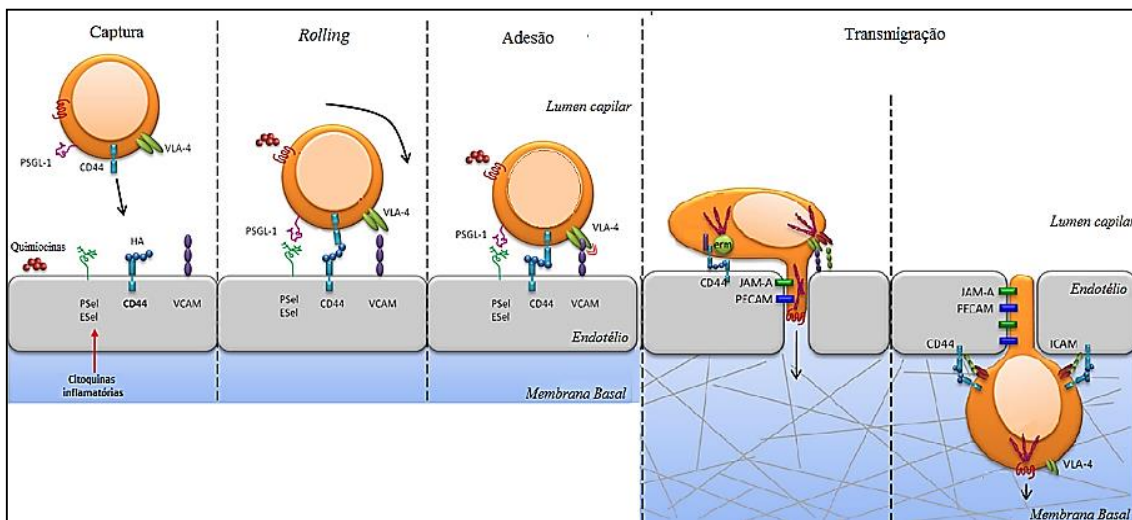


Figura 4: Fenómeno de *homing* ativo das MSC. Aquando da lesão verifica-se a libertação de citoquinas e subsequente estimulação da expressão das seletinas P e E nas células endoteliais, o que promove a interação das MSC com as células endoteliais, com posterior adesão das mesmas ao endotélio por interação VLA-4/VCAM-1. A transmigração poderá ser então mediada por ativação de moléculas como as JAM, as caderinas, o PECAM-1/CD31 ou mesmo por proteínases (não demonstrado). VLA-4, Antígeno de Expressão Tardia 4; VCAM-1, Molécula de Adesão Vascular 1; JAM, Moléculas Juncionais de Adesão; PECAM, Moléculas de Adesão das Células Endoteliais e Plaquetas (Adaptado com modificações de Baaten et al., 2012).

A expressão do recetor CXCR4, de elevada importância no processo de *homing*, é estimulada na medula óssea e em tecidos isquémicos, contudo, mediante cultura *in vitro*, não há expressão deste recetor na superfície das MSC. Este facto indica a necessidade de

adotar estratégias de modulação do microambiente inflamatório para melhorar o *homing* e subsequente remoção das células danificadas, com aumento da taxa de regeneração. Determinou-se assim que a estimulação por citocinas, por submissão destas células a condições prévias de hipoxia, que estimula a produção de MMP, e pela criação de um ambiente isquêmico, que estimula a produção de CXCR4, levam ao aumento da mobilidade e migração destas células. Outras estratégias consistem na (1) modulação da quimiotaxia ao local da lesão, como por exemplo através da estimulação da expressão dos recetores nucleares Nur77 e Nur1, presentes em grande quantidade aquando da migração (S. K. Kang et al., 2012), ou através da utilização de vetores que sobreexpressam recetores CXCR4 (W. Chen et al., 2012; S. K. Kang et al., 2012; Karp & Leng Teo, 2009); e na (2) modulação das barreiras fisiológicas, recorrendo à associação das MSC com heparina, uma vez que este composto anticoagulante promove o desimpedimento da vasculatura para livre passagem das células e evita ainda a sua acumulação no pulmão (S. K. Kang et al., 2012). Alternativamente à terapêutica genética, repleta de questões de segurança, poderão utilizar-se técnicas enzimáticas pela geração de compostos de superfície celular que modulam a mobilização. Como exemplo temos a alteração da glicofoma nativa da molécula CD44 que gera locais de ligação para a seletina E, molécula a qual é grandemente expressa na medula óssea e, como tal, induz o enxerto das MSC no osso (Allan & Strunk, 2011; S. K. Kang et al., 2012; Z.-J. Liu et al., 2009).

O tropismo das MSC aos tecidos lesados representa uma mais-valia a nível clínico, permitindo direcionar terapêuticas, como por exemplo, o uso das MSC como células transportadoras de fármacos. Esta propriedade permitirá a administração sistémica em detrimento da local e, como tal, tornará a terapêutica menos invasiva. Todavia, atualmente ainda se desconhece a localização e fenótipo exatos das MSC, o que as coloca num impasse. Por outro lado, já foram criadas diversas abordagens que permitem o aperfeiçoamento desta característica enquanto o verdadeiro mecanismo não é descoberto, como se poderá verificar no capítulo seguinte.

Segurança e Potenciais Riscos na Utilização das MSC

Embora os efeitos imunossupressores das MSC detenham um papel positivo na regeneração tecidual, não se pode descartar a hipótese de formação tumoral a longo prazo após a expansão excessiva destas células. A sua manipulação *ex vivo* e subsequente transplante levam a uma inibição da imunovigilância, essencial à proteção do organismo contra agentes externos, e, mais importante, ao aumento da probabilidade de

transformação das células (Barkholt et al., 2013; Jung et al., 2012; Parekkadan & Milwid, 2010).

Fisiologicamente, os tumores estão inseridos num nicho ou no chamado estroma tumoral, composto por fibroblastos, vasos sanguíneos e células do sistema imunitário infiltrativas (Casiraghi et al., 2013). Estes estimulam a migração e invasão das MSC através da libertação de quimiocinas, como por exemplo a proteína quimioatratadora dos monócitos 1 (MCP-1) responsável pelo cancro da mama (R M Dwyer et al., 2007), ou de fatores de crescimento, como o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) expresso em gliomas (Z. Gao, Cheng, Xue, & Liu, 2012). Sabendo que uma das possíveis formas de atuação destas células na tumorigénese se baseia no seu efeito anti-inflamatório e imunomodulador (Casiraghi et al., 2013; Wong, 2011), foi proposto que as MSC exibem um fenótipo fibroblástico. Desta forma, poderiam integrar um tumor pré-existente e subsequentemente estimular o seu crescimento, por estimulação da neoangiogénese e imunossupressão, sobrevivência e metastização (Figura 5) (Casiraghi et al., 2013; Roisin M Dwyer et al., 2010; Parekkadan & Milwid, 2010; Wong, 2011). Esta questão permanece em aberto, não havendo evidência de qualquer aumento ou diminuição do crescimento tumoral mediado pelas MSC. A tomada de decisão sobre a administração destas células é assim baseada na avaliação do rácio de benefício e risco específicos a cada doente (Barkholt et al., 2013; Casiraghi et al., 2013).

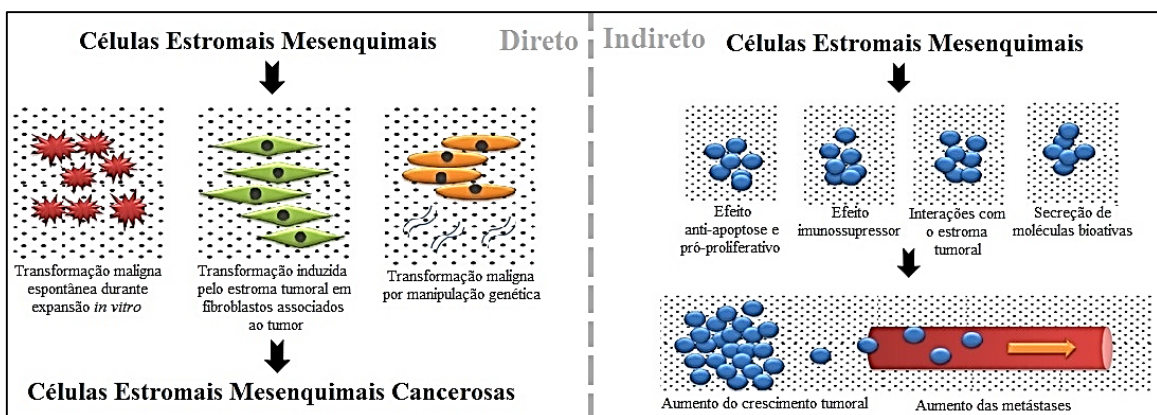


Figura 5: Diferentes tipos de ações das MSC na formação tumoral. As MSC podem exercer os seus efeitos diretamente por transformação maligna, derivada da extensiva expansão *in vitro*, manipulação genética ou por interação com o estroma tumoral, ou indiretamente via imunomodulação, efeito anti-apoptose ou secretor de moléculas bioativas (Adaptado com modificações de Wong, 2011).

As MSC apresentam algumas parecenças com as células tumorais, uma vez que são células resistentes à apoptose, com tempo de sobrevivência prolongado e capacidade de replicação por longos períodos de tempo (Y. Wang et al., 2012). A curto prazo não foram

registadas quaisquer reações adversas aquando da administração destas células (Parekkadan & Milwid, 2010). Todavia, a expansão em cultura a longo termo transporta diversos riscos, uma vez que altera a capacidade proliferativa das MSC, o seu potencial diferenciativo e a sua atividade trófica (S. K. Kang et al., 2012). Desta forma, a segunda e mais preocupante forma de atuação pauta-se pela transformação maligna, em que esta deriva de uma alteração do estado de senescência das MSC com subsequente imortalização das células. O estado de senescência é atingido após diversas passagens e é caracterizado pela cessação do crescimento e diminuição da diferenciação por aprisionamento em fase G0/G1 do ciclo celular. A sua alteração procede de uma instabilidade genética e baseia-se na estimulação da telomerase, enzima a qual impede o encurtamento dos telómeros dos cromossomas. Adicionalmente, a estimulação de oncogenes (ex. *myc* e *ras*) e a inibição dos genes supressores de tumor (ex. *p53* e *pRB*) induzem a imortalização das células após estas atravessarem a fase de crise, fase a qual se caracteriza por uma extensa apoptose (Casiraghi et al., 2013; Sensebé et al., 2013). Embora poucas consigam superar este processo e as aberrações cromossómicas geralmente estejam associadas ao decréscimo da taxa de divisão celular, não é possível afirmar com segurança que estas células não poderão sofrer transformação.

Diversos estudos verificam a acumulação de aneuploidias após expansão das MSC *in vitro* (Capelli et al., 2014; Tarte et al., 2010). Numa reunião de peritos organizada pela *Cell Products Working Party* e pelo Comité de Terapias Avançadas foi, mais uma vez, sugerida uma relação direta das aberrações cromossómicas com o processo de cultura em si ao invés de ser o doente o indutor das mesmas. Assim, foi proposta a realização da manipulação das MSC com recurso ao crescimento lento das células, isto é, com uma baixa taxa de proliferação, e pouco tempo de expansão, em que apenas o número mínimo de passagens é realizado, a par com medidas que ajudam a evitar a indução de *stress* no microambiente (ex. hipoxia), para prevenir uma potencial transformação (Barkholt et al., 2013).

Até à data não existem registos de qualquer formação tumoral após tratamento com MSC e diversos estudos indicam que as MSC apresentam estabilidade genética e resistência à transformação espontânea, o que aponta para a segurança da sua utilização (Casiraghi et al., 2013; Sensebé et al., 2013; Y. Wang et al., 2012). Alguns estudos demonstraram que as MSC poderão exibir aberrações cromossómicas e induzir a transformação (Røsland et al., 2009; Rubio et al., 2005), contudo, mais recentemente, estes resultados foram

refutados e atribuídos à contaminação exógena por células tumorais (de la Fuente, Bernad, Garcia-Castro, Martin, & Cigudosa, 2010; Torsvik et al., 2010). Este desfecho ilustra mais uma vez a ausência de consistência entre protocolos de cultura utilizados por diferentes laboratórios. Surge desta forma a urgente necessidade de adoção de um método padronizado e do estabelecimento dos processos de acordo com as GMP, de modo a diminuir a variabilidade e assim possibilitar a transposição da produção laboratorial destas células para uma produção em grande escala.

Na Europa, as MSC são classificadas como Medicamentos de Terapia Avançada (ATMP) e a sua produção é regulada pelo Regulamento Europeu n.º 1394/2007, o qual incide sobre a autorização, supervisão e requisitos técnicos à sua realização (Sensebé et al., 2013). Assim, de entre os restantes, pode citar-se a necessidade de realização de controlos de eficácia, por exemplo por testes de potência, e controlos de identidade e pureza, por exemplo por análise dos marcadores de superfície por FACS. Os controlos de segurança são os mais importantes e contam com testes de esterilidade, de acordo com o estipulado na respetiva monografia da Farmacopeia Europeia, e testes de estabilidade genética, por cariotipagem, à qual se adiciona a Hibridação Genómica Comparativa (CGH) ou a Hibridação *in situ* Fluorescente (FISH) caso haja deteção de transformação maligna (Barkholt et al., 2013; Sensebé et al., 2013).

De um ponto de vista geral, não existem estudos que permitam incidir sobre o potencial efeito destas células a longo prazo. Embora a maioria dos ensaios tenha verificado uma ausência de transformação, nenhum apresentou o tempo e meios suficientes para que se formule uma hipótese definitiva. Desta forma, seria pertinente a instalação de programas de vigilância após transplante ou infusão das MSC em humanos, uma vez que, tal como aquando da libertação de um fármaco no mercado, as condições simuladas em laboratório em ambiente controlado não cobrem todas as possibilidades e variáveis do “mundo real”.

Importância das MSC na Engenharia Genética

Embora as MSC já apresentem tropismo e grande potencial clínico, a sua ação ainda pode ser potenciada e controlada com recurso a engenharia genética. Como demonstrado na Figura 6, é possível introduzir genes exógenos nas MSC, que posteriormente podem ser reintroduzidas no indivíduo (Santos et al., 2011). Estes promovem a estimulação da produção de proteínas específicas, quer por aumento da ação natural como por nova expressão pelas células nativas do produto de interesse (Ebrahimi & Lalvand, 2013; Porada & Almeida-Porada, 2010). Neste âmbito, o principal objetivo consiste no controlo

da taxa de libertação e da concentração do fármaco exclusivamente no tecido alvo, atravessando facilmente membranas mas evitando a distribuição por outros tecidos. Desta forma, evita as reações sistémicas que se revestem de particular importância na terapêutica oncológica com agentes citostáticos ou citotóxicos (Santos et al., 2011; Todd, Leroux, & Danilkovitch-miagkova, 2011). Esta abordagem, ao incitar as células do doente a produzir e direcionar a entrega do agente terapêutico, incide tanto a nível da farmacocinética como da farmacodinâmica do fármaco e permite a entrada do mesmo na célula quando o alvo é intracelular (Ebrahimi & Lalvand, 2013). As MSC podem ainda contribuir para a ação dos vetores transportadores do fármaco, uma vez que estes, por si só, não apresentam tropismo para os tecidos lesados e não conseguem escapar à resposta imunitária (Roisin M Dwyer et al., 2010).

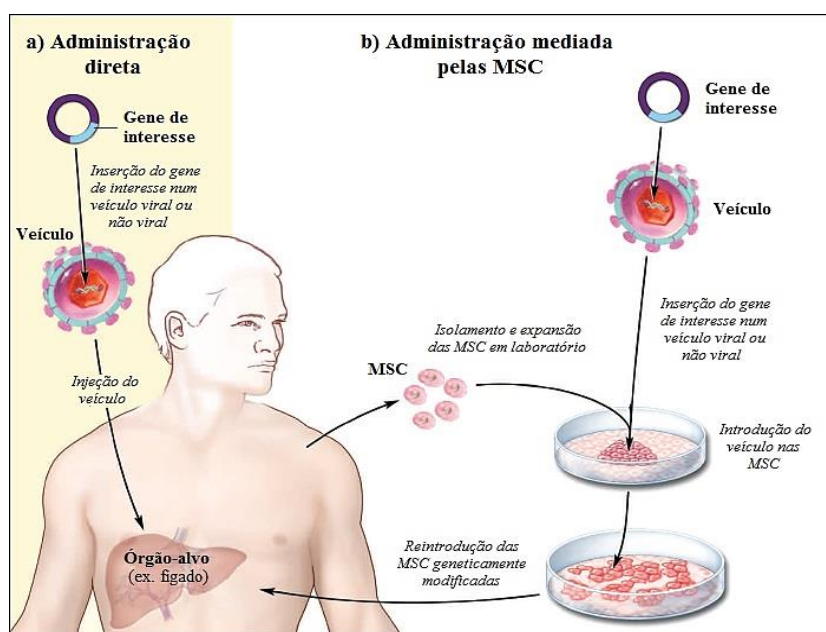


Figura 6: Administração de transgenes mediada pelas MSC. Ao contrário da administração direta de genes no doente (a), estes podem ser transferidos *ex vivo* nos veículos que são introduzidos nas MSC (b). Às MSC isoladas são transfectadas com os genes de interesse previamente inseridos num veículo viral ou não viral. Seguidamente as MSC geneticamente modificadas são seletivamente expandidas e então reintroduzidas no doente (Adaptado com modificações de Zwaka, T. P. (2009). 4. Use of Genetically Modified Stem Cells in Experimental Gene Therapies. *Stem Cell Information*. Consultado a 1 de setembro de 2014, disponível em http://stemcells.nih.gov/info/Regenerative_Medicine/Pages/2006Chapter4.aspx).

Após reintrodução das células no doente, o sistema pode adotar um mecanismo de transporte passivo ou ativo. O mecanismo passivo baseia-se no efeito de permeabilidade e retenção aumentadas (EPR) nos locais afetados, não estando associado a tecidos normais, e apresenta baixa especificidade, uma vez que a acumulação do fármaco está dependente da vascularização e angiogénese locais. O mecanismo ativo, embora também sofra transporte passivo inicialmente, atua através dos ligandos presentes na superfície

celular que reconhecem os recetores específicos no tecido-alvo. Assim, ao contrário do transporte passivo, o mecanismo ativo realiza um reconhecimento do recetor específico no tecido ou órgão alvo, uma vez que pode apresentar, por exemplo, anticorpos na sua superfície (Bamrungsap et al., 2012; Todd et al., 2011).

Os veículos utilizados podem ser classificados em virais e não virais. O transporte mediado por vírus, por exemplo adenovírus ou retrovírus, é bastante eficaz, porém apresenta baixa especificidade e exibe grande potencial de toxicidade, transformação oncogénica e indução de resposta imunitária (Ebrahimi & Lalvand, 2013; Nöth, Steinert, & Tuan, 2008). Adicionalmente, têm vindo a ser desenvolvidos vírus oncolíticos de replicação condicionada que sofrem replicação apenas em células tumorais, destruindo-as especificamente e, como tal, salvaguardando os tecidos normais por forma a evitar a toxicidade anteriormente referida. Outra estratégia a ser utilizada pauta-se pela administração de pró-fármacos por via sistémica em conjunto com a administração das MSC transportadoras do gene codificador da enzima conversora, verificando-se a conversão do produto inativo nos metabolitos tóxicos e a ação terapêutica apenas no local determinado (Roisin M Dwyer et al., 2010; Menon, Shi, & Carroll, 2009).

Embora a maioria dos estudos ainda se mantenha em fase *in vitro*, tem sido demonstrado interesse crescente quanto aos veículos não virais (Ebrahimi & Lalvand, 2013; Madeira et al., 2011; T. J. Myers et al., 2010). Estes são mais fáceis de obter, apresentam imunogenicidade mínima, demonstram um melhor perfil de segurança e apresentam um custo de produção inferior, todavia apresentam menor grau de transfeção e a sua expressão é transiente, ao contrário dos vetores virais. Estes compostos sofrem processo passivo, mas o acoplar de ligandos, que direcionem ao tecido alvo, ou de moléculas lipofílicas na sua superfície (ex. lipossomas, Figura 7), que melhorem as suas características físicas ou químicas e permitam a fuga ao sistema reticuloendotelial (Ebrahimi & Lalvand, 2013; Santos et al., 2011), promovem a especificidade e diminuem as potenciais reações adversas.

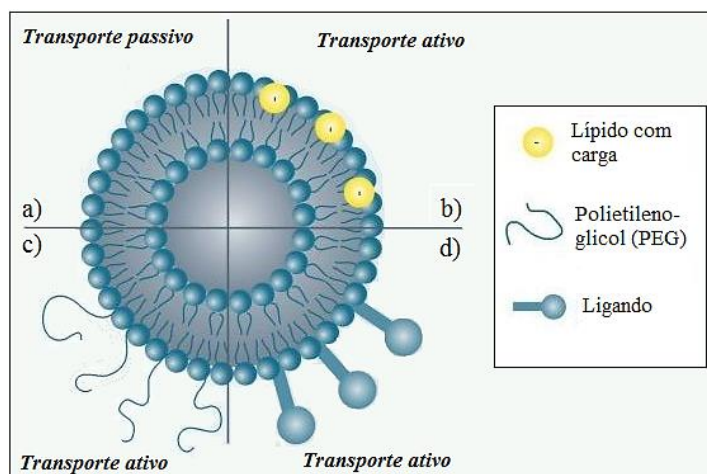


Figura 7: Tipo de transporte consoante as moléculas de superfície. Os veículos que sofrem somente transporte passivo são apenas constituídos pelos compostos naturalmente presentes na sua membrana (a), sendo a chegada ao tecido lesado mediada pelo efeito EPR. Por outro lado, o transporte ativo depende da modificação das moléculas presentes na superfície do veículo. A membrana poderá apresentar lípidos carregados (b) ou ligandos (d), que reconhecem recetores específicos nas membranas celulares do tecido alvo, ou ainda ser cobertas por polietilenoglicol (b), de forma a diminuir o seu reconhecimento e subsequente degradação. EPR, Permeabilidade e Retenção Aumentadas (Adaptado com modificações de Pinheiro, M., Lúcio, M., Lima, J. L. F. C., & Reis, S. (2011). Liposomes as drug delivery systems for the treatment of TB. *Nanomedicine*, 6(8), 1413–28. doi:10.2217/nmm.11.122).

O campo da engenharia genética ainda está por explorar, permanecendo em fase experimental. Existe um grande potencial para a resolução de problemas quanto à libertação controlada dos fármacos ao atingir o tecido alvo, à sua permanência no organismo e até mesmo à sua entrada no tecido. As questões de segurança são inegáveis e, atualmente, para ser passível de se aplicar a terapia génica, é necessário comprovar que esta não gera uma alteração da linhagem germinativa do indivíduo (Committee for Medicinal Products for Human Use, 2005; Lei n.º 12/2005 de 26 de Janeiro, 2005). As MSC são células somáticas e, como tal, não contribuem para esta linhagem sendo a sua utilização permitida. Contudo, a transfeção destas células não está livre de incertezas quanto às possíveis reações que os vetores poderão despoletar. Deste modo, quando este obstáculo for ultrapassado e a segurança desta abordagem alcançada, poderá deixar para segundo plano a administração inespecífica e não controlada de agentes terapêuticos no organismo.

Importância das MSC na Engenharia de Tecidos

Tendo em conta o elevado potencial de diferenciação das MSC, uma das aplicações mais promissoras destas células constitui a engenharia de tecidos, a qual se apoia em 3 vertentes: (1) células, geralmente de origem autóloga; (2) matriz, que fornece suporte à adesão, proliferação e função das células; e (3) sinais ou estímulos que mimetizem *in*

in vitro o microambiente existente *in vivo* para regeneração da forma ou função de um tecido ou órgão lesados (Hilfiker, Kasper, Hass, & Haverich, 2011; Mashayekhan, Hajiabbas, & Fallah, 2013). Desta forma, e como ilustrado na Figura 8, ao invés da introdução direta das células no local do tecido lesado, estas são semeadas em biomateriais antes de serem transplantadas. Estes biomateriais vão servir como esqueletos temporários que promovem a reorganização das células para formação de um tecido funcional (Dvir, Timko, Kohane, & Langer, 2011).

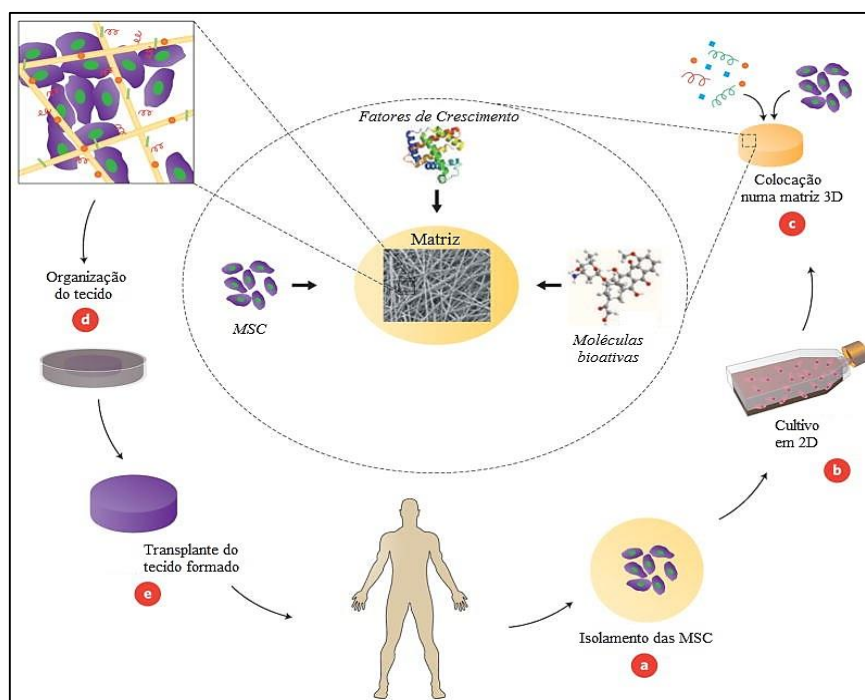


Figura 8: MSC na engenharia de tecidos. Após colheita e isolamento das MSC (a), estas são cultivadas *in vitro* em monocamada (2D) (b). A cultura de células tradicional não tem capacidade de mimetizar o microambiente biológico e, como tal, tem de se recorrer a biomateriais 3D (c), como substitutos da ECM, suplementados com fatores de crescimento e moléculas bioativas. Seguidamente, as células são colocadas em biorreatores (d) que disponibilizam as condições ótimas à formação do tecido que, quando terminado, é transplantado no doente (e) com intuito da sua integração e subsequente regeneração do órgão ou tecido alvo. ECM, Matriz Extracelular (Adaptado com modificações de Dvir et al., 2011).

Para que se forme um órgão ou tecido complexo é necessária a integração do tecido manipulado *ex vivo* com as células endoteliais e respetiva vascularização no hospedeiro (Naderi, Matin, & Bahrami, 2011). As matrizes dos biomateriais constituem estruturas tridimensionais sólidas que apresentam diversas propriedades, como a promoção da adesão de células e da deposição da matriz extracelular (ECM), a promoção do transporte de nutrientes e fatores reguladores, a manutenção de uma taxa de biodegradação semelhante à respetiva à regeneração tecidular, a ausência de toxicidade, entre outros (Dhandayuthapani, Yoshida, Maekawa, & Kumar, 2011; Naderi et al., 2011).

Como dito anteriormente, o fenótipo e função das MSC são regulados pela sinalização do microambiente circundante (Kshitiz et al., 2013). Deste modo, a escolha do biomaterial a utilizar é de extrema importância, estando a sua confecção dependente do tecido de interesse, uma vez que as suas propriedades físicas ou químicas influenciam as suas funções. Podem referir-se como exemplos de parâmetros a controlar a porosidade, que permita a penetração de nutrientes e vasos sanguíneos (Naderi et al., 2011), a elasticidade da matriz, que controla a diferenciação em linhagem neurogénica, miogénica ou osteogénica (Mashayekhan et al., 2013; Naderi et al., 2011; Satija et al., 2009), a presença de determinados grupos funcionais, que medeiam a diferenciação condrogénica ou osteogénica (Satija et al., 2009), ou a concentração de oxigénio, que controla a proliferação, diferenciação e sobrevivência (Mohyeldin, Garzón-Muvdi, & Quiñones-Hinojosa, 2010).

Em condições fisiológicas, estas células estão rodeadas pela ECM, uma matriz composta de proteínas insolúveis, como o colagénio ou fibrinogénio, e glicosaminoglicanos (GAG), como o ácido hialurónico. Adicionalmente, a ECM apresenta um reservatório de moléculas bioativas e fatores de crescimento, que medeiam o comportamento celular, e fornece suporte físico e força mecânica, necessários à formação e manutenção das estruturas tecidulares (Mashayekhan et al., 2013). Desta forma, para auxiliar a formação do tecido e mimetizar a sua estrutura e propriedades do local, podem ser utilizados polímeros de origem natural ou de origem sintética para servirem de matriz.

Os polímeros naturais, como o quitosano ou o Matrigel™ (mistura proteica de laminina, colagénio IV e sulfato de heparano de proteoglicanos), são constituídos pelos compostos da ECM. Estes são os biomateriais preferencialmente utilizados (Dhandayuthapani et al., 2011), uma vez que apresentam bioatividade, biocompatibilidade e interagem corretamente com as células, mimetizando em maior amplitude o nicho fisiológico. Por outro lado, os polímeros sintéticos, como o ácido poliglicólico (PGA) ou o ácido polilático (PLA), possuem como vantagens o maior tempo de prateleira, o menor custo e a possibilidade de produção em grande escala e de manipulação das suas propriedades consoante o necessário, contudo apresentando fraca biocompatibilidade e biodegradabilidade (Dhandayuthapani et al., 2011; Fu et al., 2011; Naderi et al., 2011). Ambos os tipos de polímeros podem ser adicionados a diferentes tipos de matrizes, como por exemplo, matrizes de hidrogel, matrizes microporosas, nanofibras (Dhandayuthapani et al., 2011; Mashayekhan et al., 2013), entre outras.

Embora o mecanismo de ação das MSC não passe primariamente pela sua plasticidade, esta sua propriedade revela elevado potencial no tratamento de doentes com defeito em algum tecido ou órgão. Esta abordagem poderá contornar a escassez de dadores compatíveis para o transplante tradicional, muitas vezes essencial à vida. Deste modo, a engenharia de tecidos, socorrendo-se ou não da engenharia genética, constitui uma área a apostar com vista ao desenvolvimento de novas terapêuticas clinicamente relevantes.

CAPÍTULO 3 – APLICAÇÕES CLÍNICAS

A diversidade de fenótipos que as hMSC podem assumir e as propriedades peculiares que as caracterizam traduziram-se na sua aplicação numa ampla diversidade de patologias, como exemplificado na Figura 9. A sua associação com biomateriais abriu portas à reconstrução de tecidos lesados, nomeadamente, em transplantes ou terapêuticas de substituição, enquanto a sua tranfeção permitiu a utilização no transporte de diversos agentes terapêuticos a tumores. Esta secção não tem como objetivo a revisão de todas as aplicações destas células mas apenas ilustrar alguns exemplos de patologias em conjunto com os progressos mais recentes da utilização das MSC.

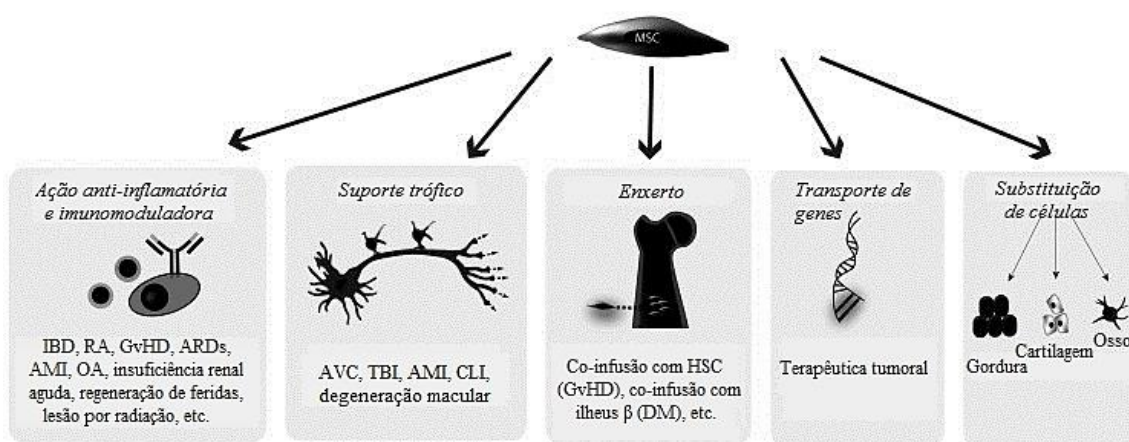


Figura 9: Aplicações clínicas das MSC. Por diversos mecanismos, as MSC podem ser utilizadas no tratamento da artrite reumatoide (RA), doença do enxerto contra o hospedeiro (GvHD), Diabetes Mellitus (DM), tumores, entre outros. IBD, doença inflamatória intestinal; ARDs, síndrome de dificuldade respiratória aguda; AMI, Enfarte Agudo do Miocárdio; OA, Osteoartrite; AVC, Acidente Vascular Cerebral; TBI, Lesão Cerebral Traumática; CLI, Isquemia Crítica dos Membros (Adaptado de Viswanathan, S., Keating, A., Deans, R., Hematti, P., Prockop, D., Stroncek, D. F., ... Rao, M. S. (2014). Soliciting strategies for developing cell-based reference materials to advance mesenchymal stromal cell research and clinical translation. *Stem Cells and Development*, 23(11), 1157–67. doi:10.1089/scd.2013.0591).

Diabetes Mellitus (DM)

A Diabetes Mellitus (DM) constitui uma doença metabólica caracterizada por hiperglicémia crónica. Esta é classificada em DM de tipo 1, em que a etiologia provém da deterioração autoimune progressiva das células β nos ilhéus de Langerhans pancreáticos, em DM de tipo 2, resultante da resistência periférica à insulina e fraca resposta secretória compensadora por fatores ambientais e genéticos, e em DM gestacional, caracterizada pela intolerância à glucose durante a gestação (American Diabetes Association, 2010).

O transplante alogénico de ilhéus pancreáticos de doadores cadáveres representa o único tratamento atualmente disponível para a DM, sendo aplicado numa minoria de doentes com DM de tipo 1 (Borg et al., 2014) e DM de tipo 2 (El-Badri & Ghoneim, 2013). Este método apresenta elevada perda celular após transplante, derivada da ausência de vascularização e ambiente de hipoxia (Borg et al., 2014; Kerby, Jones, Jones, & King, 2013), elevada taxa de rejeição do enxerto e necessidade de administração contínua de fármacos imunossupressores (Sordi & Piemonti, 2010), responsáveis por elevada morbidade e mortalidade. Desta forma, diversos grupos de investigadores testaram a utilização de MSC como células acessórias citoprotetoras dos ilhéus transplantados (Figura 10) como forma de prevenir a sua eliminação ou rejeição, prevenindo subsequentemente as complicações crónicas da DM. Os mecanismos por detrás da sua ação ainda estão por apurar, contudo, foi proposto que a imunossupressão representava um dos principais papéis na manutenção da normoglicémia (Ding et al., 2009). Estudos recentes verificaram que o co-transplante de ilhéus intactos com MSC, em modelo de rato com DM, permitiu a sua revascularização *in vivo* (C L Rackham et al., 2011) e, a par com o verificado *in vitro* (Chloe Louise Rackham et al., 2013), demonstrou a promoção da função normal dos ilhéus, nomeadamente, a estimulação da produção de insulina em resposta aos níveis elevados de glicose. Esta abordagem pode ser realizada tanto por via de administração sistémica como por via local, exibindo ambas função aumentada e apoptose diminuída nestes ratos (Borg et al., 2014).

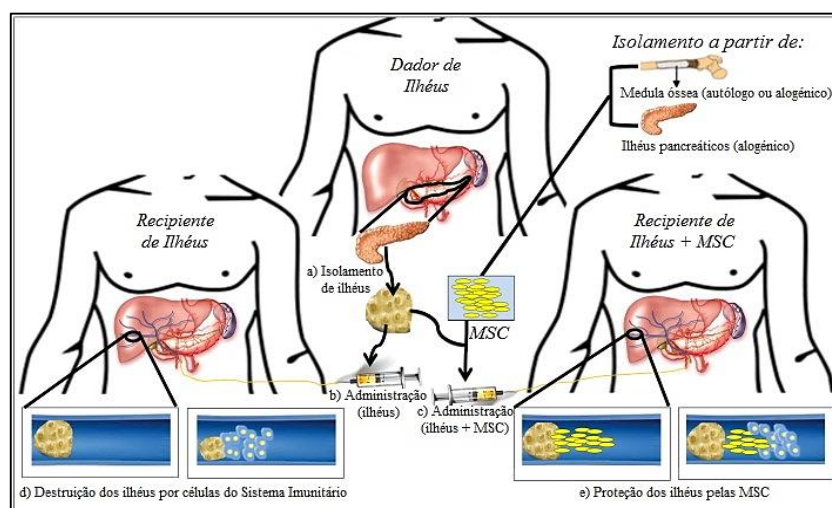


Figura 10: Modelo hipotético de transplante de ilhéus com e sem MSC. Os ilhéus de doadores singénicos ou alogénicos são previamente isolados em cultura (a), sendo seguidamente administrados por via sistémica ou local, acoplados (c) ou não (b) com MSC. O co-transplante (c) apresenta maior benefício relativamente ao transplante isolado de ilhéus, uma vez que as MSC assumem um papel protetor das células pela sua ação imunossupressora (e), impedindo a sua eliminação (d). Esta estratégia pode ainda ser acompanhada de biomateriais para maior controlo da morfologia e organização das células (Adaptado com modificações de El-Badri & Ghoneim, 2013).

A manutenção da morfologia normal dos ilhéus também representa um papel importante para que estes atinjam o alvo e exerçam as suas funções (C L Rackham et al., 2011). Diversas abordagens foram propostas, como a microencapsulação (Kerby et al., 2013), a encapsulação em matriz de seda com laminina ou colagénio IV (Davis et al., 2012) e a incorporação em matriz de Matrigel™ (Chloe L Rackham, Jones, & King, 2013). Estes materiais funcionariam como suporte para que as células não sofram uma perda inicial tão extensa e, quando adicionados de MSC, contribuam para as funções dos ilhéus quando enxertados (Davis et al., 2012; Kerby et al., 2013; C L Rackham et al., 2011).

Derivada da grande plasticidade das MSC, a abordagem *standard* para a potencial utilização destas células passa pela regeneração pancreática, a qual por sua vez, passa pela redução dos níveis de glicose no sangue por geração de novas células β . Estas células serão geradas quer pela diferenciação direta das MSC em células funcionalmente competentes *in vitro* e posterior transplante no doente (Gabr et al., 2013; Kadam, Muthyala, Nair, & Bhonde, 2010; Karaoz et al., 2013; Y. Zhang & Dou, 2014), como pela secreção de moléculas bioativas que controlem o microambiente do pâncreas (Si, Zhao, Hao, Fu, & Han, 2011) e promovam a sobrevivência, proliferação e diferenciação das células progenitoras em células β (Cao, Han, Zhao, & Liu, 2014; X. Gao et al., 2014).

Diversos estudos contradizem a tese de diferenciação, como é o caso do ensaio realizado por Ezquer e colaboradores (2012) que demonstraram que a sua ação se dá pela modificação do microambiente pancreático e pelo controlo do balanço Th1/Th2. Por outro lado, os resultados obtidos no estudo de Katuchova e colaboradores (2012) corroboram a presença de influência do microambiente pancreático, verificando assim que a diminuição plasmática de glucose estaria intimamente relacionada com a ação das MSC. Alternativamente, foram criadas abordagens que recorrem à engenharia genética para indução da diferenciação das MSC em células produtoras de insulina. A utilização de vetores que expressem o gene *pdx-1* (Boroujeni & Aleyasin, 2013; Nguyen et al., 2014; Pham et al., 2014; Rahmati, Alijani, & Kadivar, 2013), constituem abordagens que promovem a diferenciação de MSC em células produtoras de insulina *in vitro*. A expressão do fator de transcrição Pdx-1 está envolvida na diferenciação das células produtoras de insulina, sendo importante na regulação da expressão do gene da insulina e na formação e função das células β . Estas abordagens deverão ser estudadas de modo mais aprofundado antes da sua aplicação em ensaios pré-clínicos e clínicos devido aos elevados riscos de segurança que a sua transfeção representa.

Sendo a DM uma doença metabólica, a condição de hiperglicemia crónica origina complicações secundárias, nomeadamente a nível macrovascular, como Acidente Vascular Cerebral ou Enfarte Agudo do Miocárdio (AMI) por cardiomiopatia, e a nível microvascular, como cegueira por retinopatia, insuficiência renal por nefropatia ou o denominado “pé diabético” por neuropatia, entre outros (Davey, Patil, O’Loughlin, & O’Brien, 2014). Com base em diversos estudos, a secreção de fatores bioativos com função parácrina é transversal às ações das MSC nestas patologias, verificando-se que estas, de facto, atingem a lesão por fenómeno de *homing*, contudo não enxertam no local. A título de exemplo, o estudo de Z. Yang, Li, Yan, Dong e Zhao (2010), ao contrário do que foi verificado no caso de nefropatia, demonstrou a capacidade destas células em atingir a retina e se diferenciar em fotorreceptores e astrócitos quando administrados por via intravenosa. Também Scalinci e colaboradores (2011), por administração intravítrea, demonstraram neuroprotecção na retinopatia diabética. Todavia, embora as MSC apresentam grande potencial no tratamento da retinopatia, ainda estão longe de ser aplicadas na prática clínica. A Tabela B1 em anexo compila os estudos pré-clínicos mais recentes que se baseiam no uso das MSC nas diferentes complicações.

Nos últimos anos têm sido realizados diversos estudos em animais, contudo, poucos ensaios clínicos têm sido executados e ainda num pequeno número de participantes. Destes últimos, pode salientar-se um ensaio piloto realizado em 2011, em que o transplante de hMSC derivadas da placenta diminuiu a dose necessária de insulina para controlar a DM de tipo 2 em 10 doentes (Jiang et al., 2011). Ensaios subsequentes demonstraram que o transplante de hMSC representa um processo seguro que restaura a função dos ilhéus β (X. Liu et al., 2014), proporcionando um maior controlo metabólico da DM a longo prazo (Hu et al., 2013). A par com os estudos em animais, estes ensaios clínicos constituem um ponto de partida para contornar os efeitos desta doença que atualmente não tem cura. Porém, primeiramente terão de ser tomadas diversas precauções, uma vez que não é possível transpor diretamente os resultados dos estudos em roedores para humanos.

Doença do Enxerto contra o Hospedeiro (GvHD)

As MSC surgem como alternativas promissoras à utilização de corticosteroides (R. P. Herrmann & Sturm, 2014) no tratamento e profilaxia da rejeição de órgãos após transplante alogénico de HSC, devido às suas propriedades imunomoduladoras

específicas (Figura 11), recorrendo-se à expansão *ex vivo* destas células ou ao seu co-transplante com as HSC.

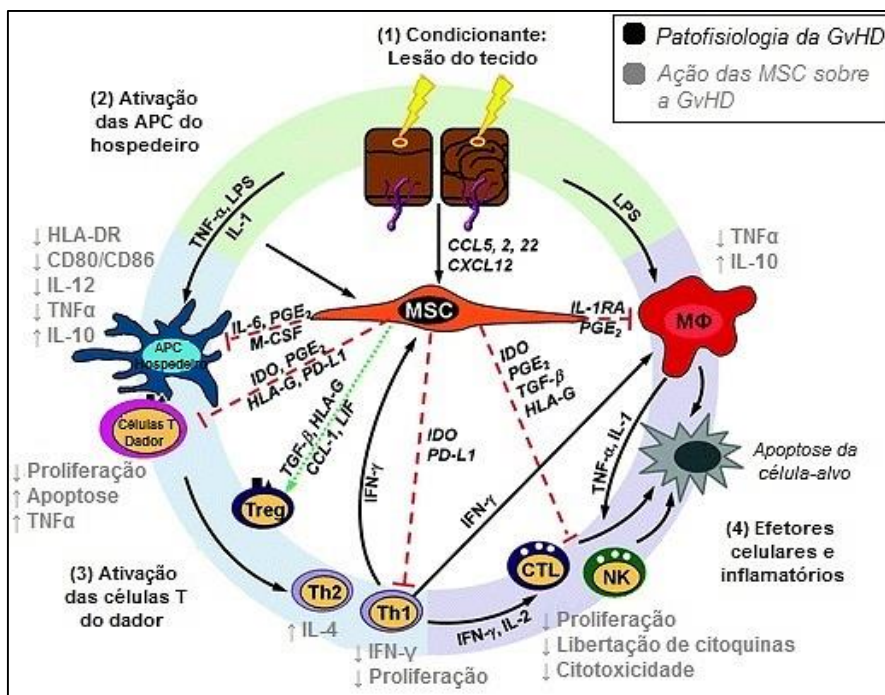


Figura 11: Mecanismo de ação das MSC na GvHD. As MSC interagem com a maioria das células envolvidas na iniciação da GvHD, como as células T, CTL e NK. Inicialmente, as MSC são atraídas ao local lesado devido ao microambiente inflamatório gerado (1) e, quando ativadas por IFN- γ e TNF α , modulam todas as fases de inflamação (1, 2, 3 e 4) por libertação de fatores imunossupressores, como PGE2, IDO, TGF- β , entre outros. Th1, Células T1 auxiliares; Th2, Células T2 auxiliares; Treg, Células T Reguladoras; CTL, Linfócitos T Citotóxicos; M ϕ , Macrófagos (Adaptado com modificações de Weyand, Dominici, Hass, Jacobs & Kasper, 2013).

Os ensaios pré-clínicos em modelos animais com GvHD apresentam resultados contraditórios, nomeadamente em modelos murinos entre si e entre estes e modelos caninos. Christensen e colaboradores (2010) e Tobin, Healy, English e Mahon (2013) verificaram que as MSC apenas detêm uma função transitória, em que a dose e o momento de administração afetam sobretudo o grau de desenvolvimento da GvHD. Deste modo, a administração de uma menor dose no estado inicial é mais eficiente que a administração de uma dose superior em estádios mais avançados (Ball et al., 2013; Christensen et al., 2010; Tobin et al., 2013). Contudo, e provavelmente derivada da utilização de diferentes fontes das células e tempo de administração, um estudo publicado posteriormente não conseguiu prevenir a GvHD mesmo após infusões repetidas (Bruck et al., 2013). Este estudo foi contrariado por outro mais recente, realizado por Jang e colaboradores (2014), igualmente em modelo humanizado de rato com xeno-enxerto. Este ensaio veio estabelecer intervalos ótimos para a ação das hMSC derivadas do cordão umbilical (hUC- MSC) como profiláticas, quando administradas repetidamente, ou terapêuticas, quando

injetadas tanto uma única vez como repetidamente. Deste modo, pode dizer-se que o estudo e utilização das MSC envolvem maioritariamente a administração repetida e, como tal, a criopreservação terá de ser parte integrante destes procedimentos. Embora Holubova, Lysak, Vlas, Vannucci e Jindra (2014) tenham verificado que após descongelamento e subsequente expansão em cultura não se verificava qualquer modificação da capacidade proliferativa ou imunomoduladora das MSC, existem resultados contraditórios a este nível. Alguns estudos referem-se à criopreservação de hMSC como um processo que impede a inibição da proliferação das células T *in vitro* (Moll et al., 2014), o que poderá ser justificado pelo choque térmico que sofrem. Este choque provocaria uma resposta inadequada da IDO à estimulação por IFN- γ nas 24 horas seguintes à sua descongelação (François et al., 2012). Este facto veio pôr em causa ensaios que se tenham baseado nesta técnica, servindo de justificação para a falha de diversos ensaios clínicos (Davies et al., 2014; “First US Study”, 2014).

A grande maioria dos ensaios pré-clínicos baseia-se em modelos murinos, contudo, alguns estudos socorrem-se de modelos caninos. Este modelo apresenta capacidade imunossupressora e fenótipo semelhantes às MSC de humanos (Kornblit, Leisenring, Santos, Storb, & Sandmaier, 2013), aproximando-se da realidade e como tal constituindo modelos valiosos para estes ensaios. Kornblit e colaboradores (2013) demonstraram a segurança da co-administração de MSC autólogas ou alogénicas com HSC de antígeno leucocitário canino (DLA) idêntico em modelo canino, estabelecendo-o como plataforma para estudos posteriores. Todavia, o enxerto das MSC derivadas da medula óssea (BM-MSC) em cães submetidos a transplante haploidêntico (Mielcarek et al., 2011) e DLA idêntico (W. S. Lee et al., 2011) de medula óssea não preveniu o desenvolvimento de GvHD, resultado algo curioso e inesperado.

Ao contrário do que acontece em modelos murinos, quando as MSC são injetadas em humanos não despoletam reação imunológica e, como tal, detêm a possibilidade de ser administradas MSC de origem alogénica (Sundin et al., 2009). Contudo, num estudo comparador entre dois grupos de doentes adultos com GvHD refratária aos corticosteroides, tratados com MSC e não tratados com estas células no mesmo intervalo de tempo (2002-2006), não se verificaram vantagens a longo prazo. Embora o grupo tratado tenha respondido melhor ao tratamento e como tal apresentado menor mortalidade inicial, acabou por ser sujeito a um maior risco de infeção, o que provocou um aumento

posterior da mortalidade, maioritariamente devido a infeções fúngicas invasivas (Remberger & Ringdén, 2012).

Num estudo retrospectivo realizado em 50 crianças submetidas a transplante alogénico de HSC verificou-se uma maior expressão de células CD4⁺CD25⁺CD127⁻Treg na GvHD aguda nos estádios 0 ou 1 e menor nos estádios 2 a 4, o que providencia um potencial meio de monitorização clínica e profilaxia da GvHD (Z. Fang et al., 2013). Adicionalmente, uma abordagem alternativa consiste na infusão sistémica de MSC com células Treg, testada em modelo murino com GvHD, onde se verificou um aumento da sobrevivência a longo termo a par com a diminuição das manifestações clínicas, potencialmente derivados, como subsequente verificação *in vitro*, do aumento das células Th2 e Treg (Lim et al., 2014), características de um ambiente de imunossupressão.

Outro estudo retrospectivo numa amostra inferior (13 crianças) verificou que as remissões seriam possíveis, porém, teriam de ser administradas múltiplas infusões de MSC num estágio mais inicial da doença (Ball et al., 2013). Os principais resultados dos ensaios clínicos relativos ao tratamento de GvHD aguda e GvHD crónica estão representados na Tabela B2 em anexo, contudo não é possível fazer comparações entre ensaios, uma vez que estes apresentam variação de dadores, das condições de cultura, imunogenicidade (Galipeau, 2013), entre outros. Em Portugal, Miranda e colaboradores, após expansão *ex vivo* de BM-MSK HLA idênticas, trataram com sucesso um doente com GvHD aguda de grau III, permitindo ainda a descontinuação dos corticosteroides. Estes resultados são bastante animadores, contudo, ainda insuficientes.

A co-infusão de MSC, como forma profilática da GvHD, também é parte integrante de alguns ensaios clínicos, tanto em crianças (Bernardo et al., 2011) como em adultos (Baron et al., 2010; Kuzmina et al., 2012; Wu et al., 2013; Xiong et al., 2014). Neste sentido foi verificada a sua segurança (Baron et al., 2010) e comprovada a diminuição de incidência de GvHD após transplante (Xiong et al., 2014), principalmente em GvHD de estágio III a IV (Baron et al., 2010; Bernardo et al., 2011; Kuzmina et al., 2012; Wu et al., 2013). No entanto, estes estudos baseiam-se numa amostra diminuta de doentes e como tal ainda não são representativos.

No âmbito desta patologia, Prochymal®, o primeiro produto pré-fabricado de MSC indiferenciadas derivadas da medula óssea de dadores adultos jovens saudáveis, está atualmente em ensaios clínicos de fase III (“Mesoblast”, 2014; “Prochymal®”, s.d.). Foi anteriormente verificado que a resposta a este produto acoplado a corticosteroides é

independente da dose (Kebriaei et al., 2009) e que por si só não despoletava nenhuma reação adversa (Prasad et al., 2011). Demonstrou assim ser eficaz e bem tolerado no tratamento de GvHD aguda refratária a corticosteroides, apresentando elevado potencial de aplicação na prática clínica.

Alternativas mais sofisticadas consistem na associação das MSC a biomateriais ou vetores para o seu transporte e subsequente efeito. Ankrum, Dastidar, Ong, Levy e Karp (2014) propuseram a associação entre um corticosteroide, como a budesonida, e as MSC. Este conjunto é carregado nas micropartículas de ácido poli(D,L-láctico-co-glicólico) (PLGA), para controlo completo, e a budesonida é libertada progressivamente. Por sua vez, esta aumenta a atividade (5x) do IFN- γ e estimula subsequentemente a libertação de IDO pelas MSC, despoletando a imunossupressão. Desta forma, este sistema permite a administração de um menor número de células, um maior impacto no microambiente e uma maior tolerância imunitária. Porém, um pequeno estudo levado a cabo por Nevruz e colaboradores (2013) demonstra o risco aumentado de morte em ratos mediante a associação entre MSC e imunossuppressores, uma vez que podem levar a imunossupressão excessiva. Como tal, terão de ser realizados mais estudos de modo a verificar a eficácia e segurança deste sistema que se pensou contornar os problemas da terapêutica convencional.

Os órgãos linfoides funcionam como nicho para a geração da resposta ou tolerância imunitária e, após administração intravenosa das MSC, estas raramente migram para estes órgãos. Como tal, estas células foram transfetadas para sobreexpressarem o gene CCR7 em modelo murino. Este recetor permite a relocação das MSC na proximidade dos linfócitos T, inibindo-os fortemente, apresentando como vantagem adicional a ausência de um efeito semelhante nas células NK, mediadoras do efeito antitumoral de enxerto contra leucemia (GvL) (H. Li et al., 2014). Outras estratégias como a sobreexpressão de CXCR4 têm vindo a ser estudadas, demonstrando resultados promissores na migração seletiva destas células aos locais de lesão, precavendo a sua ação nos restantes (W. Chen et al., 2012).

Sendo a GvHD derivada de ações inflamatórias, as MSC constituiriam um excelente meio de tratamento de acordo com os seus potenciais mecanismos anti-inflamatórios e imunossuppressores. Todavia, embora os ensaios clínicos neste campo já sejam amplamente realizados, os resultados inconsistentes transmitem a necessidade de melhores estudos pré-clínicos.

Doenças Ósseas e Articulares

No campo da reumatologia, o objetivo final da engenharia de tecidos define-se pelo uso de biomateriais e matrizes biocompatíveis e pela expressão, pelas MSC, de fatores seletivos de diferenciação, como TGF- β ou proteínas morfogenéticas do osso (BMP) (Djouad, Bouffi, Ghannam, Noël, & Jorgensen, 2009). Contudo, tal como nas restantes patologias, existe controvérsia quanto ao mecanismo de ação da regeneração óssea. Recentemente, Linero e Chaparro (2014) demonstraram, em defeitos ósseos da mandíbula de coelho, que a aplicação de hMSC ou a aplicação isolada de fatores parácrinos resultam num grau de regeneração semelhante. Adicionalmente, e tal como verificado na sua aplicação num modelo de lesão do menisco em ratos (Horie et al., 2012), as MSC não permanecem no local da lesão em grande número, ilustrando a sua potencial ação a nível parácrino ao invés de diferenciativo.

Atualmente, o enxerto autólogo de osso é a terapêutica de eleição no tratamento de defeitos ósseos (Djouad et al., 2009). Todavia, tal como previamente demonstrado *in vitro* (Oliveira, Amaral, Barbosa, & Teixeira, 2009), Bahney e colaboradores (2014) propuseram que a regeneração óssea não passava pela indução direta da osteogénese mas sim pela utilização de cartilagem como intermediário para promoção da regeneração óssea endocondral *in vivo*. Recentemente, em ensaios no modelo de defeito do osso femoral em ratos, a pré-diferenciação das MSC em condrócitos *in vitro*, com seu subsequente transplante em forma de *pellet* (van der Stok et al., 2014) ou numa matriz de PLGA (Harada et al., 2014), atingiu elevada reprodutibilidade e melhores resultados relativamente aos métodos anteriores. Contudo, estas abordagens apenas foram testadas em roedores e, como tal, pecam pela ausência de ensaios em humanos.

Com o receio de reações adversas, são geralmente utilizadas MSC de origem autóloga, porém, recentemente, dois grupos de investigadores testaram a utilização de MSC derivadas do tecido adiposo (AT-MSC) alogénicas, associadas a uma matriz de coral e a uma matriz desmineralizada, num modelo canino de defeito craniano (G. Liu et al., 2013) e num modelo de coelho com defeito do rádio (Gu et al., 2014) respetivamente, e verificaram que, sem recorrer a terapêutica imunossupressora, as MSC não despoletam qualquer reação imunitária e a sua resposta assemelha-se à das AT-MSC de origem autóloga.

Devido à sua capacidade de *homing*, as MSC podem ser transportadoras de moléculas bioativas que controlem a diferenciação em linhagens específicas para regeneração do

tecido lesado (Figura 12). A transdução das MSC com SOX9 resultou na diferenciação condrogênica destas células *in vitro* a par com a formação de ECM *in vivo* num modelo da doença degenerativa do disco intervertebral em coelhos (W. Sun et al., 2014). Foi também criado um veículo retroviral para transportar o fator de crescimento do tipo insulina 1 (IGF-1) (Granero-Moltó et al., 2011), uma molécula estimuladora da mineralização e crescimento ósseos. Seguidamente, uma vez que estes retrovírus são perigosos, desenvolveu-se a administração subcutânea sistémica que, sendo mais segura, apresentou resultados semelhantes a nível do volume do calo ósseo, induzindo a formação óssea principalmente por ossificação endocondral (T. Myers et al., 2012). Outros autores também verificaram a associação benéfica entre as MSC e BMP-2 (Kumar, Nagy, & Ponnazhagan, 2010) em conjunto com VEGF (Kumar, Wan, Ramaswamy, Clemens, & Ponnazhagan, 2010). Nestes estudos, usando o rato como modelo, obtiveram-se resultados promissores no que diz respeito ao crescimento ósseo e, quando associado a VEGF, na neoangiogénese à volta da zona lesada. Por último, estudos revelam que a eritropoietina estimula a libertação destes dois últimos fatores e, como tal, a sua sobreexpressão em ratos com defeito ósseo promove efetivamente a formação óssea (C. Li et al., 2014).

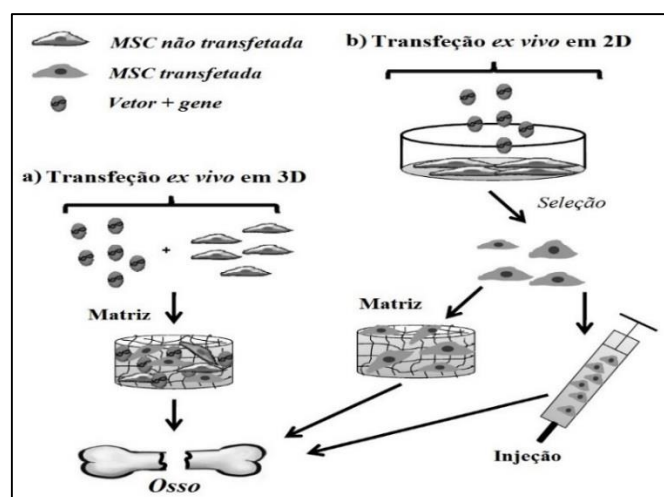


Figura 12: Transfeção *ex vivo* de MSC para engenharia do osso. Para indução da regeneração óssea, as MSC podem ser implantadas logo após transfeção direta em biomateriais (a) ou transfetadas em cultura estática de células com posterior implantação no organismo, associadas ou não a uma matriz (b) (Adaptado com modificações de Santos, J. L., Pandita, D., Rodrigues, J., Pêgo, A. P., Granja, P. L., & Tomás, H. (2011). Non-viral gene delivery to mesenchymal stem cells: methods, strategies and application in bone tissue engineering and regeneration. *Current Gene Therapy*, 11(1), 46–57. doi: 10.2174/156652311794520102).

Tal como no osso, o transplante autólogo de cartilagem é o método *gold standard* para a terapêutica de defeitos na cartilagem, contudo esta técnica apresenta algumas limitações,

uma vez que os condrócitos geralmente estão presentes em pequena quantidade na cartilagem articular. Desta forma, diversos autores referem-se à co-cultura e co-implantação de MSC com condrócitos articulares associados a biomateriais como uma mais-valia terapêutica. Esta abordagem permite uma maior estabilidade em condições adversas, menor necessidade de fatores estimuladores da condrogênese, como TGF- β 3, e menor número de condrócitos para a reparação, tanto *in vitro* (Meretoja, Dahlin, Kasper, & Mikos, 2012; Meretoja, Dahlin, Wright, Kasper, & Mikos, 2013) como *in vivo* em modelo de rato (Dahlin et al., 2014).

Nas doenças osteoarticulares, a principal via de administração utilizada é a intra-articular. Esta demonstrou ser segura e aplicável em ratos, permitindo ainda, após administração de AT-MSC, a permanência na articulação até 6 meses (Toupet et al., 2013). Adicionalmente, também se verificou a diminuição da inflamação com reparação da cartilagem em modelos de osteoartrite em coelhos (Desando et al., 2013) e artrite reumatoide em ratinhos (Kehoe, Cartwright, Askari, El Haj, & Middleton, 2014).

Tal como nas abordagens anteriores, desenvolveu-se a utilização de matrizes em combinação com MSC para reparar defeitos nas cartilagens. Foram avaliados, em ensaios pré-clínicos, biomateriais sintéticos como o poli(L-láctico-co- ϵ -caprolactona) (PLCL) (Xie et al., 2010) e naturais como o ácido hialurónico (Chung et al., 2014) ou a fibroína de seda (Deng et al., 2013) como transportadores das MSC para regeneração da cartilagem. Adicionalmente, Qi, Yu, Zhu, Zhou e Wu (2013), num estudo pré-clínico, conceberam um hidrogel de quitosano e álcool polivinílico com MSC que sobreexpressam TGF- β 1, sendo este administrado por injeção, o que diminui a necessidade de cirurgia e probabilidade de rejeição. Desta forma, tanto a simples utilização de biomateriais por si só como o acoplar com engenharia genética constituem abordagens promissoras para esta patologia.

A microfratura constitui um processo cirúrgico muito utilizado nestas patologias, uma vez que é pouco invasivo e de passo único, porém apresenta resultados questionáveis (H. Huang et al., 2014). Em 2006, Stone e colaboradores realizaram um estudo prospetivo de 2 a 12 anos após cirurgia e verificaram uma melhoria significativa da dor e função das articulações em doentes submetidos ao enxerto de cartilagem articular em pasta (Stone, Walgenbach, Freyer, Turek, & Speer, 2006). Recentemente, foi assim estudada a associação entre a técnica de microfratura e a implantação do enxerto de células em pasta (Figura 13). Este estudo revelou melhor integração da cartilagem e estimulação da

diferenciação das células estaminais da medula óssea, diminuindo ainda a zona acelular relativamente à técnica de microfratura por si só, tanto em lesões artríticas como traumáticas (Xing et al., 2013). Adicionalmente, na adoção do método de microfratura, é necessário primeiramente um suporte mecânico durante a formação da nova cartilagem, uma vez que, embora o coágulo formado se vá maturando com o tempo, é vulnerável ao *stress* na articulação e sensível aos movimentos do fluido sinovial. H. Huang e colaboradores (2014) aperfeiçoaram a abordagem anteriormente referida por associação das MSC a um biomaterial bi-fásico numa matriz de hidrogel, a qual mantém as células no coágulo aquando da transição solução-gel, acoplada a uma matriz óssea demineralizada, que fornece proteção mecânica com subsequente permissão da formação e maturação da neocartilagem. Deste modo, obtiveram maior organização da superfície e maior retenção e integração das células no coágulo, permitindo a condrogénese.

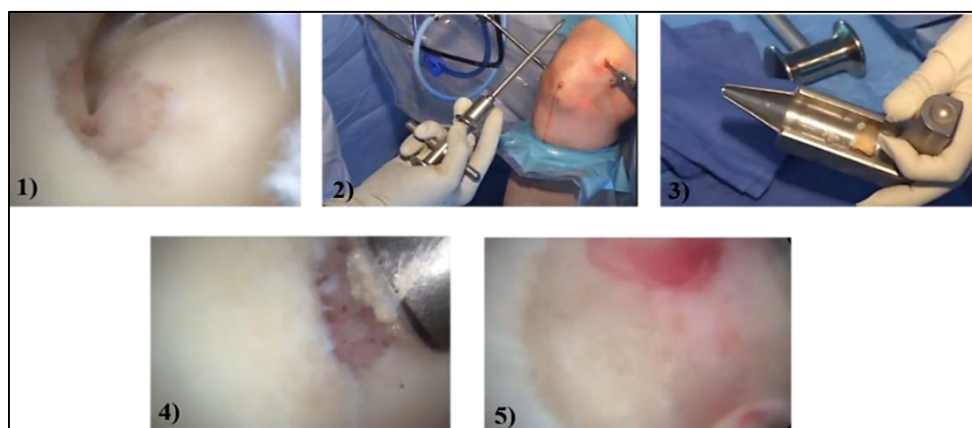


Figura 13: Procedimento de enxerto de pasta osteocondral. A técnica de microfratura (1) baseia-se na recolha do tecido osteocondral do nó intercondilar (2) que possui MSC passíveis de se diferenciar em condrócitos quando estimuladas. O osso e cartilagem são esmagados até formar uma pasta (3), a qual é inserida novamente na lesão. O sangramento posterior permitirá a formação do coágulo, fator que possibilita a diferenciação das MSC, com subsequente estimulação do crescimento de cartilagem hialina (Adaptado de The Stone Clinic. (2008). *Articular Cartilage Paste Graft Surgical Technique* [vídeo]. Consultado em 13 de setembro de 2014, disponível em <http://www.stoneclinic.com/stem-cell-cartilage-study>).

A *Osteogenesis Imperfecta* é uma doença genética rara proveniente de uma mutação dominante nos genes que codificam para o colagénio I (Yi Liu, Wu, Zhu, & Han, 2014). Em modelo murino, a administração intrauterina de MSC de sangue fetal levou à sua diferenciação em osteoblastos maduros, com subsequente expressão normal de colagénio, diminuição significativa da fragilidade óssea e aumento da integridade mecânica do osso (Vanleene et al., 2011). Pelo contrário, em crianças com esta patologia não se revelou *homing* ou enxerto das MSC no osso nem uma contribuição para a formação da matriz óssea de colagénio, tendo sido proposto que a sua ação passará, mais uma vez, pela

secreção de fatores parácrinos que estimulam o crescimento ósseo nestas crianças (Otsuru et al., 2012). Neste caso podem salientar-se estratégias como a preparação prévia das MSC de sangue fetal com SDF-1 α para que, no organismo, aumentem a fração de células CXCR4⁺ permitindo o *homing* e enxerto em ossos não lesados. Desta forma, haverá a prevenção da ocorrência de fraturas quando administradas no período pré-natal ou a formação óssea durante o desenvolvimento embrionário (Jones et al., 2012). Estas abordagens devem assim ser aprofundadas com a esperança de encontrar a primeira cura para esta doença.

A artrite reumatoide é uma doença autoimune de inflamação crónica, em que há a infiltração de macrófagos e neutrófilos nas articulações com a sua subsequente destruição (Kehoe et al., 2014). As MSC atuam principalmente pela inibição de TNF α , IL-1 e IFN- γ e estimulação de IL-10 (Greish et al., 2012), induzindo a aquisição do fenótipo imunossupressor nas células T (Yanying Liu et al., 2010). Por meio de engenharia genética, a injeção intramuscular de MSC que produzem o recetor solúvel do TNF (sTNFR), o qual se liga ao TNF α e o sequestra, diminuiu a concentração de TNF α circulante e conseqüentemente a inflamação, mais rapidamente que a forma biológica comercial (etanercept). Este método apresenta ainda como vantagem a administração trimestral ou semestral, ao invés da administração em dias alternados, característica da posologia destes fármacos biológicos (L. N. Liu et al., 2013).

Ao contrário das doenças referidas anteriormente, a reumatologia tiraria vantagem das MSC principalmente pela sua ação regenerativa, nomeadamente pela sua capacidade de diferenciação e enxerto locais. Contudo, estas propriedades parecem não ser exibidas em grande extensão e, como tal, a utilização destas células não passará pela sua aplicação direta mas sim pela associação com técnicas mais tradicionais ou mesmo técnicas mais recentes no âmbito das engenharias genética e de tecidos.

Doenças Cardiovasculares

A doença das artérias coronárias advém da acumulação progressiva de ateromas nas paredes destas artérias, levando a isquemia do miocárdio, a qual por sua vez pode causar angina de peito, AMI, morte súbita, entre outros (“Overview of Coronary Artery Disease” s.d.). Logo após AMI há a desorganização metabólica, hipoxia e inflamação do miocárdio, que originam apoptose e necrose. Na semana seguinte, já está estabelecida a lesão irreversível de isquemia-reperfusão por compensação, deixando de existir

inflamação e iniciando-se a deposição de colagénio e remodelação miocárdica remota (Richardson et al., 2014).

As MSC detêm a capacidade de regenerar e reparar o tecido após enfarte, ao contrário da terapêutica corrente, que apenas atrasa mas não evita a remodelação (Matar & Chong, 2014). Diversos mecanismos têm sido propostos para a sua ação no tratamento das doenças cardiovasculares, como se pode verificar na Figura 14. Em coelhos, as MSC demonstraram atuar como células miogénicas e vasculogénicas, pela sua capacidade de diferenciação no miocárdio, e como indutores angiogénicos, por estimulação da neovascularização por libertação de fatores parácrinos como VEGF e angiopoietina 2 (Ang-2) (Rahbarghazi et al., 2014). Modelos suínos pós-AMI suportaram a diferenciação direta das MSC em cardiomiócitos e vasos sanguíneos, promovendo a regeneração do miocárdio por enxerto local nas primeiras 24 horas após transplante. Seguidamente, exibiram capacidade de estimulação, por interação célula-célula, do recrutamento, expansão e diferenciação das células estaminais cardíacas (CSC) endógenas em cardiomiócitos (Hatzistergos et al., 2010). Por outro lado, para além da ausência de diferenciação das MSC em modelo de rato (Siegel et al., 2012), estudos em porco miniatura com AMI verificaram que as BM-MSc implantadas no local de enfarte apresentaram poucas células com diferenciação miogénica. Foi assim proposto que esta característica não estaria na origem da melhoria da sua função, mas sim a estimulação da expressão de fatores angiogénicos e anti-inflamatórios. Estes diminuem a resposta inflamatória, *stress* oxidativo e apoptose e estimulam a ativação e proliferação das células cardíacas residentes. Subsequentemente, o tamanho da lesão será diminuído, a grossura e função da parede no ventrículo esquerdo aumentadas e a remodelação após AMI atenuada (Fan et al., 2014; Santos Nascimento et al., 2014). Alternativamente, para contrariar a capacidade endógena limitada de regeneração do tecido cardíaco, foram implantadas MSC e CSC humanas em associação que, após injeção intramiocárdial após AMI, demonstraram uma maior redução da remodelação e recuperação substancial da função sistólica e diastólica em suínos (Williams et al., 2013). A inconsistência dos resultados entre diversos ensaios pré-clínicos pode ser justificada com base nas diferenças quanto ao protocolo de isolamento e reprogramação (Matar & Chong, 2014) destas células, permanecendo em aberto qual o mecanismo correto.

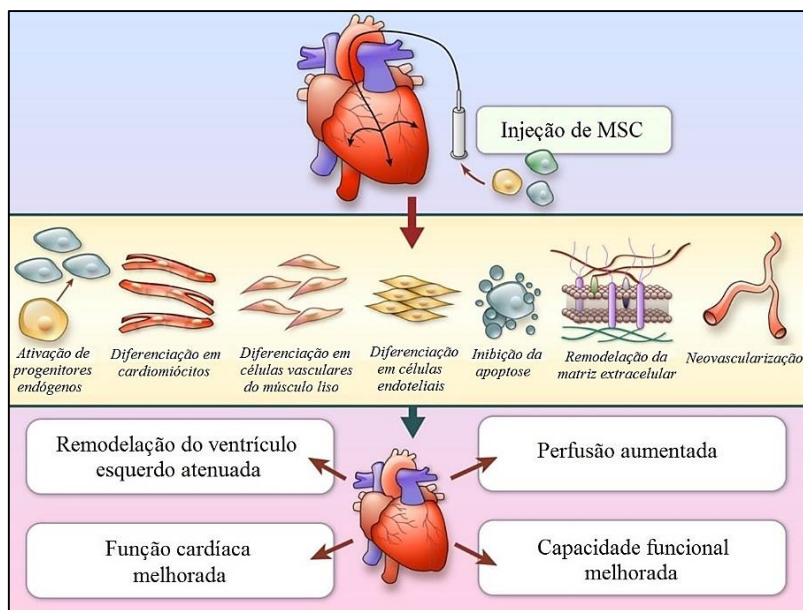


Figura 14: Potenciais mecanismos de ação cardíaca das MSC. A injeção de MSC após enfarte reduz a remodelação cardíaca compensatória, aumenta a perfusão e melhora a função e capacidade cardíacas por meio da ativação de percursos endógenos, da diferenciação em cardiomiócitos, células vasculares ou endoteliais, da neoangiogênese, da inibição da apoptose ou da modulação da matriz extracelular (Adaptado com modificações de Sanganalmath, S. K., & Bolli, R. (2013). Cell therapy for heart failure: a comprehensive overview of experimental and clinical studies, current challenges, and future directions. *Circulation Research*, 113(6), 810–34. doi:10.1161/CIRCRESAHA.113.300219).

O momento de administração das MSC e a frequência a que esta ocorre são fatores preponderantes ao efeito requerido. A administração imediatamente após AMI estimula a regeneração das zonas com enfarte, enquanto a administração retardada (uma semana após AMI) parece incidir principalmente sobre as zonas circundantes ao enfarte (Richardson et al., 2013). Podem assim associar-se estas duas estratégias para efeito sinérgico, em que a injeção múltipla apresentará mais vantagens relativamente à singular ou dupla, particularmente por também atingir tecidos remotos após isolamento prospectivo e pré-condicionamento das MSC a hipoxia (Richardson et al., 2014).

Nesta patologia, pode dar-se especial relevância a quatro ensaios clínicos. O POSEIDON, que compara as MSC de origem autóloga e alogénica, apresentou como principal objetivo verificar a segurança da aplicação de MSC alogénicas e a sua possibilidade de utilização *off-the-shelf* (Hare et al., 2012). O TAC-HFT comparou as MSC com as células mononucleares da medula óssea (BMC). Este ensaio verificou um aumento da função miocárdica local por diminuição do tamanho do enfarte (Heldman et al., 2014) e permitiu originar o produto CardiALLO™ (BioCardia, Inc) de utilização *off-the-shelf*. O SEED-MS, para AMI, focou-se na segurança da administração intracoronária de MSC (J.-W. Lee et al., 2014) e o C-CURE utilizou uma nova abordagem para a diferenciação das

MSC em células estaminais cardiopoéticas, propondo a sua utilização ao invés da recolha de tecido cardíaco (Bartunek et al., 2013). A diferenciação *in vivo* das MSC em cardiomiócitos nos ensaios clínicos mostra-se improvável, uma vez que há uma baixa taxa de enxerto no tecido cardíaco, e, como tal, as teorias voltam-se novamente para os seus efeitos parácrinos (Matar & Chong, 2014). Os principais resultados destes ensaios podem ser consultados na Tabela B3 em anexo.

De forma a aumentar o fraco enxerto das MSC no tecido isquémico pode recorrer-se a engenharia genética para contornar o ambiente cardíaco adverso e aumentar a eficácia do transplante de MSC. A sobreexpressão de *midkine* em MSC teve um efeito citoprotetor à anoxia e reduziu a apoptose por aumento de VEGF, SDF-1 α , IGF-1, TGF- β *in vitro*, aumentando a sua sobrevivência e melhorando a função cardíaca *in vivo* (S.-L. Zhao, Zhang, Li, Zhang, & Chen, 2014). Esta proteína é induzida aquando da reparação do tecido, inflamação e carcinogénese (“Midkine”, s.d.) e promove, entre outros, o crescimento e sobrevivência de diversas células-alvo (Muramatsu, 2010). Também a sobreexpressão de agentes antioxidantes, como a superóxido dismutase, podem promover a eliminação de espécies reativas de oxigénio presentes na lesão de isquémia-reperusão, reduzindo o *stress* oxidativo e apoptose, com aumento da função cardíaca (Pan et al., 2014). Outra abordagem poderá passar pela transfeção de uma *cassette* de fusão entre o fator de crescimento básico do fibroblasto (bFGF), promotor da angiogénese e divisão celular, e FGF4, promotor da secreção de proteínas. Em modelo da doença em ratos esta abordagem demonstrou maior secreção de bFGF e, como tal, melhoria da função global do ventrículo esquerdo, através da redução da fibrose miocárdica e aumento da angiogénese na área lesada (X.-Q. Chen et al., 2014).

Num estudo ligeiramente diferente, com o objetivo de que o fator 1 α induzido por hipoxia (HIF-1 α), um regulador da resposta hipoxica após EAM, não fosse apenas expresso nas MSC transplantadas mas sim em todo o tecido cardíaco, testou-se a possibilidade de transfeção do miocárdio com HIF-1 α e co-administração de MSC. Neste caso verificou-se efetivamente maior expressão de VEGF e SDF-1 α , com subsequente aumento da angiogénese e enxerto das MSC e menor apoptose nas regiões circundantes ao enfarte. Esta abordagem revelou uma reparação da função cardíaca superior comparativamente a MSC transfetadas com HIF-1 α (B. Huang et al., 2014).

Conforme referido anteriormente, um dos problemas da administração sistémica ou local de MSC é a baixa retenção nos tecidos e a elevada morte celular devido à ausência de

suplementação sanguínea e ao microambiente hipóxico gerado pela resposta inflamatória (Pagliari et al., 2014). As Estatinas, fármacos antidislipidémicos como a sinvastatina (Y.-J. Yang et al., 2009), rosuvastatina (Xu et al., 2011) ou atorvastatina (Na et al., 2014; Song et al., 2013; Q. Zhang et al., 2012, 2014), demonstraram atenuar a inflamação e *stress* oxidativo procedentes ao AMI. Deste modo, funcionam como protetoras das MSC por diminuição do efeito apoptótico derivado das condições de hipoxia. Também a utilização de biomateriais como hidrogéis, adesivos para o epicárdio (Kai et al., 2014; Roche et al., 2014), nanofibras (B.-J. Kang et al., 2014), fibrina (C.-K. Sun et al., 2014) ou complexos polieletrólitos (Ceccaldi et al., 2014) mostraram ser formas de administração mais eficientes que a simples injeção das células. Estes protegem as MSC e aumentam a sua viabilidade perante as condições adversas, evitando que se percam logo após transplante e aumentando assim o número de células que enxertam no coração (Roche et al., 2014). Também os efeitos angiogénico (Kai et al., 2014; C.-K. Sun et al., 2014) e antifibrótico (Ceccaldi et al., 2014; B.-J. Kang et al., 2014) são estimulados, com diminuição da remodelação após EAM. Adicionalmente, para ultrapassar a ausência de vascularização, foi concebida uma estrutura tridimensional pré-vascularizada em matriz de gelatina, em que as hMSC autólogas em associação com células progenitoras de cardiomiócitos humanas formam um tecido densamente empacotado com células vasculares e cardíacas tornando possível a maturação e integração no tecido nativo *in vivo* (Pagliari et al., 2014).

Doenças Neurológicas

Ao contrário das terapêuticas convencionais que apenas atrasam o desenvolver de doenças neurodegenerativas como Parkinson, Alzheimer ou Huntington, ou doenças como a esclerose múltipla, lesão da medula espinhal ou acidente vascular cerebral, as MSC oferecem a oportunidade de regeneração das lesões que estão na origem destas patologias. Todavia, tal como nas restantes aplicações, os seus mecanismos permanecem incertos (Figura 15).

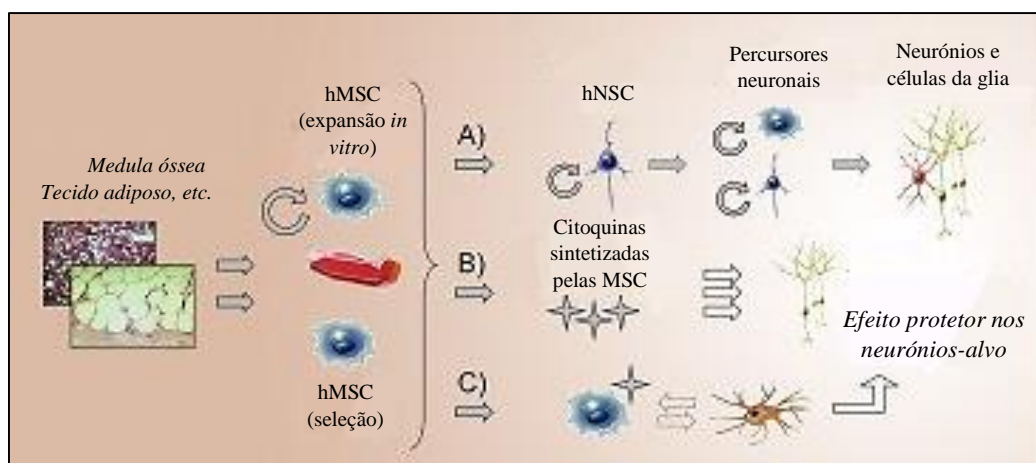


Figura 15: Potenciais mecanismos de ação neuronal das MSC. As MSC poderão atuar por diferenciação direta em neurónios e células da glia (A), por libertação de fatores neurotróficos e proteínas da matriz extracelular que estimulam as células endógenas (B) ou por ação direta e indireta nas células do sistema imunitário com subsequente ação neuroprotetora (C) (Adaptado de Paul, G., & Anisimov, S. V. (2013). The secretome of mesenchymal stem cells: potential implications for neuroregeneration. *Biochimie*, 95(12), 2246–56. doi:10.1016/j.biochi.2013.07.013).

A Doença de Parkinson (PD) caracteriza-se principalmente pela perda progressiva de neurónios dopaminérgicos na substância *nigra pars compacta* (Cova et al., 2010). No seu estudo *in vivo*, as MSC não apresentam capacidade de diferenciação neuronal quando injetadas no corpo estriado de ratos com PD e como tal não enxertam no local. Assume-se assim que esta não será a sua forma de ação neuroprotetora (Neirinckx, Marquet, Coste, Rogister, & Wislet-Gendebien, 2013) mas sim a ação por suporte trófico, pela capacidade imunomoduladora e anti-inflamatória (Chao, He, & Tay, 2009) e pela interação com as células do hospedeiro (Coquery et al., 2012; Cova et al., 2010; H.-J. Park, Shin, Lee, Kim, & Lee, 2012). Contudo, mediante estimulação *in vitro*, as MSC conseguem diferenciar-se em células de linhagem neurogénica, mas não conseguem formar neurónios funcionais ou excitáveis (Thomas et al., 2011). Como tal, não melhoram as alterações motoras características da doença, apenas protegendo contra o dano neuronal dopaminérgico em ratos (Capitelli et al., 2014). Poucos ensaios clínicos têm vindo a ser realizados, contudo, dois indicam a segurança a curto-prazo do transplante de BM-MSK autólogas (Neelam K Venkataramana et al., 2010) ou alogénicas (N K Venkataramana et al., 2012) na zona subventricular do cérebro e uma maior eficácia quando administradas em estádios mais precoces da doença (N K Venkataramana et al., 2012).

Estão em estudo diversas propostas relativas a abordagens alternativas, como por exemplo por meio de MSC que sobressintem *Lmx-1 α* , um fator de transcrição indutor da diferenciação em células dopaminérgicas, e neurturina, um fator neuroprotetor dos

neurónios de dopamina. Nestes estudos verificou-se uma maior sobrevivência das células transplantadas e uma substituição dos neurónios lesados, evidenciando as funções fisiológicas destes neurónios e melhorando os sintomas em modelo de macaco *rhesus* com PD (Yan et al., 2013). Outros como o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), promotor da sobrevivência dos neurónios dopaminérgicos, sobreexpresso em MSC *in vitro* (Somoza, Juri, Baes, Wyneken, & Rubio, 2010), e o fator neurotrófico derivado da linhagem de células de gliais (GDNF), um fator protetor dos neurónios da substância *nigra*, sobreexpresso nas MSC *in vitro* (W.-H. Yang et al., 2013), em ratos (Moloney, Rooney, Barry, Howard, & Dowd, 2010) e macacos (Ren et al., 2013) são exemplos de estratégias que procuram estabilizar os sintomas em maior extensão relativamente às MSC por si só, servindo como veículos para transporte dos fatores neurotróficos.

A Esclerose Múltipla (MS) constitui uma doença do foro inflamatório que poderá ser controlada pela reparação direta das lesões pelas MSC. A via de administração intraperitoneal mantém o nível de células Treg e aumenta a secreção de IL-4, a par com a diminuição de IFN- γ e infiltração de células no cérebro, comparativamente à via intravenosa (Yousefi, Ebtekar, Soleimani, Soudi, & Hashemi, 2013). De forma a melhorar o efeito imunomodulador destas células determinou-se que a autofagia das MSC teria de ser inibida, de modo a permitir a total inibição das células T por estimulação de PGE2 (Dang et al., 2014). Também a utilização de progenitores neurais derivados das MSC *in vitro* foi estudada, em que estes, administrados por via intratecal, diminuem a incidência desta patologia. Isto ocorre por secreção de fatores tróficos próprios desta linhagem, recrutando e estimulando os progenitores endógenos da medula espinhal e promovendo a reparação do Sistema Nervoso Central (CNS) em ratos com Encefalomielite Autoimune Experimental (EAE) (Harris, Yan, et al., 2012) e em doentes com MS (Harris, Faroqui, Vyshkina, & Sadiq, 2012).

Embora a maioria dos estudos tenham sido realizados com MSC alogénicas de indivíduos saudáveis, um estudo recente verificou, em modelo de EAE, que as células autólogas destes doentes apresentam as mesmas características que as MSC saudáveis, inibindo em igual amplitude o quadro de EAE (Kassis, Petrou, Halimi, & Karussis, 2013). A nível clínico, tem sido estudada a utilização destas células, tanto em estado indiferenciado de origem autóloga ou alogénica como diferenciado em progenitores neurais. Os estudos mais recentes a este nível podem ser consultados na Tabela B4 em anexo. Uma vez que

não se sabe quanto tempo estas células sobrevivem *in vivo* ou se deixam o local após a inflamação desaparecer, foi sugerido um método alternativo, nomeadamente a administração intranasal de MSC que sobrexpressam um recetor da glicoproteína de mielina dos oligodendrócitos (MOG). Este recetor melhora a transferência de MSC ao cérebro, minimizando a quantidade de células necessária e as reações sistémicas. Permite assim a manutenção da capacidade imunossupressora e infiltração no cérebro com prolongamento da sua permanência no local e subsequente redução dos sintomas (Fransson et al., 2014). Também a transfeção das AT-MSC com IL-10 demonstrou diminuir a resposta proliferativa das células T e a secreção de citocinas pró-inflamatórias. Desta forma, verificou-se a inibição preferencial da neuroinflamação mediada pelas células Th17 e a manutenção das células Treg (Payne et al., 2013).

O glioma, principalmente o glioblastoma multiforme, é um tumor maligno altamente resistente à terapêutica convencional devido ao seu caráter extremamente invasivo no parênquima cerebral (Menon, Kelly, et al., 2009). As MSC apresentam capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica (Velpula, Dasari, & Rao, 2012) e diversos estudos demonstram o seu tropismo ao glioma (Doucette et al., 2011; Pendleton et al., 2013). Como tal, as MSC estão a ser estudadas para transportar agentes antineoplásicos diretamente ao tumor, tais como enzimas conversoras de pró-fármacos, vírus oncolíticos e citocinas pró-inflamatórias.

Foi demonstrado em cultura que as hUC-MSC e hAT-MSC por si só apresentam efeito anti-tumoral, uma vez que estimulam a diferenciação das células U251 de glioma num fenótipo semelhante às células gliais e com baixa capacidade de infiltração, induzindo concomitantemente a apoptose destas células (C. Yang et al., 2014). Adicionalmente, a administração intratumoral de MSC acoplada a imunoterapia periférica com IFN- γ aumenta a sobrevivência de ratos com este tumor, uma vez que estimula a resposta dos CTL e liberta moléculas imunossupressoras como PGE2 e IL-10 (Strøjby et al., 2014).

Diversas teorias estão na génese do mecanismo de ação das MSC no tumor. Velpula e colaboradores (2012) propuseram que as células de glioma segregam múltiplos fatores, como IL-8 e GRO- α , que controlam a expressão de recetores co-estimuladores nas MSC e estimulam assim o seu *homing* ao local. Adicionalmente, Ho e colaboradores (2013) postularam que a ação das MSC passava pela diminuição da angiogénese tumoral por meio da inibição do eixo PDGF/PDGFR com alteração do recrutamento de células progenitoras endoteliais ao glioma. Estes resultados são contraditórios ao mecanismo

pelo qual se pensa que estas células atuem, nomeadamente, a nível da secreção pelas MSC de fatores promotores da neovascularização, como por exemplo o VEGF. Esta sua propriedade e ainda a inibição da imunovigilância, a libertação de fatores tróficos e a sua capacidade de diferenciação em fibroblastos associados ao tumor providenciam as condições perfeitas para a formação tumoral e poderão mesmo estimular o seu crescimento e metastização. Deste modo, enquanto não forem realizados estudos de segurança a longo prazo, a utilização das MSC em tumores será demasiado arriscada. Por outro lado, de acordo com o curto *follow-up* característico desta doença, a sua avaliação ou mesmo utilização a longo termo está limitada.

A utilização de MSC transfetadas com TRAIL, um membro da superfamília de TNF, constitui um exemplo promissor da engenharia genética como meio de direcionar a apoptose seletiva das células tumorais, com aumento da sobrevivência em modelos de roedores (Choi et al., 2011; Menon, Kelly, et al., 2009). O acoplar de MSC, que conferem a propriedade de migração ao tumor, com a utilização de miRNA é igualmente promissora. A sobreexpressão de miRNA geralmente silenciados no glioma, como miR-124, miR-145 (H. K. Lee et al., 2013) e miR-146b (Katakowski et al., 2013), demonstrou diminuir a migração, invasão e viabilidade das células de glioma. Do mesmo modo, o silenciamento de outros genes geralmente aumentados nestas condições, como miR-9 (Munoz et al., 2013), promoveu a sensibilização das células de glioma ao fármaco temozolamida por inibição da expressão do transportador de fármacos que lhes confere a resistência aos agentes terapêuticos.

A expressão do gene suicida citosina deaminase nas MSC injetadas no cérebro com o pró-fármaco 5-fluorocitosina (5-FC) evitou a toxicidade sistémica e levou ao aumento da apoptose, inibição do crescimento tumoral e cura completa da maioria dos animais já sujeitos a resseção neurocirúrgica (Altaner et al., 2014; Altanero et al., 2012; Chang et al., 2010; Fei et al., 2012). Outro exemplo de utilização como transportador de pró-fármacos é a expressão da enzima carboxilesterase (rCE) de coelho que ativa o pró-fármaco CPT-11 em SN-38, aumentando ligeiramente a sobrevivência em ratos (Choi et al., 2012). Por último, também têm sido concebidas MSC infetadas com vírus oncolíticos, como por exemplo o vírus myxoma (Josiah et al., 2010), unicamente patogénico em coelhos, ou o adenovírus $\Delta 24$ -RGD (Yong et al., 2009), com demonstração da diminuição da massa tumoral e aumento da sobrevivência dos modelos animais.

Os ensaios clínicos atualmente em curso ainda não se baseiam na utilização de MSC mas sim na aplicação de células estaminais neurais (NSC) como agentes transportadores de fármacos. Este facto pode dever-se à capacidade imunossupressora ser potencialmente semelhante e ao maior potencial migratório e de integração no tumor das NSC (Ahmed, Alexiades, & Lesniak, 2011; Auffinger et al., 2012). Contudo, a aplicação das NSC está limitada pelos problemas éticos e pela necessidade de transplante alogénico com potencial desenvolvimento de imunogenicidade (D.-H. Lee et al., 2009). Como tal, as MSC surgem como células isentas de apreensões éticas, de fácil colheita e isolamento, fácil expansão e manipulação *in vitro* e com a possibilidade de utilização das células do próprio doente, com re-implantação das mesmas após manipulação *ex vivo*. Assim, a realização de ensaios clínicos com estas células poderia constituir um passo em frente no desenvolvimento de uma cura para esta patologia fatal.

CAPÍTULO 4 – PERSPETIVAS PRESENTES E FUTURAS

As MSC apresentam diversas características que contribuem para a sua aplicação, contudo não estão isentas de problemas, como se pode verificar na Figura 16. Atualmente, mais de 450 ensaios clínicos estão registados (*clinicaltrials.gov*; *clinicaltrialsregister.eu*) relativamente às aplicações das MSC, principalmente derivadas de fontes como a medula óssea, tecido adiposo ou cordão umbilical. Todavia, a maioria encontra-se ainda em Fase I (estudos de segurança), Fase II (prova de eficácia) ou numa combinação de Fase I/II ou Fase II/III e apenas um em Fase IV (farmacovigilância). A Tabela C em anexo exemplifica os ensaios clínicos atualmente em desenvolvimento para o estudo destas células.

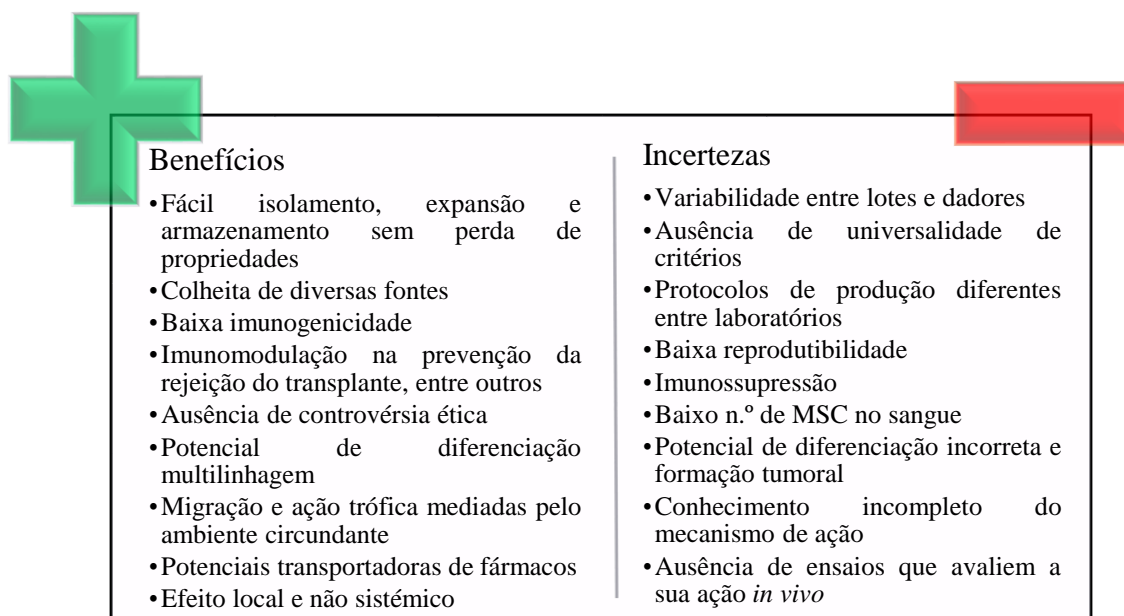


Figura 16: Conhecimento atual das propriedades das MSC (Adaptado de Gebler et al., 2012; Karp & Leng Teo, 2009; Liang, Ding, Zhang, Tse, & Lian, 2014; Wei et al., 2013; Weyand et al., 2013b).

Embora tenham sido estipulados critérios mínimos para as MSC, estes não são capazes de se adaptar à diversidade de funções destas células no contexto terapêutico. Diferentes laboratórios adotam diferentes protocolos, apenas na ânsia de fazer corresponder aos requisitos mínimos internacionalmente estipulados. Deste modo, a criação de uma base de dados em que os investigadores colocariam a informação sobre o protocolo utilizado (Prockop, Prockop, & Bertoncello, 2014) a par com os dados dos doentes e a sua avaliação a longo prazo (Xi, Yan, Zhou, Yue, & Pei, 2013), permitiria a verificação, reprodução e comparação simples de informações entre laboratórios. Adicionalmente, a fonte de MSC, a dose ótima e frequência de administração e as patologias indicadas ou

contraindicadas, a par com protocolos padrão de produção das MSC poderiam ser previamente estabelecidos pelas entidades reguladoras.

A combinação de tecnologias como a proteômica (Weyand, Dominici, Hass, Jacobs, & Kasper, 2013a), genômica ou bioinformática (Weyand et al., 2013b) constitui um recurso essencial ao futuro estudo destas células. Antes de poderem ser utilizadas em contexto clínico será necessária a determinação dos mecanismos biológicos pelos quais as MSC se regem, nomeadamente relativos à sua diferenciação e enxerto, que nos diferentes ensaios parecem não exercer um papel relevante na regeneração. Outras propriedades como a capacidade de *homing*, interação com o microambiente circundante e libertação de moléculas bioativas também deverão ser estabelecidas. Derivado da inconsistência entre laboratórios, e embora diversos resultados no âmbito de diversas patologias tenham sido publicados, é necessário verificar efetivamente a sobrevivência e eficácia *in vivo* após transplante destas células, as possíveis reações adversas a longo prazo, a imunogenicidade do transplante de MSC alogénicas e a tradução dos modelos animais para humanos, determinando novos métodos validados de produção destas células em larga escala.

Com a evolução do conhecimento sobre as MSC, o controlo dos efeitos parácrinos oferece elevado interesse uma vez que estes constituem uma via aplicável, manipulável e controlável (Liang et al., 2014), podendo associar-se ao desenvolver de novas tecnologias tanto a nível da engenharia de tecidos como da engenharia genética, ambas consideradas já grandes avanços na terapêutica. A aposta na geração de estruturas tridimensionais para formação de órgãos complexos funcionais (Weyand et al., 2013b) é o principal objetivo da utilização de biomateriais associados a MSC e o melhor controlo das suas características é essencial ao seu sucesso. Por outro lado, antes da utilização de produtos derivados de manipulação genética é necessária uma reavaliação da sua segurança, nomeadamente a nível da utilização de transgenes (Weyand et al., 2013a), ou a possível determinação de novos métodos de manipulação não genética. Também a temática de formação tumoral é controversa, sendo necessário o seu esclarecimento.

A importância destas células na restauração da integridade estrutural e funcional de um órgão ou tecido é inegável, contudo, ainda há muito por explorar no campo das MSC (Figura 17). Esta terapêutica mostra-se bastante promissora no controlo das mais diversas doenças do foro degenerativo, oncológico, cardiovascular ou ósseo que vão apresentando cada vez maior incidência com o envelhecer progressivo da população. As possibilidades terapêuticas destas células são intermináveis e, quando efetivamente concretizadas,

originarão um novo significado de terapêutica, isto é, ao invés da medicina generalizada atual darão início a uma era de medicina personalizada.

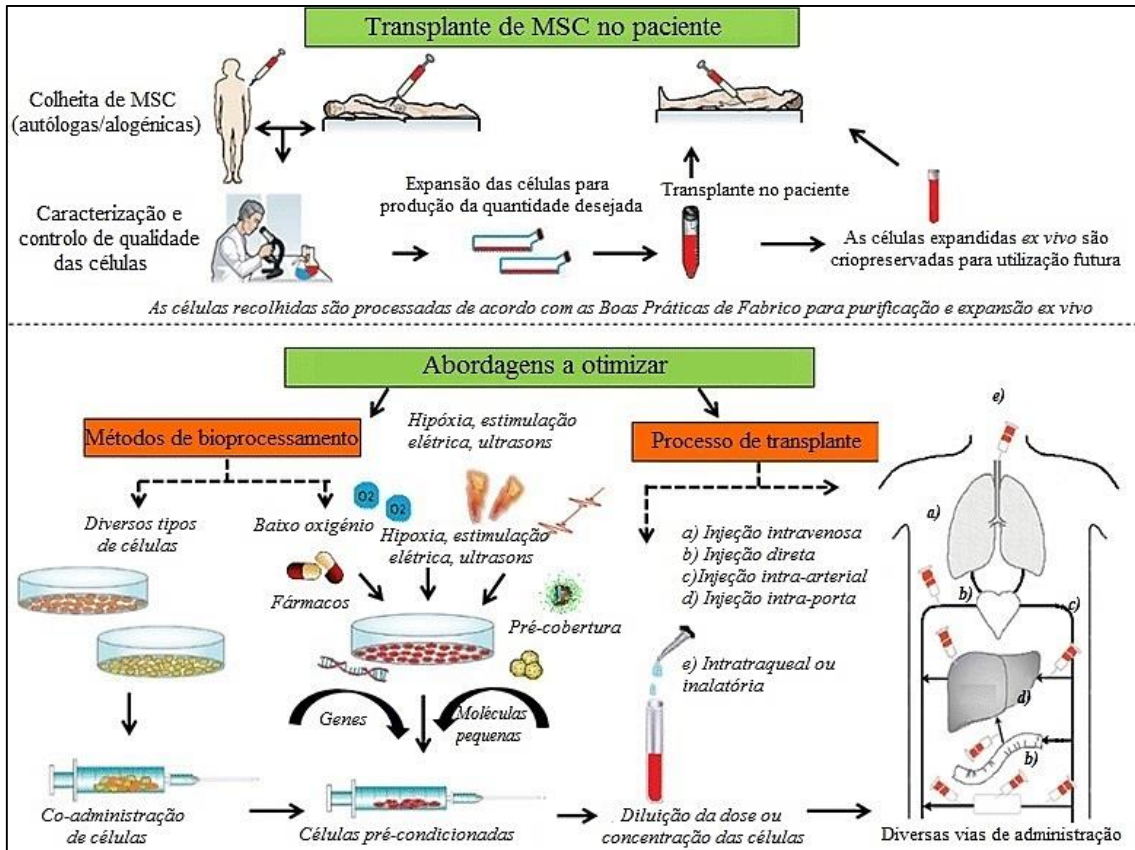


Figura 17: Modelo de transplante das MSC e parâmetros a caracterizar para futura aplicação clínica. As MSC emergem como possíveis meios terapêuticos personalizados, em que o modelo da sua tradução para a prática clínica se deverá basear na colheita destas células com posterior processamento de acordo com as Boas Práticas de Fabrico, sendo transplantadas de imediato no doente ou armazenadas por criopreservação. Adicionalmente, as condições em cultura poderão ser melhoradas por estratégias como a co-administração com outras células ou moléculas, a dose, duração e via de administração e ainda o pré-condicionamento das MSC, e em que os mecanismos concretos por detrás das ações benéficas nestas estratégias deverão ser identificados (Adaptado com modificações de Srijaya, T. C., Ramasamy, T. S., & Kasim, N. H. A. (2014). Advancing stem cell therapy from bench to bedside: lessons from drug therapies. *Journal of Translational Medicine*, 12, 243. doi:10.1186/s12967-014-0243-9).

CAPÍTULO 5 – CONCLUSÕES

Por definição, as MSC são células adultas aderentes ao substrato, sem marcadores hematopoiéticos na sua superfície e com um potencial de diferenciação tripartido em osteoblastos, condroblastos e adipócitos. Desde a sua descoberta que o seu estudo despertou grande interesse no tratamento de diversas doenças, devido maioritariamente à ausência de imunogenicidade e, para além da sua extensa capacidade de diferenciação em diversos tipos de células, à capacidade de secreção de moléculas bioativas que controlam o microambiente na lesão. Estas células de linhagem mesodermal podem ser facilmente recolhidas de diversas fontes, tais como a medula óssea, tecido adiposo, cordão umbilical, entre outras. Embora em 2006 tenham sido estipulados os critérios mínimos para a sua definição, a heterogeneidade desta população representa o principal desafio para a generalização das conclusões de diferentes grupos de investigadores, uma vez que diferenças na fonte de células, condições de cultura ou densidade celular influenciam o fenótipo das MSC.

Não existe concordância quanto à capacidade de diferenciação e enxerto destas células *in vivo*, mas a maioria dos estudos suportam as suas propriedades parácrinas. Os mecanismos moleculares pelos quais as MSC atuam permanecem ocultos, apenas se sabendo que, mediante prévia estimulação por um ambiente inflamatório, exercem uma inibição das funções das células responsáveis pela resposta imunitária inata e adaptativa. O potencial mecanismo imunomodulador das MSC passa pela estimulação de um fenótipo anti-inflamatório, nomeadamente pela inibição tanto da proliferação das células Th1 como da maturação das DC e macrófagos. A inibição da diferenciação das células B a par com a diminuição da citotoxicidade pelas células NK e CTL e do *stress* oxidativo pelos neutrófilos também contribuem para a inibição da resposta imunitária e diminuição da lesão no tecido. Contudo, diversos estudos em animais e humanos sugerem uma menor ação imunossupressora destas células *in vivo*.

O processo de *homing* é intrínseco a estas células e, aquando da lesão, este permitirá a sua chegada e ação no tecido alvo, em que se pensa que a mediação seja maioritariamente realizada por moléculas como o SDF-1 α , quimioatratante, VCAM-1, promotor da adesão, e MMP, promotor da transmigração. Nesta área, a sobreexpressão de algum dos recetores destas moléculas nas MSC, de forma a melhorar a propriedade de *homing*, ou mesmo o aproveitamento da sua atração ao tecido alvo, para funcionar como transportadoras de agentes terapêuticos, constituem a base da engenharia genética. Também a engenharia de

tecidos, embora inicialmente associada pela capacidade de diferenciação das MSC, pode ser socorrida por estas propriedades e constitui a estratégia de eleição para a regeneração de tecidos, uma vez que funciona como ambiente para a sua formação.

As MSC atuam em várias frentes, nomeadamente em tumores, como o glioma, em patologias autoimunes, como a DM de tipo 1, GvHD, artrite reumatoide ou MS, ou em patologias resultantes da lesão de tecidos, como o AMI, defeitos ósseos ou articulares, *Osteogenesis Imperfecta* ou PD, entre outros. Nas diferentes patologias, os resultados de estudos em modelos animais e em ensaios clínicos são deveras promissores.

Estratégias como o transplante de ilhéus associado ao transplante de MSC por si só ou associadas a biomateriais parecem demonstrar uma ação citoprotetora na DM. A co-administração das MSC com as HSC, como forma profilática, ou a administração das MSC quando a GvHD já está estabelecida, como forma terapêutica, têm revelado uma taxa de resposta em ensaios clínicos superior à terapêutica atual desta patologia. Por outro lado, na regeneração de defeitos do osso ou da cartilagem poderá recorrer-se principalmente a condrócitos oriundos da cartilagem ou condrócitos diretamente derivados das MSC, geralmente acoplados a biomateriais. A nível cardíaco, o mecanismo mais provável será a estimulação das CSC residentes pelas MSC, tornando viável a hipótese de co-administração de MSC e CSC. A nível neurológico, a proteção de neurónios ou o controlo da neuroinflamação contornam os efeitos de patologias como a PD ou MS. A associação das MSC com vírus oncolíticos, enzimas conversoras de pró-fármacos ou moléculas que estimulem a apoptose ou diminuição da invasão celular, parecem aumentar a sua seletividade e agressividade no tumor.

Diversos riscos estão associados à preparação que precede a administração destas células, nomeadamente a utilização de aditivos de origem animal passíveis de despoletar reações adversas, tanto aquando da sua criopreservação como do processo de isolamento. A ausência de protocolos padronizados concordantes com as GMP que estabeleçam a totalidade do processo representa uma grande limitação na utilização destas células. Embora já após administração, a necessidade destes protocolos aplica-se igualmente à controvérsia do potencial papel destas células na formação tumoral ou da sua utilização após manipulação genética, adicionando nestas áreas a necessidade da realização de análises de eficácia e segurança a longo prazo, também estas padronizadas.

Produtos como o Prochymal® ou o CARTISTEM® (consultar a Tabela C em anexo) permitirão a produção em larga escala de MSC para utilização *off-the-shelf*, em que será

possível a produção de milhares de doses a partir de uma única doação. Adicionalmente, o transporte melhorado para um tecido específico poderá aumentar a eficácia da terapia celular e reduzir o número de células infundidas, diminuindo subsequentemente os encargos com o desenvolvimento dos agentes terapêuticos.

Uma vez que ainda não existem provas incontestáveis de eficácia e reprodutibilidade da utilização das MSC relativamente às abordagens convencionais, a sua aplicação ainda está restrita a ensaios clínicos. Estes ensaios exibem diversos desafios que deverão ser estudados e exaltam uma área que ainda muito tem para crescer. Questões como qual o verdadeiro mecanismo de *homing*, diferenciação ou enxerto das MSC, quais as condições de administração mais adequadas ou qual a melhor forma de otimizar a terapêutica permanecem em aberto. Estratégias como a criação de uma base de dados que permita a comparação de protocolos e resultados, a padronização de todas as etapas do processo ou a utilização de novas tecnologias para o seu estudo poderão constituir meios que ajudem a dar resposta aos dilemas que esta área padece.

Em suma, os dias que correm constituem uma rampa de lançamento para a aplicação clínica das MSC e ainda muito esforço e energia terão de ser investidos. Contudo, com a demonstração de tamanhos efeitos benéficos, estas células não são de se desperdiçar. As MSC detêm competências para modernizar totalmente a medicina atual e oferecer uma hipótese a indivíduos cujas patologias são incapacitantes ou mesmo fatais. Deste modo, a área de investigação nestas células constitui uma componente que permite vislumbrar um futuro melhor e o seu constante desenvolvimento levará à descoberta de terapêuticas extraordinárias e inovadoras que poderão aumentar a esperança, confiança, qualidade de vida e bem-estar de toda uma população.

BIBLIOGRAFIA

- Abdel Aziz, M. T., Wassef, M. A. A., Ahmed, H. H., Rashed, L., Mahfouz, S., Aly, M. I., ... Abdelaziz, M. (2014). The role of bone marrow derived-mesenchymal stem cells in attenuation of kidney function in rats with diabetic nephropathy. *Diabetology & Metabolic Syndrome*, 6(1), 34. doi:10.1186/1758-5996-6-34
- Ahmed, A. U., Alexiades, N. G., & Lesniak, M. S. (2011). The use of neural stem cells in cancer gene therapy: Predicting the path to the clinic. *Current Opinion in Molecular Therapeutics*, 12(5), 546–552.
- Allan, D. S., & Strunk, D. (2012). *Regenerative therapy using blood-derived stem cells*. Springer Science & Business Media. Disponível em <http://books.google.com/books?id=ILFqdlv3Cs8C&pgis=1>
- Altaner, C., Altanerova, V., Cihova, M., Ondicova, K., Rychly, B., Baciak, L., & Mravec, B. (2014). Complete regression of glioblastoma by mesenchymal stem cells mediated prodrug gene therapy simulating clinical therapeutic scenario. *International Journal of Cancer*, 134(6), 1458–65. doi:10.1002/ijc.28455
- Altanerova, V., Cihova, M., Babic, M., Rychly, B., Ondicova, K., Mravec, B., & Altaner, C. (2012). Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells expressing yeast cytosinedeaminase::uracil phosphoribosyltransferase inhibit intracerebral rat glioblastoma. *International Journal of Cancer*, 130(10), 2455–63. doi:10.1002/ijc.26278
- American Diabetes Association. (2010). Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*, 33, S62–9. doi:10.2337/dc10-S062
- Ankrum, J. a, Dastidar, R. G., Ong, J. F., Levy, O., & Karp, J. M. (2014). Performance-enhanced mesenchymal stem cells via intracellular delivery of steroids. *Scientific Reports*, 4, 1–13. doi:10.1038/srep04645
- Arnhold, S., Absenger, Y., Klein, H., Addicks, K., & Schraermeyer, U. (2007). Transplantation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells rescue photoreceptor cells in the dystrophic retina of the rhodopsin knockout mouse. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*, 245(3), 414–22. doi:10.1007/s00417-006-0382-7
- Arno, A. I., Amini-Nik, S., Blit, P. H., Al-Shehab, M., Belo, C., Herer, E., ... Jeschke, M. G. (2014). Human Wharton's jelly mesenchymal stem cells promote skin wound

- healing through paracrine signaling. *Stem Cell Research & Therapy*, 5(1), 28. doi:10.1186/scrt417
- Auffinger, B., Thaci, B., Nigam, P., Rincon, E., Cheng, Y., & Lesniak, M. S. (2012). New therapeutic approaches for malignant glioma: in search of the Rosetta stone. *F1000 Medicine Reports*, 4, 1–6. doi:10.3410/M4-18
- Augello, A., Kurth, T. B., & De Bari, C. (2010). Mesenchymal stem cells: a perspective from in vitro cultures to in vivo migration and niches. *European Cells & Materials*, 20, 121–33.
- Ayatollahi, M., Salmani, M. K., Geramizadeh, B., Tabei, S. Z., Soleimani, M., & Sanati, M. H. (2012). Conditions to improve expansion of human mesenchymal stem cells based on rat samples. *World Journal of Stem Cells*, 4(1), 1–8. doi:10.4252/wjsc.v4.i1.1
- Baaten, B. J. G., Tinoco, R., Chen, A. T., & Bradley, L. M. (2012). Regulation of antigen-experienced t cells: lessons from the quintessential memory marker CD44. *Frontiers in Immunology*, 3(23), 1–12. doi:10.3389/fimmu.2012.00023
- Bahney, C. S., Hu, D. P., Taylor, A. J., Ferro, F., Britz, H. M., Hallgrímsson, B., ... Marcucio, R. S. (2014). Stem cell-derived endochondral cartilage stimulates bone healing by tissue transformation. *Journal of Bone and Mineral Research*, 29(5), 1269–82. doi:10.1002/jbmr.2148
- Ball, L. M., Bernardo, M. E., Roelofs, H., van Tol, M. J. D., Contoli, B., Zwaginga, J. J., ... Locatelli, F. (2013). Multiple infusions of mesenchymal stromal cells induce sustained remission in children with steroid-refractory, grade III-IV acute graft-versus-host disease. *British Journal of Haematology*, 163(4), 501–9. doi:10.1111/bjh.12545
- Bamrungsap, S., Zhao, Z., Chen, T., Wang, L., Li, C., Fu, T., & Tan, W. (2012). Nanotechnology in therapeutics: a focus on nanoparticles as a drug delivery system. *Nanomedicine*, 7(8), 1253–71. doi:10.2217/nnm.12.87
- Barkholt, L., Flory, E., Jekerle, V., Lucas-Samuel, S., Ahnert, P., Bisset, L., ... Salmikangas, P. (2013). Risk of tumorigenicity in mesenchymal stromal cell-based therapies--bridging scientific observations and regulatory viewpoints. *Cytotherapy*, 15, 753–9. doi:10.1016/j.jcyt.2013.03.005
- Baron, F., Lechanteur, C., Willems, E., Bruck, F., Baudoux, E., Seidel, L., ... Beguin, Y. (2010). Cotransplantation of mesenchymal stem cells might prevent death from graft-versus-host disease (GvHD) without abrogating graft-versus-tumor effects after HLA-mismatched allogeneic transplantation following nonmyeloablative conditioning.

- Biology of Blood and Marrow Transplantation*, 16(6), 838–47.
doi:10.1016/j.bbmt.2010.01.011
- Bartunek, J., Behfar, A., Dolatabadi, D., Vanderheyden, M., Ostojic, M., Dens, J., ... Terzic, A. (2013). Cardiopoietic stem cell therapy in heart failure: the C-CURE (Cardiopoietic stem Cell therapy in heart failURE) multicenter randomized trial with lineage-specified biologics. *Journal of the American College of Cardiology*, 61(23), 2329–38. doi:10.1016/j.jacc.2013.02.071
- Bernardo, M. E., Ball, L. M., Cometa, a M., Roelofs, H., Zecca, M., Avanzini, M. a, ... Locatelli, F. (2011). Co-infusion of ex vivo-expanded, parental MSCs prevents life-threatening acute GVHD, but does not reduce the risk of graft failure in pediatric patients undergoing allogeneic umbilical cord blood transplantation. *Bone Marrow Transplantation*, 46(2), 200–7. doi:10.1038/bmt.2010.87
- Bernardo, M. E., Pagliara, D., & Locatelli, F. (2012). Mesenchymal stromal cell therapy: a revolution in regenerative medicine? *Bone Marrow Transplantation*, 47(2), 164–71. doi:10.1038/bmt.2011.81
- Borg, D. J., Weigelt, M., Wilhelm, C., Gerlach, M., Bickle, M., Speier, S., ... Hommel, A. (2014). Mesenchymal stromal cells improve transplanted islet survival and islet function in a syngeneic mouse model. *Diabetologia*, 57, 522–31. doi:10.1007/s00125-013-3109-4
- Boroujeni, Z. N., & Aleyasin, A. (2013). Insulin producing cells established using non-integrated lentiviral vector harboring PDX1 gene. *World Journal of Stem Cells*, 5(4), 217–28. doi:10.4252/wjsc.v5.i4.217
- Bruck, F., Belle, L., Lechanteur, C., de Leval, L., Hannon, M., Dubois, S., ... Baron, F. (2013). Impact of bone marrow-derived mesenchymal stromal cells on experimental xenogeneic graft-versus-host disease. *Cytotherapy*, 15(3), 267–79. doi:10.1016/j.jcyt.2012.09.003
- Campagnoli, C., Roberts, I. a, Kumar, S., Bennett, P. R., Bellantuono, I., & Fisk, N. M. (2001). Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow. *Blood*, 98(8), 2396–402. doi:10.1182/blood.V98.8.2396.
- Cao, X., Han, Z.-B., Zhao, H., & Liu, Q. (2014). Transplantation of mesenchymal stem cells recruits trophic macrophages to induce pancreatic beta cell regeneration in diabetic mice. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 53, 372–9. doi:10.1016/j.biocel.2014.06.003

- Capelli, C., Pedrini, O., Cassina, G., Spinelli, O., Salmoiraghi, S., Golay, J., ... Introna, M. (2014). Frequent occurrence of non-malignant genetic alterations in clinical grade mesenchymal stromal cells expanded for cell therapy protocols. *Haematologica*, 99(6), e94–7. doi:10.3324/haematol.2014.104711
- Capitelli, C. S., Lopes, C. S., Alves, A. C., Barbiero, J., Oliveira, L. F., da Silva, V. J. D., & Vital, M. A. B. F. (2014). Opposite effects of bone marrow-derived cells transplantation in MPTP-rat model of Parkinson's disease: a comparison study of mononuclear and mesenchymal stem cells. *International Journal of Medical Sciences*, 11(10), 1049–64. doi:10.7150/ijms.8182
- Caplan, A. I. (1991). Mesenchymal stem cells. *Journal of Orthopaedic Research : Official Publication of the Orthopaedic Research Society*, 9(5), 641–650. doi:10.1002/jor.1100090504
- Casiraghi, F., Remuzzi, G., Abbate, M., & Perico, N. (2013). Multipotent mesenchymal stromal cell therapy and risk of malignancies. *Stem Cell Reviews*, 9(1), 65–79. doi:10.1007/s12015-011-9345-4
- Ceccaldi, C., Bushkalova, R., Alfarano, C., Lairez, O., Calise, D., Bourin, P., ... Fullana, S. G. (2014). Evaluation of polyelectrolyte complex-based scaffolds for mesenchymal stem cell therapy in cardiac ischemia treatment. *Acta Biomaterialia*, 10(2), 901–11. doi:10.1016/j.actbio.2013.10.027
- Chang, D.-Y., Yoo, S.-W., Hong, Y., Kim, S., Kim, S. J., Yoon, S.-H., ... Suh-Kim, H. (2010). The growth of brain tumors can be suppressed by multiple transplantation of mesenchymal stem cells expressing cytosine deaminase. *International Journal of Cancer*, 127(8), 1975–83. doi:10.1002/ijc.25383
- Chao, Y. X., He, B. P., & Tay, S. S. W. (2009). Mesenchymal stem cell transplantation attenuates blood brain barrier damage and neuroinflammation and protects dopaminergic neurons against MPTP toxicity in the substantia nigra in a model of Parkinson's disease. *Journal of Neuroimmunology*, 216(1-2), 39–50. doi:10.1016/j.jneuroim.2009.09.003
- Chase, L. G., & Vemuri, M. C. (2013). *Mesenchymal Stem Cell Therapy*. Nova Iorque: Springer Science & Business Media. Disponível em <http://books.google.com/books?id=8U9hrqzFC5oC&pgis=1>
- Chase, L. G., Lakshmipathy, U., Solchaga, L. a, Rao, M. S., & Vemuri, M. C. (2010). A novel serum-free medium for the expansion of human mesenchymal stem cells. *Stem Cell Research & Therapy*, 1(1), 8. doi:10.1186/scrt8

- Chatzistamatiou, T. K., Papassavas, A. C., Michalopoulos, E., Gamaloutsos, C., Mallis, P., Gontika, I., ... Stavropoulos-Giokas, C. (2014). Optimizing isolation culture and freezing methods to preserve Wharton's jelly's mesenchymal stem cell (MSC) properties: an MSC banking protocol validation for the Hellenic Cord Blood Bank. *Transfusion*. doi:10.1111/trf.12743
- Chen, W., Li, M., Li, Z., Yan, Z., Cheng, H., Pan, B., ... Xu, K. (2012). CXCR4-transduced mesenchymal stem cells protect mice against graft-versus-host disease. *Immunology Letters*, *143*(2), 161–9. doi:10.1016/j.imlet.2012.01.015
- Chen, X.-Q., Chen, L.-L., Fan, L., Fang, J., Chen, Z.-Y., & Li, W.-W. (2014). Stem cells with FGF4-bFGF fused gene enhances the expression of bFGF and improves myocardial repair in rats. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *447*(1), 145–51. doi:10.1016/j.bbrc.2014.03.131
- Choi, S. A., Hwang, S., Wang, K., Cho, B., Phi, J. H., Lee, J. Y., ... Kim, S. (2011). Therapeutic efficacy and safety of TRAIL producing human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells against experimental brainstem glioma. *Neuro-Oncology*, *13*(1), 61–69.
- Choi, S. A., Lee, J. Y., Wang, K.-C., Phi, J. H., Song, S. H., Song, J., & Kim, S.-K. (2012). Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells: characteristics and therapeutic potential as cellular vehicles for prodrug gene therapy against brainstem gliomas. *European Journal of Cancer*, *48*(1), 129–37. doi:10.1016/j.ejca.2011.04.033
- Christensen, M. E., Turner, B. E., Sinfield, L. J., Kollar, K., Cullup, H., Waterhouse, N. J., ... Rice, A. M. (2010). Mesenchymal stromal cells transiently alter the inflammatory milieu post-transplant to delay graft-versus-host disease. *Haematologica*, *95*(12), 2102–10. doi:10.3324/haematol.2010.028910
- Chung, J. Y., Song, M., Ha, C.-W., Kim, J.-A., Lee, C.-H., & Park, Y.-B. (2014). Comparison of articular cartilage repair with different hydrogel-human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cell composites in a rat model. *Stem Cell Research & Therapy*, *5*(2), 39. doi:10.1186/scrt427
- Connick, P., Kolappan, M., Crawley, C., Webber, D. J., Patani, R., Michell, A. W., ... Chandran, S. (2012). Autologous mesenchymal stem cells for the treatment of secondary progressive multiple sclerosis: an open-label phase 2a proof-of-concept study. *The Lancet. Neurology*, *11*(2), 150–6. doi:10.1016/S1474-4422(11)70305-2
- Connick, P., Kolappan, M., Patani, R., Scott, M. a, Crawley, C., He, X.-L., ... Chandran, S. (2011). The mesenchymal stem cells in multiple sclerosis (MSCIMS) trial protocol

- and baseline cohort characteristics: an open-label pre-test: post-test study with blinded outcome assessments. *Trials*, *12*(1), 62. doi:10.1186/1745-6215-12-62
- Coquery, N., Blesch, A., Stroh, A., Fernández-Klett, F., Klein, J., Winter, C., & Priller, J. (2012). Intrahippocampal transplantation of mesenchymal stromal cells promotes neuroplasticity. *Cytotherapy*, *14*(9), 1629–40. doi:10.3109/14653249.2012.694418
- Cova, L., Armentero, M.-T., Zennaro, E., Calzarossa, C., Bossolasco, P., Busca, G., ... Blandini, F. (2010). Multiple neurogenic and neurorescue effects of human mesenchymal stem cell after transplantation in an experimental model of Parkinson's disease. *Brain Research*, *1311*, 12–27. doi:10.1016/j.brainres.2009.11.041
- Dahlin, R. L., Kinard, L. a, Lam, J., Needham, C. J., Lu, S., Kasper, F. K., & Mikos, A. G. (2014). Articular chondrocytes and mesenchymal stem cells seeded on biodegradable scaffolds for the repair of cartilage in a rat osteochondral defect model. *Biomaterials*, *35*(26), 7460–9. doi:10.1016/j.biomaterials.2014.05.055
- Dang, S., Xu, H., Xu, C., Cai, W., Li, Q., Cheng, Y., ... Zhang, Y. (2014). Autophagy regulates the therapeutic potential of mesenchymal stem cells in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Autophagy*, *10*(7), 1301–15. doi:10.4161/auto.28771
- Davey, G. C., Patil, S. B., O'Loughlin, A., & O'Brien, T. (2014). Mesenchymal stem cell-based treatment for microvascular and secondary complications of diabetes mellitus. *Frontiers in Endocrinology*, *5*(86), 1–16. doi:10.3389/fendo.2014.00086
- Davies, O. G., Smith, a J., Cooper, P. R., Shelton, R. M., & Scheven, B. a. (2014). The effects of cryopreservation on cells isolated from adipose, bone marrow and dental pulp tissues. *Cryobiology*, *69*(2), 342–7. doi:10.1016/j.cryobiol.2014.08.003
- Davis, N. E., Beenken-Rothkopf, L. N., Mirsoian, A., Kojic, N., Kaplan, D. L., Barron, A. E., & Fontaine, M. J. (2012). Enhanced function of pancreatic islets co-encapsulated with ECM proteins and mesenchymal stromal cells in a silk hydrogel. *Biomaterials*, *33*, 6691–7. doi:10.1016/j.biomaterials.2012.06.015
- Dazzi, F., & Krampera, M. (2011). Mesenchymal stem cells and autoimmune diseases. *Best Practice & Research Clinical Haematology*, *24*(1), 49–57. doi:10.1016/j.beha.2011.01.002
- De la Fuente, R., Bernad, A., Garcia-Castro, J., Martin, M. C., & Cigudosa, J. C. (2010). Retraction: Spontaneous human adult stem cell transformation. *Cancer Research*, *70*(16), 6682. doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-2451
- Deng, J., She, R., Huang, W., Dong, Z., Mo, G., & Liu, B. (2013). A silk fibroin/chitosan scaffold in combination with bone marrow-derived mesenchymal stem cells to repair

- cartilage defects in the rabbit knee. *Journal of Materials Science Materials in Medicine*, 24(8), 2037–46. doi:10.1007/s10856-013-4944-z
- Desando, G., Cavallo, C., Sartoni, F., Martini, L., Parrilli, A., Veronesi, F., ... Grigolo, B. (2013). Intra-articular delivery of adipose derived stromal cells attenuates osteoarthritis progression in an experimental rabbit model. *Arthritis Research & Therapy*, 15(1), 1–15. doi:10.1186/ar4156
- Dhandayuthapani, B., Yoshida, Y., Maekawa, T., & Kumar, D. S. (2011). Polymeric scaffolds in tissue engineering application: a review. *International Journal of Polymer Science*, 1–19. doi:10.1155/2011/290602
- Ding, Y., Xu, D., Feng, G., Bushell, A., Muschel, R. J., & Wood, K. J. (2009). Mesenchymal stem cells prevent the rejection of fully allogenic islet grafts by the immunosuppressive activity of matrix metalloproteinase-2 and -9. *Diabetes*, 58, 1797–806. doi:10.2337/db09-0317
- Djouad, F., Bouffi, C., Ghannam, S., Noël, D., & Jorgensen, C. (2009). Mesenchymal stem cells: innovative therapeutic tools for rheumatic diseases. *Nature Reviews. Rheumatology*, 5(7), 392–9. doi:10.1038/nrrheum.2009.104
- Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., ... Horwitz, E. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 8(4), 315–7. doi:10.1080/14653240600855905
- Doucette, T., Rao, G., Yang, Y., Gumin, J., Shinojima, N., Bekele, B. N., ... Lang, F. F. (2011). Mesenchymal stem cells display tumor-specific tropism in an RCAS/Ntv-a glioma model. *Neoplasia*, 13(8), 716–725. doi:10.1593/neo.101680
- Dvir, T., Timko, B. P., Kohane, D. S., & Langer, R. (2011). Nanotechnological strategies for engineering complex tissues. *Nature Nanotechnology*, 6(1), 13–22. doi:10.1038/nnano.2010.246
- Dwyer, R. M., Khan, S., Barry, F. P., O'Brien, T., & Kerin, M. J. (2010). Advances in mesenchymal stem cell-mediated gene therapy for cancer. *Stem Cell Research & Therapy*, 1(25). doi:10.1186/scrt25
- Dwyer, R. M., Potter-Beirne, S. M., Harrington, K. a, Lowery, a J., Hennessy, E., Murphy, J. M., ... Kerin, M. J. (2007). Monocyte chemotactic protein-1 secreted by primary breast tumors stimulates migration of mesenchymal stem cells. *Clinical Cancer Research*, 13(17), 5020–7. doi:10.1158/1078-0432.CCR-07-0731

- Ebrahimi, A., & Lalvand, N. (2013). Drug delivery using genetically modified mesenchymal stem cells: a promising targeted-delivery method. *Hygeia Journal for Drugs and Medicines*, 5(1), 90–104.
- El-Badri, N., & Ghoneim, M. a. (2013). Mesenchymal stem cell therapy in diabetes mellitus: progress and challenges. *Journal of Nucleic Acids*, 1–7. doi:10.1155/2013/194858
- Ezquer, F., Ezquer, M., Contador, D., Ricca, M., Simon, V., & Conget, P. (2012). The antidiabetic effect of mesenchymal stem cells is unrelated to their transdifferentiation potential but to their capability to restore Th1/Th2 balance and to modify the pancreatic microenvironment. *Stem Cells*, 30(8), 1664–74. doi:10.1002/stem.1132
- Fan, C.-Q., Leu, S., Sheu, J.-J., Zhen, Y.-Y., Tsai, T.-H., Chen, Y.-L., ... Yip, H.-K. (2014). Prompt bone marrow-derived mesenchymal stem cell therapy enables early porcine heart function recovery from acute myocardial infarction. *International Heart Journal*, 55(4), 362–71. doi: 10.1536/ihj.14-007.
- Fang, Y., Tian, X., Bai, S., Fan, J., Hou, W., Tong, H., & Li, D. (2012). Autologous transplantation of adipose-derived mesenchymal stem cells ameliorates streptozotocin-induced diabetic nephropathy in rats by inhibiting oxidative stress, pro-inflammatory cytokines and the p38 MAPK signaling pathway. *International Journal of Molecular Medicine*, 30(1), 85–92. doi:10.3892/ijmm.2012.977
- Fang, Z., Hua, Z., Changying, L., Jianmin, W., Chengjuan, L., Kangli, X., & Jing, C. (2013). High level of CD4+CD25+CD127- Treg cells in donor graft is associated with a low risk of aGVHD after allo-HSCT for children with hematologic malignancies. *Journal of Cell Science & Therapy*, 4(3). doi:10.4172/2157-7013.1000148
- Fei, S., Qi, X., Kedong, S., Guangchun, J., Jian, L., & Wei, Q. (2012). The antitumor effect of mesenchymal stem cells transduced with a lentiviral vector expressing cytosine deaminase in a rat glioma model. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 138(2), 347–57. doi:10.1007/s00432-011-1104-z
- Figuerola, F. E., Carrión, F., Villanueva, S., & Khoury, M. (2012). Mesenchymal stem cell treatment for autoimmune diseases: a critical review. *Biological Research*, 45(3), 269–77. doi:10.4067/S0716-97602012000300008
- First US Study of Mesenchymal Stem Cells in MS. (2014, 12 de setembro). Consultado em 23 de setembro de 2014, disponível em <http://www.medscape.com/viewarticle/831610#2>

- François, M., Copland, I. B., Yuan, S., Romieu-Mourez, R., Waller, E. K., & Galipeau, J. (2012). Cryopreserved mesenchymal stromal cells display impaired immunosuppressive properties as a result of heat-shock response and impaired interferon- γ licensing. *Cytotherapy*, *14*(2), 147–52. doi:10.3109/14653249.2011.623691
- Fransson, M., Piras, E., Wang, H., Burman, J., Duprez, I., Harris, R. a, ... Loskog, A. S. I. (2014). Intranasal delivery of central nervous system-retargeted human mesenchymal stromal cells prolongs treatment efficacy of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Immunology*, *142*(3), 431–41. doi:10.1111/imm.12275
- Fu, R.-H., Wang, Y.-C., Liu, S.-P., Huang, C.-M., Kang, Y.-H., Tsai, C.-H., ... Lin, S.-Z. (2011). Differentiation of stem cells: strategies for modifying surface biomaterials. *Cell Transplantation*, *20*, 37–47. doi:10.3727/096368910X532756
- Gabr, M. M., Zakaria, M. M., Ayman F. Refaie, Ismail, A. M., Abou-El-Mahasen, M. A., Ashamallah, S. A., ... Ghoneim, M. A. (2013). Insulin-producing cells from adult human bone marrow mesenchymal stem cells control streptozotocin-induced diabetes in nude mice. *Cell Transplant*, *22*(1), 133–145. doi:10.3727/096368912X647162
- Galipeau, J. (2013). The mesenchymal stromal cells dilemma - does a negative phase III trial of random donor mesenchymal stromal cells in steroid-resistant graft-versus-host disease represent a death knell or a bump in the road? *Cytotherapy*, *15*, 2–8. doi:10.1016/j.jcyt.2012.10.002
- Gao, X., Song, L., Shen, K., Wang, H., Qian, M., Niu, W., & Qin, X. (2014). Bone marrow mesenchymal stem cells promote the repair of islets from diabetic mice through paracrine actions. *Molecular and Cellular Endocrinology*, *388*, 41–50. doi:10.1016/j.mce.2014.03.004
- Gao, Z., Cheng, P., Xue, Y., & Liu, Y. (2012). Vascular endothelial growth factor participates in modulating the C6 glioma-induced migration of rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells and upregulates their vascular cell adhesion molecule-1 expression. *Experimental and Therapeutic Medicine*, *4*(6), 993–998. doi:10.3892/etm.2012.707
- Gebler, A., Zabel, O., & Seliger, B. (2012). The immunomodulatory capacity of mesenchymal stem cells. *Trends in Molecular Medicine*, *18*(2), 128–34. doi:10.1016/j.molmed.2011.10.004

- Ghannam, S., Bouffi, C., Djouad, F., Jorgensen, C., & Noël, D. (2010). Immunosuppression by mesenchymal stem cells: mechanisms and clinical applications. *Stem Cell Research & Therapy*, *1*(2), 1–7. doi:10.1186/scrt2
- Granero-Moltó, F., Myers, T. J., Weis, J. A., Longobardi, L., Li, T., Yan, Y., ... Spagnoli, A. (2011). Mesenchymal stem cells expressing insulin-like growth factor-i (MSCIGF) promote fracture healing and restore new bone formation in *irs1* knock-out mice: analyses of MSCIGF autocrine and paracrine regenerative effects. *Stem Cells*, *29*(10), 1537–1548. doi:10.1002/stem.697.
- Greish, S., Abogresha, N., Abdel-Hady, Z., Zakaria, E., Ghaly, M., & Hefny, M. (2012). Human umbilical cord mesenchymal stem cells as treatment of adjuvant rheumatoid arthritis in a rat model. *World Journal of Stem Cells*, *4*(10), 101–9. doi:10.4252/wjsc.v4.i10.101
- Griffiths, M. J. D., Bonnet, D., & Janes, S. M. (2005). Stem cells of the alveolar epithelium. *Lancet*, *366*(9481), 249–60. doi:10.1016/S0140-6736(05)66916-4
- Gronthos, S., Mankani, M., Brahimi, J., Robey, P. G., & Shi, S. (2000). Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *97*(25), 13625–30. doi:10.1073/pnas.240309797
- Gu, H., Xiong, Z., Yin, X., Li, B., Mei, N., Li, G., & Wang, C. (2014). Bone regeneration in a rabbit ulna defect model: use of allogeneic adipose-derived stem cells with low immunogenicity. *Cell and Tissue Research*. doi:10.1007/s00441-014-1952-3
- Haddad, N. El. (2011). Mesenchymal stem cells: immunology and therapeutic benefits. In D. A. Gholamrezaezhad (Ed.), *Stem Cells in Clinic and Research*. InTech. doi:10.5772/21933
- Harada, N., Watanabe, Y., Sato, K., Abe, S., Yamanaka, K., Sakai, Y., ... Matsushita, T. (2014). Bone regeneration in a massive rat femur defect through endochondral ossification achieved with chondrogenically differentiated MSCs in a degradable scaffold. *Biomaterials*, *35*(27), 7800–10. doi:10.1016/j.biomaterials.2014.05.052
- Hare, J. M., Fishman, J. E., Gerstenblith, G., DiFede Velazquez, D. L., Zambrano, J. P., Suncion, V. Y., ... Lardo, A. (2012). Comparison of allogeneic vs autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells delivered by transendocardial injection in patients with ischemic cardiomyopathy: the POSEIDON randomized trial. *JAMA*, *308*(22), 2369–79. doi:10.1001/jama.2012.25321

- Harris, V. K., Farouqi, R., Vyshkina, T., & Sadiq, S. a. (2012). Characterization of autologous mesenchymal stem cell-derived neural progenitors as a feasible source of stem cells for central nervous system applications in multiple sclerosis. *Stem Cells Translational Medicine*, 1(7), 536–47. doi:10.5966/sctm.2012-0015
- Harris, V. K., Yan, Q. J., Vyshkina, T., Sahabi, S., Liu, X., & Sadiq, S. a. (2012). Clinical and pathological effects of intrathecal injection of mesenchymal stem cell-derived neural progenitors in an experimental model of multiple sclerosis. *Journal of the Neurological Sciences*, 313(1-2), 167–77. doi:10.1016/j.jns.2011.08.036
- Hass, R., Kasper, C., Böhm, S., & Jacobs, R. (2011). Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): A comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC. *Cell Communication and Signaling*, 9(1), 12. doi:10.1186/1478-811X-9-12
- Hatzistergos, K. E., Quevedo, H., Oskouei, B. N., Hu, Q., Feigenbaum, G. S., Margitich, I. S., ... Hare, J. M. (2010). Bone marrow mesenchymal stem cells stimulate cardiac stem cell proliferation and differentiation. *Circulation Research*, 107(7), 913–22. doi:10.1161/CIRCRESAHA.110.222703
- Heldman, A. W., DiFede, D. L., Fishman, J. E., Zambrano, J. P., Trachtenberg, B. H., Karantalis, V., ... Hare, J. M. (2014). Transendocardial mesenchymal stem cells and mononuclear bone marrow cells for ischemic cardiomyopathy: the TAC-HFT randomized trial. *JAMA*, 311(1), 62–73. doi:10.1001/jama.2013.282909
- Hematti, P., e Keating, A. (2013). *Mesenchymal Stromal Cells: Biology and Clinical Applications*. Nova Iorque: Springer Science & Business Media. Disponível em <http://books.google.com/books?id=fV5DAAAAQBAJ&pgis=1>
- Herrmann, R. P., & Sturm, M. J. (2014). Adult human mesenchymal stromal cells and the treatment of graft versus host disease. *Stem Cells and Cloning: Advances and Applications*, 7, 45–52. doi:10.2147/SCCAA.S37506
- Herrmann, R., Sturm, M., Shaw, K., Purtil, D., Cooney, J., Wright, M., ... Cannell, P. (2012). Mesenchymal stromal cell therapy for steroid-refractory acute and chronic graft versus host disease: a phase 1 study. *International Journal of Hematology*, 95(2), 182–8. doi:10.1007/s12185-011-0989-2
- Hilfiker, A., Kasper, C., Hass, R., & Haverich, A. (2011). Mesenchymal stem cells and progenitor cells in connective tissue engineering and regenerative medicine: is there a future for transplantation? *Langenbeck's Archives of Surgery*, 396, 489–97. doi:10.1007/s00423-011-0762-2

- Ho, I. a W., Toh, H. C., Ng, W. H., Teo, Y. L., Guo, C. M., Hui, K. M., & Lam, P. Y. P. (2013). Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells suppress human glioma growth through inhibition of angiogenesis. *Stem Cells*, *31*(1), 146–55. doi:10.1002/stem.1247
- Holubova, M., Lysak, D., Vlas, T., Vannucci, L., & Jindra, P. (2014). Expanded cryopreserved mesenchymal stromal cells as an optimal source for graft-versus-host disease treatment. *Biologicals: Journal of the International Association of Biological Standardization*, *42*(3), 139–44. doi:10.1016/j.biologicals.2014.01.003
- Hoogduijn, M. J., Popp, F., Verbeek, R., Masoodi, M., Nicolaou, A., Baan, C., & Dahlke, M.-H. (2010). The immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells and their use for immunotherapy. *International Immunopharmacology*, *10*(12), 1496–500. doi:10.1016/j.intimp.2010.06.019
- Horie, M., Choi, H., Lee, R. H., Reger, R. L., Ylostalo, J., Muneta, T., ... Prockop, D. J. (2012). Intra-articular injection of human mesenchymal stem cells (MSCs) promote rat meniscal regeneration by being activated to express Indian hedgehog that enhances expression of type II collagen. *Osteoarthritis and Cartilage*, *20*(10), 1197–207. doi:10.1016/j.joca.2012.06.002
- Horwitz, E. M., Le Blanc, K., Dominici, M., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F. C., ... Keating, A. (2005). Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, *7*(5), 393–5. doi:10.1080/14653240500319234
- Hou, Z., Liu, Y., Mao, X.-H., Wei, C., Meng, M., Liu, Y., ... Xiao, Z. (2013). Transplantation of umbilical cord and bone marrow-derived mesenchymal stem cells in a patient with relapsing-remitting multiple sclerosis. *Cell Adhesion & Migration*, *7*(5), 404–7. doi:10.4161/cam.26941
- Hu, J., Yu, X., Wang, Z., Wang, F., Wang, L., Gao, H., ... Wang, Y. (2013). Long term effects of the implantation of Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells from the umbilical cord for newly-onset type 1 diabetes mellitus. *Endocrine Journal*, *60*(3), 347–357. doi:10.1507/endocrj.EJ12-0343
- Huang, B., Qian, J., Ma, J., Huang, Z., Shen, Y., Chen, X., ... Chen, H. (2014). Myocardial transfection of hypoxia-inducible factor-1 α and co-transplantation of mesenchymal stem cells enhance cardiac repair in rats with experimental myocardial infarction. *Stem Cell Research & Therapy*, *5*(1), 22. doi:10.1186/scrt410

- Huang, H., Zhang, X., Hu, X., Shao, Z., Zhu, J., Dai, L., ... Ao, Y. (2014). A functional biphasic biomaterial homing mesenchymal stem cells for in vivo cartilage regeneration. *Biomaterials*, 1–12. doi:10.1016/j.biomaterials.2014.08.020
- In 't Anker, P. S., Scherjon, S. A., Kleijburg-van der Keur, C., de Groot-Swings, G. M. J. S., Claas, F. H. J., Fibbe, W. E., & Kanhai, H. H. H. (2004). Isolation of mesenchymal stem cells of fetal or maternal origin from human placenta. *Stem Cells*, 22(7), 1338–45. doi:10.1634/stemcells.2004-0058
- Introna, M., Lucchini, G., Dander, E., Galimberti, S., Rovelli, A., Balduzzi, A., ... Biagi, E. (2014). Treatment of graft versus host disease with mesenchymal stromal cells: a phase I study on 40 adult and pediatric patients. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, 20(3), 375–81. doi:10.1016/j.bbmt.2013.11.033
- Jang, Y. K., Kim, M., Lee, Y.-H., Oh, W., Yang, Y. S., & Choi, S. J. (2014). Optimization of the therapeutic efficacy of human umbilical cord blood-mesenchymal stromal cells in an NSG mouse xenograft model of graft-versus-host disease. *Cytotherapy*, 16(3), 298–308. doi:10.1016/j.jcyt.2013.10.012
- Jiang, R., Han, Z., Zhuo, G., Qu, X., Li, X., Wang, X., ... Han, Z. C. (2011). Transplantation of placenta-derived mesenchymal stem cells in type 2 diabetes: a pilot study. *Frontiers of Medicine*, 5(1), 94–100. doi:10.1007/s11684-011-0116-z
- Jones, G. N., Moschidou, D., Lay, K., Abdulrazzak, H., Vanleene, M., Shefelbine, S. J., ... Guillot, P. V. (2012). Upregulating CXCR4 in human fetal mesenchymal stem cells enhances engraftment and bone mechanics in a mouse model of osteogenesis imperfecta. *Stem Cells Translational Medicine*, 1(1), 70–8. doi:10.5966/sctm.2011-0007
- Josiah, D. T., Zhu, D., Dreher, F., Olson, J., McFadden, G., & Caldas, H. (2010). Adipose-derived stem cells as therapeutic delivery vehicles of an oncolytic virus for glioblastoma. *Molecular Therapy*, 18(2), 377–85. doi:10.1038/mt.2009.265
- Jung, S., Panchalingam, K. M., Rosenberg, L., & Behie, L. a. (2012). Ex vivo expansion of human mesenchymal stem cells in defined serum-free media. *Stem Cells International*, 2012, 123030. doi:10.1155/2012/123030
- Kadam, S., Muthyala, S., Nair, P., & Bhonde, R. (2010). Human placenta-derived mesenchymal stem cells and islet-like cell clusters generated from these cells as a novel source for stem cell therapy in diabetes. *The Review of Diabetic Studies*, 7(2), 168–82. doi:10.1900/RDS.2010.7.168

- Kai, D., Wang, Q.-L., Wang, H.-J., Prabhakaran, M. P., Zhang, Y., Tan, Y.-Z., & Ramakrishna, S. (2014). Stem cell-loaded nanofibrous patch promotes the regeneration of infarcted myocardium with functional improvement in rat model. *Acta Biomaterialia*, *10*(6), 2727–38. doi:10.1016/j.actbio.2014.02.030
- Kang, B.-J., Kim, H., Lee, S. K., Kim, J., Shen, Y., Jung, S., ... Cho, J.-Y. (2014). Umbilical-cord-blood-derived mesenchymal stem cells seeded onto fibronectin-immobilized polycaprolactone nanofiber improve cardiac function. *Acta Biomaterialia*, *10*(7), 3007–17. doi:10.1016/j.actbio.2014.03.013
- Kang, S. K., Shin, I. S., Ko, M. S., Jo, J. Y., & Ra, J. C. (2012). Journey of mesenchymal stem cells for homing: strategies to enhance efficacy and safety of stem cell therapy. *Stem Cells International*, 1–11. doi:10.1155/2012/342968
- Karaoz, E., Okcu, A., Ünal, Z. S., Subasi, C., Saglam, O., & Duruksu, G. (2013). Adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells efficiently differentiate into insulin-producing cells in pancreatic islet microenvironment both in vitro and in vivo. *Cytotherapy*, *15*, 557–70. doi:10.1016/j.jcyt.2013.01.005
- Karp, J. M., & Leng Teo, G. S. (2009). Mesenchymal stem cell homing: the devil is in the details. *Cell Stem Cell*, *4*, 206–16. doi:10.1016/j.stem.2009.02.001
- Kassis, I., Petrou, P., Halimi, M., & Karussis, D. (2013). Mesenchymal stem cells (MSC) derived from mice with experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) suppress EAE and have similar biological properties with MSC from healthy donors. *Immunology Letters*, *154*(1-2), 70–6. doi:10.1016/j.imlet.2013.06.002
- Katakowski, M., Buller, B., Zheng, X., Lu, Y., Rogers, T., Osobamiro, O., ... Chopp, M. (2013). Exosomes from marrow stromal cells expressing miR-146b inhibit glioma growth. *Cancer Letters*, *335*, 201–204. doi:10.1016/j.canlet.2013.02.019
- Kato, J., Kamiya, H., Himeno, T., Shibata, T., Kondo, M., Okawa, T., ... Nakamura, J. (2014). Mesenchymal stem cells ameliorate impaired wound healing through enhancing keratinocyte functions in diabetic foot ulcerations on the plantar skin of rats. *Journal of Diabetes and Its Complications*, *28*, 588–595. doi:10.1016/j.jdiacomp.2014.05.003
- Katuchova, J., Tothova, T., Farkasova Iannaccone, S., Toporcer, T., Harvanova, D., Hildebrand, T., ... Radonak, J. (2012). Impact of different pancreatic microenvironments on improvement in hyperglycemia and insulin deficiency in diabetic rats after transplantation of allogeneic mesenchymal stromal cells. *The Journal of Surgical Research*, *178*(1), 188–95. doi:10.1016/j.jss.2012.02.028

- Keating, A. (2012). Mesenchymal stromal cells: new directions. *Cell Stem Cell*, *10*(6), 709–16. doi:10.1016/j.stem.2012.05.015
- Kebriaei, P., Isola, L., Bahceci, E., Holland, K., Rowley, S., McGuirk, J., ... Uberti, J. (2009). Adult human mesenchymal stem cells added to corticosteroid therapy for the treatment of acute graft-versus-host disease. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, *15*(7), 804–11. doi:10.1016/j.bbmt.2008.03.012
- Kehoe, O., Cartwright, A., Askari, A., El Haj, A. J., & Middleton, J. (2014). Intra-articular injection of mesenchymal stem cells leads to reduced inflammation and cartilage damage in murine antigen-induced arthritis. *Journal of Translational Medicine*, *12*(1), 1–10. doi:10.1186/1479-5876-12-157
- Kerby, A., Jones, E. S., Jones, P. M., & King, A. J. (2013). Co-transplantation of islets with mesenchymal stem cells in microcapsules demonstrates graft outcome can be improved in an isolated-graft model of islet transplantation in mice. *Cytotherapy*, *15*, 192–200. doi:10.1016/j.jcyt.2012.10.018
- Kopen, G., Prockop, D., & Phinney, D. (1999). Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *96*(19), 10711–6.
- Kornblit, B., Leisenring, W. M., Santos, E. B., Storb, R., & Sandmaier, B. M. (2013). Safety of treatment with DLA-identical or unrelated mesenchymal stromal cells in DLA-identical canine bone marrow transplantation. *Chimerism*, *4*(3), 95–101. doi:10.4161/chim.25110
- Krampera, M. (2011). Mesenchymal stromal cell “licensing”: a multistep process. *Leukemia*, *25*(9), 1408–14. doi:10.1038/leu.2011.108
- Kshitiz, Park, J., Kim, P., Helen, W., Engler, A. J., Levchenko, A., & Kim, D.-H. (2013). Control of stem cell fate and function by engineering physical microenvironments. *Integrative Biology*, *4*(9), 1008–1018.
- Kuhn, N. Z., & Tuan, R. S. (2010). Regulation of stemness and stem cell niche of mesenchymal stem cells: implications in tumorigenesis and metastasis. *Journal of Cellular Physiology*, *222*(2), 268–77. doi:10.1002/jcp.21940
- Kumar, S., Nagy, T. R., & Ponnazhagan, S. (2010). Therapeutic potential of genetically modified adult stem cells for osteopenia. *Gene Therapy*, *17*(1), 105–116. doi:10.1038/gt.2009.116.Therapeutic

- Kumar, S., Wan, C., Ramaswamy, G., Clemens, T. L., & Ponnazhagan, S. (2010). Mesenchymal stem cells expressing osteogenic and angiogenic factors synergistically enhance bone formation in a mouse model of segmental bone defect. *Molecular Therapy*, 18(5), 1026–34. doi:10.1038/mt.2009.315
- Kuzmina, L. a, Petinati, N. a, Parovichnikova, E. N., Lubimova, L. S., Griбанова, E. O., Gaponova, T. V, ... Savchenko, V. G. (2012). Multipotent Mesenchymal Stromal Cells for the Prophylaxis of Acute Graft-versus-Host Disease-A Phase II Study. *Stem Cells International*, 1–8. doi:10.1155/2012/968213
- Lee, D.-H., Ahn, Y., Kim, S. U., Wang, K.-C., Cho, B.-K., Phi, J. H., ... Kim, S.-K. (2009). Targeting rat brainstem glioma using human neural stem cells and human mesenchymal stem cells. *Clinical Cancer Research*, 15(15), 4925–34. doi:10.1158/1078-0432.CCR-08-3076
- Lee, H. K., Finniss, S., Cazacu, S., Bucris, E., Ziv-av, A., Xiang, C., ... Brodie, C. (2013). Mesenchymal stem cells deliver synthetic microRNA mimics to glioma cells and glioma stem cells and inhibit their cell migration and self-renewal. *Oncotarget*, 4(2), 346–361.
- Lee, J.-W., Lee, S.-H., Youn, Y.-J., Ahn, M.-S., Kim, J.-Y., Yoo, B.-S., ... Hong, M. K. (2014). A randomized, open-label, multicenter trial for the safety and efficacy of adult mesenchymal stem cells after acute myocardial infarction. *Journal of Korean Medical Science*, 29(1), 23–31. doi:10.3346/jkms.2014.29.1.23
- Lee, W. S., Suzuki, Y., Graves, S. S., Iwata, M., Venkataraman, G. M., Mielcarek, M., ... Storb, R. (2011). Canine bone marrow-derived mesenchymal stromal cells suppress alloreactive lymphocyte proliferation in vitro but fail to enhance engraftment in canine bone marrow transplantation. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, 17(4), 465–75. doi:10.1016/j.bbmt.2010.04.016
- Lei n.º 12/2005 de 26 de Janeiro* (2005). Diário da República.
- Li, C., Ding, J., Jiang, L., Shi, C., Ni, S., Jin, H., ... Sun, H. (2014). Potential of mesenchymal stem cells by adenovirus-mediated erythropoietin gene therapy approaches for bone defect. *Cell Biochemistry and Biophysics*. doi:10.1007/s12013-014-0042-1
- Li, D., Wang, N., Zhang, L., Hanyu, Z., Xueyuan, B., Fu, B., ... Chen, X. (2013). Mesenchymal stem cells protect podocytes from apoptosis induced by high glucose via secretion of epithelial growth factor. *Stem Cell Research & Therapy*, 4(5), 103. doi:10.1186/scrt314

- Li, H., Jiang, Y., Jiang, X., Guo, X., Ning, H., Li, Y., ... Mao, N. (2014). CCR7 guides migration of mesenchymal stem cell to secondary lymphoid organs: a novel approach to separate GvHD from GvL effect. *Stem Cells*, 32(7), 1890–1903. doi:10.1002/stem.1656
- Liang, X., Ding, Y., Zhang, Y., Tse, H., & Lian, Q. (2014). Paracrine mechanisms of mesenchymal stem cell-based therapy: current status and perspectives. *Cell Transplantation*, 23, 1045–1059. doi:10.3727/096368913X667709
- Lim, J.-Y., Park, M.-J., Im, K.-I., Kim, N., Jeon, E.-J., Kim, E.-J., ... Cho, S.-G. (2014). Combination cell therapy using mesenchymal stem cells and regulatory T-cells provides a synergistic immunomodulatory effect associated with reciprocal regulation of Th1/Th2 and Th17/Treg cells in a murine acute graft-versus-host disease model. *Cell Transplantation*, 23(6), 703–14. doi:10.3727/096368913X664577
- Linero, I., & Chaparro, O. (2014). Paracrine effect of mesenchymal stem cells derived from human adipose tissue in bone regeneration. *PloS One*, 9(9), 1–12. doi:10.1371/journal.pone.0107001
- Liu, G., Zhang, Y., Liu, B., Sun, J., Li, W., & Cui, L. (2013). Bone regeneration in a canine cranial model using allogeneic adipose derived stem cells and coral scaffold. *Biomaterials*, 34(11), 2655–64. doi:10.1016/j.biomaterials.2013.01.004
- Liu, L. N., Wang, G., Hendricks, K., Lee, K., Bohnlein, E., Junker, U., & Mosca, J. D. (2013). Comparison of drug and cell-based delivery: engineered adult mesenchymal stem cells expressing soluble tumor necrosis factor receptor ii prevent arthritis in mouse and rat animal models. *Stem Cells Translational Medicine*, 2(5), 362–375. doi:10.5966/sctm.2012-0135
- Liu, X., Zheng, P., Wang, X., Dai, G., Cheng, H., Zhang, Z., ... An, Y. (2014). A preliminary evaluation of efficacy and safety of Wharton's jelly mesenchymal stem cell transplantation in patients with type 2 diabetes mellitus. *Stem Cell Research & Therapy*, 5, 57. doi:10.1186/srct446
- Liu, Y., Mu, R., Wang, S., Long, L., Liu, X., Li, R., ... Li, Z. (2010). Therapeutic potential of human umbilical cord mesenchymal stem cells in the treatment of rheumatoid arthritis. *Arthritis Research & Therapy*, 12(6), 1–13. doi:10.1186/ar3187
- Liu, Y., Wu, J., Zhu, Y., & Han, J. (2014). Therapeutic application of mesenchymal stem cells in bone and joint diseases. *Clinical and Experimental Medicine*, 14(1), 13–24. doi:10.1007/s10238-012-0218-1

- Liu, Z.-J., Zhuge, Y., & Velazquez, O. C. (2009). Trafficking and differentiation of mesenchymal stem cells. *Journal of Cellular Biochemistry*, *106*(6), 984–91. doi:10.1002/jcb.22091
- Ly, S., Cheng, J., Sun, A., Li, J., Wang, W., Guan, G., ... Su, M. (2014). Mesenchymal stem cells transplantation ameliorates glomerular injury in streptozotocin-induced diabetic nephropathy in rats via inhibiting oxidative stress. *Diabetes Research and Clinical Practice*, *104*, 143–54. doi:10.1016/j.diabres.2014.01.011
- Ly, S.-S., Liu, G., Wang, J.-P., Wang, W.-W., Cheng, J., Sun, A.-L., ... Guan, G.-J. (2013). Mesenchymal stem cells transplantation ameliorates glomerular injury in streptozotocin-induced diabetic nephropathy in rats via inhibiting macrophage infiltration. *International Immunopharmacology*, *17*, 275–82. doi:10.1016/j.intimp.2013.05.031
- Madeira, C., Ribeiro, S. C., Pinheiro, I. S. M., Martins, S. a M., Andrade, P. Z., da Silva, C. L., & Cabral, J. M. S. (2011). Gene delivery to human bone marrow mesenchymal stem cells by microporation. *Journal of Biotechnology*, *151*(1), 130–6. doi:10.1016/j.jbiotec.2010.11.002
- Mashayekhan, S., Hajiabbas, M., & Fallah, A. (2013). Stem cells in tissue engineering. In D. D. Bhartiya (Ed.), *Pluripotent Stem Cells*. InTech. doi:10.5772/54371
- Matar, A. a, & Chong, J. J. (2014). Stem cell therapy for cardiac dysfunction. *SpringerPlus*, *3*, 440. doi:10.1186/2193-1801-3-440
- Menon, L. G., Kelly, K., Yang, H. W., Kim, S.-K., Black, P. M., & Carroll, R. S. (2009). Human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells expressing S-TRAIL as a cellular delivery vehicle for human glioma therapy. *Stem Cells*, *27*, 2320–2330.
- Menon, L. G., Shi, V. J., & Carroll, R. S. (2009). Mesenchymal stromal cells as a drug delivery system. In *StemBook*. doi:10.3824/stembook.1.35.1
- Meretoja, V. V., Dahlin, R. L., Kasper, F. K., & Mikos, A. G. (2012). Enhanced chondrogenesis in co-cultures with articular chondrocytes and mesenchymal stem cells. *Biomaterials*, *33*(27), 6362–9. doi:10.1016/j.biomaterials.2012.05.042
- Meretoja, V. V., Dahlin, R. L., Wright, S., Kasper, F. K., & Mikos, A. G. (2013). The effect of hypoxia on the chondrogenic differentiation of co-cultured articular chondrocytes and mesenchymal stem cells in scaffolds. *Biomaterials*, *34*(17), 4266–73. doi:10.1016/j.biomaterials.2013.02.064
- Mesoblast provides update on clinical programs of prochymal for crohn's disease and acute graft versus host disease. (2014, 28 de abril). Consultado em 3 de outubro de

- 2014, disponível em <http://globenewswire.com/news-release/2014/04/29/630744/10078747/en/Mesoblast-Provides-Update-on-Clinical-Programs-of-Prochymal-for-Crohn-s-Disease-and-Acute-Graft-Versus-Host-Disease.html>
- Midkine. (s.d.). Consultado em 8 de outubro de 2014, disponível em <http://www.springerreference.com/docs/html/chapterdbid/175399.html>
- Mielcarek, M., Storb, R., Georges, G. E., Golubev, L., Nikitine, A., Hwang, B., ... Torok-Storb, B. (2011). Mesenchymal stromal cells fail to prevent acute graft-versus-host disease and graft rejection after dog-leukocyte-antigen haploidentical bone marrow transplantation. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, 17(2), 214–225. doi:10.1016/j.bbmt.2010.08.015.
- Miranda, N., Ferreira, I., Guimarães, A., Teixeira, G., Fernandez, E., Lobato, C., ... Abecasis, M. (2008, novembro). *Tratamento da doença de enxerto contra hospedeiro (GVHD) aguda refractária a corticóides com infusões de células estaminais mesenquimatosas*. Poster apresentado na Reunião Anual da Sociedade Portuguesa de Hematologia, Lisboa.
- Mohyeddin Bonab, M., Mohajeri, M., Sahraian, M. A., Yazdanifar, M., Aghsaie, A., Farazmand, A., & Nikbin, B. (2013). Evaluation of cytokines in multiple sclerosis patients treated with mesenchymal stem cells. *Archives of Medical Research*, 44(4), 266–72. doi:10.1016/j.arcmed.2013.03.007
- Mohyeldin, A., Garzón-Muvdi, T., & Quiñones-Hinojosa, A. (2010). Oxygen in stem cell biology: a critical component of the stem cell niche. *Cell Stem Cell*, 7(2), 150–61. doi:10.1016/j.stem.2010.07.007
- Moll, G., Alm, J. J., Davies, L. C., Bahr, L. von, Heldring, N., Stenbeck-Funke, L., ... Blanc, K. Le. (2014). Do cryopreserved mesenchymal stromal cells display impaired immunomodulatory and therapeutic properties? *Stem Cells*, 32(9), 2430–2442. doi:10.1002/stem.1729
- Moloney, T. C., Rooney, G. E., Barry, F. P., Howard, L., & Dowd, E. (2010). Potential of rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells as vehicles for delivery of neurotrophins to the Parkinsonian rat brain. *Brain Research*, 1359, 33–43. doi:10.1016/j.brainres.2010.08.040
- Monnerat-Cahli, G., Trentin-Sonoda, M., Guerra, B., Manso, G., Ferreira, A. C. F., Silva, D. L. S. G., ... Medei, E. (2014). Bone marrow mesenchymal stromal cells rescue

- cardiac function in streptozotocin-induced diabetic rats. *International Journal of Cardiology*, 171(2), 199–208. doi:10.1016/j.ijcard.2013.12.013
- Morigi, M., Imberti, B., Zoja, C., Corna, D., Tomasoni, S., Abbate, M., ... Remuzzi, G. (2004). Mesenchymal stem cells are renotropic, helping to repair the kidney and improve function in acute renal failure. *Journal of the American Society of Nephrology*, 15(7), 1794–1804. doi:10.1097/01.ASN.0000128974.07460.34
- Mundra, V., Gerling, I. C., & Mahato, R. I. (2013). Mesenchymal stem cell-based therapy. *Molecular Pharmaceutics*, 10, 77–89. doi:10.1021/mp3005148
- Munoz, J. L., Bliss, S. a, Greco, S. J., Ramkissoon, S. H., Ligon, K. L., & Rameshwar, P. (2013). Delivery of functional anti-miR-9 by mesenchymal stem cell-derived exosomes to glioblastoma multiforme cells conferred chemosensitivity. *Molecular Therapy - Nucleic Acids*, 2, 1–11. doi:10.1038/mtna.2013.60
- Muramatsu, T. (2010). Midkine, a heparin-binding cytokine with multiple roles in development, repair and diseases. *Proceedings of the Japan Academy, Series B*, 86(4), 410–425. doi:10.2183/pjab.86.410
- Muroi, K., Miyamura, K., Ohashi, K., Murata, M., Eto, T., Kobayashi, N., ... Ozawa, K. (2013). Unrelated allogeneic bone marrow-derived mesenchymal stem cells for steroid-refractory acute graft-versus-host disease: a phase I/II study. *International Journal of Hematology*, 98(2), 206–13. doi:10.1007/s12185-013-1399-4
- Myers, T. J., Granero-molto, F., Longobardi, L., Li, T., Yan, Y., & Spagnoli, A. (2010). Mesenchymal stem cells at the intersection of cell and gene therapy. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 10(12), 1663–1679. doi:10.1517/14712598.2010.531257
- Myers, T., Yan, Y., Granero-Molto, F., Weis, J., Longobardi, L., Li, T., ... Spagnoli, A. (2012). Systemically delivered insulin-like growth factor-I enhances mesenchymal stem cell-dependent fracture healing. *Growth Factors*, 30(4), 230–241. doi:10.3109/08977194.2012.683188
- Na, L., Qian, Z., Haiyan, Q., Chen, J., Yuejin, Y., & Runlin, G. (2014). Atorvastatin induces autophagy of mesenchymal stem cells under hypoxia and serum deprivation conditions by activating the mitogenactivated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase pathway. *Chinese Medical Journal*, 127(6), 1046–1051. doi:10.3760/cma.j.issn.0366-6999.20132638
- Naderi, H., Matin, M. M., & Bahrami, A. R. (2011). Critical issues in tissue engineering: biomaterials, cell sources, angiogenesis, and drug delivery systems. *Journal of Biomaterials Applications*, 26(4), 383–417. doi:10.1177/0885328211408946

- Nakagawa, H., Akita, S., Fukui, M., Fujii, T., & Akino, K. (2005). Human mesenchymal stem cells successfully improve skin-substitute wound healing. *The British Journal of Dermatology*, *153*(1), 29–36. doi:10.1111/j.1365-2133.2005.06554.x
- Navone, S. E., Pascucci, L., Dossena, M., Ferri, A., Invernici, G., Acerbi, F., ... Parati, E. A. (2014). Decellularized silk fibroin scaffold primed with adipose mesenchymal stromal cells improves wound healing in diabetic mice. *Stem Cell Research & Therapy*, *5*(1), 7. doi:10.1186/scrt396
- Neirinckx, V., Marquet, A., Coste, C., Rogister, B., & Wislet-Gendebien, S. (2013). Adult bone marrow neural crest stem cells and mesenchymal stem cells are not able to replace lost neurons in acute MPTP-lesioned mice. *PloS One*, *8*(5), 1–10. doi:10.1371/journal.pone.0064723
- Nevruz, O., Avcu, F., Ural, a U., Pekel, A., Dirican, B., Safalı, M., ... Sengül, A. (2013). Immunosuppressive effects of multipotent mesenchymal stromal cells on graft-versus-host disease in rats following allogeneic bone marrow transplantation. *Turkish Journal of Haematology*, *30*(3), 256–62. doi:10.4274/Tjh.2013.0032
- Nguyen, P. T., Nguyen, A. T., Nguyen, N. T., Nguyen, N. T., Duong, T. T., Hai, N., & Phan, N. K. (2014). Human umbilical cord blood derived mesenchymal stem cells were differentiated into pancreatic endocrine cell by Pdx-1 electrotransfer. *Biomedical Research and Therapy*, *1*(2), 50–56.
- Nöth, U., Steinert, A. F., & Tuan, R. S. (2008). Technology insight: adult mesenchymal stem cells for osteoarthritis therapy. *Nature Clinical Practice Rheumatology*, *4*(7), 371–80. doi:10.1038/ncprheum0816
- O'Loughlin, A., Kulkarni, M., Creane, M., Vaughan, E. E., Mooney, E., Shaw, G., ... O'Brien, T. (2013). Topical administration of allogeneic mesenchymal stromal cells seeded in a collagen scaffold augments wound healing and increases angiogenesis in the diabetic rabbit ulcer. *Diabetes*, *62*(7), 2588–94. doi:10.2337/db12-1822
- Ock, S.-A., & Rho, G.-J. (2011). Effect of dimethyl sulfoxide (DMSO) on cryopreservation of porcine mesenchymal stem cells (pMSCs). *Cell Transplantation*, *20*(8), 1231–9. doi:10.3727/096368910X552835
- Oliveira, S. M., Amaral, I. F., Barbosa, M. a, & Teixeira, C. C. (2009). Engineering endochondral bone: in vitro studies. *Tissue Engineering Part A*, *15*(3), 625–34. doi:10.1089/ten.tea.2008.0051
- Otsuru, S., Gordon, P. L., Shimono, K., Jethva, R., Marino, R., Phillips, C. L., ... Horwitz, E. M. (2012). Transplanted bone marrow mononuclear cells and MSCs impart clinical

- benefit to children with osteogenesis imperfecta through different mechanisms. *Blood*, *120*(9), 1933–41. doi:10.1182/blood-2011-12-400085
- Overview of coronary artery disease: coronary artery disease. (s.d.). Consultado em 16 de setembro de 2014, disponível em http://www.merckmanuals.com/professional/cardiovascular_disorders/coronary_artery_disease/overview_of_coronary_artery_disease.html#top
- Pagliari, S., Tirella, A., Ahluwalia, A., Duim, S., Goumans, M.-J., Aoyagi, T., & Forte, G. (2014). A multistep procedure to prepare pre-vascularized cardiac tissue constructs using adult stem cells, dynamic cell cultures, and porous scaffolds. *Frontiers in Physiology*, *5*(210), 1–12. doi:10.3389/fphys.2014.00210
- Pan, Q., Qin, X., Ma, S., Wang, H., Cheng, K., Song, X., ... Cao, F. (2014). Myocardial protective effect of extracellular superoxide dismutase gene modified bone marrow mesenchymal stromal cells on infarcted mice hearts. *Theranostics*, *4*(5), 475–86. doi:10.7150/thno.7729
- Parekkadan, B., & Milwid, J. M. (2010). Mesenchymal stem cells as therapeutics. *Annual Review of Biomedical Engineering*, *(12)*, 87–117. doi:10.1146/annurev-bioeng-070909-105309.Mesenchymal
- Park, H.-J., Shin, J. Y., Lee, B. R., Kim, H. O., & Lee, P. H. (2012). Mesenchymal stem cells augment neurogenesis in the subventricular zone and enhance differentiation of neural precursor cells into dopaminergic neurons in the substantia nigra of a parkinsonian model. *Cell Transplantation*, *21*(8), 1629–40. doi:10.3727/096368912X640556
- Park, J. H., Hwang, I., Hwang, S. H., Han, H., & Ha, H. (2012). Human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells prevent diabetic renal injury through paracrine action. *Diabetes Research and Clinical Practice*, *98*(3), 465–73. doi:10.1016/j.diabres.2012.09.034
- Payne, N. L., Sun, G., McDonald, C., Layton, D., Moussa, L., Emerson-Webber, A., ... Bernard, C. C. a. (2013). Distinct immunomodulatory and migratory mechanisms underpin the therapeutic potential of human mesenchymal stem cells in autoimmune demyelination. *Cell Transplantation*, *22*(8), 1409–25. doi:10.3727/096368912X657620
- Pendleton, C., Li, Q., Chesler, D. a, Yuan, K., Guerrero-Cazares, H., & Quinones-Hinojosa, A. (2013). Mesenchymal stem cells derived from adipose tissue vs bone

- marrow: in vitro comparison of their tropism towards gliomas. *PloS One*, 8(3), 1–7. doi:10.1371/journal.pone.0058198
- Pham, P. Van, Nguyen, P. T.-M., Nguyen, A. T.-Q., Pham, V. M., Bui, A. N.-T., Dang, L. T.-T., ... Phan, N. K. (2014). Improved differentiation of umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells into insulin-producing cells by PDX-1 mRNA transfection. *Differentiation*, 1–9. doi:10.1016/j.diff.2014.08.001
- Pittenger, M. F., Mackay, a M., Beck, S. C., Jaiswal, R. K., Douglas, R., Mosca, J. D., ... Marshak, D. R. (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science (New York, N.Y.)*, 284(5411), 143–7. doi: 10.1126/science.284.5411.143
- Polchow, B., Kebbel, K., Schmiedeknecht, G., Reichardt, A., Henrich, W., Hetzer, R., & Lueders, C. (2012). Cryopreservation of human vascular umbilical cord cells under good manufacturing practice conditions for future cell banks. *Journal of Translational Medicine*, 10, 98. doi:10.1186/1479-5876-10-98
- Porada, C. D., & Almeida-Porada, G. (2010). Mesenchymal stem cells as therapeutics and vehicles for gene and drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 62(12), 1156–1166. doi:10.1016/j.addr.2010.08.010.Mesenchymal
- Prasad, V. K., Lucas, K. G., Kleiner, G. I., Talano, J. A. M., Jacobsohn, D., Broadwater, G., ... Kurtzberg, J. (2011). Efficacy and safety of ex vivo cultured adult human mesenchymal stem cells (Prochymal™) in pediatric patients with severe refractory acute graft-versus-host disease in a compassionate use study. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, 17(4), 534–41. doi:10.1016/j.bbmt.2010.04.014
- Prochymal® graft versus host disease. (s.d.). Consultado em 11 de setembro de 2014, disponível em http://www.osiris.com/prod_gvhd.php
- Prockop, D. J., Prockop, S. E., & Bertoncello, I. (2014). Are clinical trials with mesenchymal stem/ progenitor cells (MSCs) too far ahead of the science? Lessons from experimental hematology. *Stem Cells*, 1–8. doi:10.1002/stem.1806
- Qi, B., Yu, A., Zhu, S., Zhou, M., & Wu, G. (2013). Chitosan/poly(vinyl alcohol) hydrogel combined with Ad-hTGF-β1 transfected mesenchymal stem cells to repair rabbit articular cartilage defects. *Experimental Biology and Medicine*, 238(1), 23–30. doi:10.1258/ebm.2012.012223
- Quality, preclinical and clinical aspects of gene transfer medicinal products - annex on non-clinical testing for inadvertent germline transmission of gene transfer vectors.* (2005). União Europeia: Committee for Medicinal Products for Human Use.

- Quarto, R., Mastrogiacomo, M., Cancedda, R., Kutepov, S., Mukhachev, V., Lavroukov, A., ... Marcacci, M. (2001). Repair of large bone defects with the use of autologous bone marrow stromal cells. *The New England Journal of Medicine*, *344*(5), 385–6. doi:10.1056/NEJM200102013440516
- Rackham, C. L., Chagastelles, P. C., Nardi, N. B., Hauge-Evans, a C., Jones, P. M., & King, a J. F. (2011). Co-transplantation of mesenchymal stem cells maintains islet organisation and morphology in mice. *Diabetologia*, *54*(5), 1127–35. doi:10.1007/s00125-011-2053-4
- Rackham, C. L., Dhadda, P. K., Chagastelles, P. C., Simpson, S. J. S., Dattani, A. A., Bowe, J. E., ... King, A. J. F. (2013). Pre-culturing islets with mesenchymal stromal cells using a direct contact configuration is beneficial for transplantation outcome in diabetic mice. *Cytotherapy*, *15*, 449–59. doi:10.1016/j.jcyt.2012.11.008
- Rackham, C. L., Jones, P. M., & King, A. J. F. (2013). Maintenance of islet morphology is beneficial for transplantation outcome in diabetic mice. *PloS One*, *8*(2), e57844. doi:10.1371/journal.pone.0057844
- Rahbarghazi, R., Nassiri, S. M., Ahmadi, S. H., Mohammadi, E., Rabbani, S., Araghi, A., & Hosseinkhani, H. (2014). Dynamic induction of pro-angiogenic milieu after transplantation of marrow-derived mesenchymal stem cells in experimental myocardial infarction. *International Journal of Cardiology*, *173*(3), 453–66. doi:10.1016/j.ijcard.2014.03.008
- Rahmati, S., Alijani, N., & Kadivar, M. (2013). In vitro generation of glucose-responsive insulin producing cells using lentiviral based pdx-1 gene transduction of mouse (C57BL/6) mesenchymal stem cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *437*, 413–9. doi:10.1016/j.bbrc.2013.06.092
- Rajasekhar, V. K. (2009). *Regulatory networks in stem cells*. Ilustrada. Springer Science & Business Media. Disponível em <http://books.google.com/books?id=SnALU9ISISEC&pgis=1>
- Remberger, M., & Ringdén, O. (2012). Treatment of severe acute graft-versus-host disease with mesenchymal stromal cells: a comparison with non-MSC treated patients. *International Journal of Hematology*, *96*(6), 822–4. doi:10.1007/s12185-012-1218-3
- Ren, Z., Wang, J., Wang, S., Zou, C., Li, X., Guan, Y., ... Zhang, Y. A. (2013). Autologous transplantation of GDNF-expressing mesenchymal stem cells protects against MPTP-induced damage in cynomolgus monkeys. *Scientific Reports*, *3*, 1–11. doi:10.1038/srep02786

- Richardson, J. D., Bertaso, A. G., Psaltis, P. J., Frost, L., Carbone, A., Paton, S., ... Worthley, S. G. (2013). Impact of timing and dose of mesenchymal stromal cell therapy in a preclinical model of acute myocardial infarction. *Journal of Cardiac Failure*, *19*(5), 342–53. doi:10.1016/j.cardfail.2013.03.011
- Richardson, J. D., Psaltis, P. J., Frost, L., Paton, S., Carbone, A., Bertaso, A. G., ... Worthley, S. G. (2014). Incremental benefits of repeated mesenchymal stromal cell administration compared with solitary intervention after myocardial infarction. *Cytotherapy*, *16*(4), 460–70. doi:10.1016/j.jcyt.2013.07.016
- Roche, E. T., Hastings, C. L., Lewin, S. a, Shvartsman, D. E., Brudno, Y., Vasilyev, N. V, ... Mooney, D. J. (2014). Comparison of biomaterial delivery vehicles for improving acute retention of stem cells in the infarcted heart. *Biomaterials*, *35*(25), 6850–8. doi:10.1016/j.biomaterials.2014.04.114
- Rodriguez, A.-M., Elabd, C., Amri, E.-Z., Ailhaud, G., & Dani, C. (2005). The human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Biochimie*, *87*(1), 125–8. doi:10.1016/j.biochi.2004.11.007
- Røsland, G. V., Svendsen, A., Torsvik, A., Sobala, E., McCormack, E., Immervoll, H., ... Schichor, C. (2009). Long-term cultures of bone marrow-derived human mesenchymal stem cells frequently undergo spontaneous malignant transformation. *Cancer Research*, *69*(13), 5331–9. doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-4630
- Rubio, D., Garcia-castro, J., Martín, M. C., Fuente, R. De, Cigudosa, J. C., Lloyd, A. C., & Bernad, A. (2005). Spontaneous human adult stem cell transformation. *Cancer Research*, *65*, 3035–3039. doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-4194
- Salem, H. K., & Thiemermann, C. (2010). Mesenchymal stromal cells: current understanding and clinical status. *Stem Cells*, *28*, 585–96. doi:10.1002/stem.269
- Sánchez-Guijo, F., Caballero-Velázquez, T., López-Villar, O., Redondo, A., Parody, R., Martínez, C., ... Pérez-Simon, J. A. (2014). Sequential third-party mesenchymal stromal cell therapy for refractory acute graft-versus-host disease. *Biology of Blood and Marrow Transplantation : Journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation*, 1–6. doi:10.1016/j.bbmt.2014.06.015
- Santos Nascimento, D., Mosqueira, D., Sousa, L. M., Teixeira, M., Filipe, M., Resende, T. P., ... Pinto-do-Ó, P. (2014). Human umbilical cord tissue-derived mesenchymal stromal cells attenuate remodeling after myocardial infarction by proangiogenic, antiapoptotic, and endogenous cell-activation mechanisms. *Stem Cell Research & Therapy*, *5*(1), 1–14. doi:10.1186/scrt394

- Santos, J. L., Pandita, D., Rodrigues, J., Pêgo, A. P., Granja, P. L., & Tomás, H. (2011). Non-viral gene delivery to mesenchymal stem cells: methods, strategies and application in bone tissue engineering and regeneration. *Current Gene Therapy*, *11*(1), 46–57.
- Sarugaser, R., Hanoun, L., Keating, A., Stanford, W. L., & Davies, J. E. (2009). Human mesenchymal stem cells self-renew and differentiate according to a deterministic hierarchy. *PloS One*, *4*(8), 6498. doi:10.1371/journal.pone.0006498
- Satija, N. K., Singh, V. K., Verma, Y. K., Gupta, P., Sharma, S., Afrin, F., ... Gurudutta, G. U. (2009). Mesenchymal stem cell-based therapy: a new paradigm in regenerative medicine. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, *13*(11-12), 4385–402. doi:10.1111/j.1582-4934.2009.00857.x
- Scalinci, S. Z., Scorolli, L., Corradetti, G., Domanico, D., Vingolo, E. M., Meduri, A., ... Siravo, D. (2011). Potential role of intravitreal human placental stem cell implants in inhibiting progression of diabetic retinopathy in type 2 diabetes: neuroprotective growth factors in the vitreous. *Clinical Ophthalmology*, *5*, 691–6. doi:10.2147/OPHTH.S21161
- Sensebé, L., Gadelorge, M., & Fleury-Cappellesso, S. (2013). Production of mesenchymal stromal/stem cells according to good manufacturing practices: a review. *Stem Cell Research & Therapy*, *4*(66), 1–6. doi:10.1186/scrt217
- Shi, Y., Hu, G., Su, J., Li, W., Chen, Q., Shou, P., ... Ren, G. (2010). Mesenchymal stem cells: a new strategy for immunosuppression and tissue repair. *Cell Research*, *20*(5), 510–8. doi:10.1038/cr.2010.44
- Si, Y.-L., Zhao, Y.-L., Hao, H.-J., Fu, X.-B., & Han, W.-D. (2011). MSCs: Biological characteristics, clinical applications and their outstanding concerns. *Ageing Research Reviews*, *10*(1), 93–103. doi:10.1016/j.arr.2010.08.005
- Siegel, G., Krause, P., Wöhrle, S., Nowak, P., Ayturan, M., Kluba, T., ... Schäfer, R. (2012). Bone marrow-derived human mesenchymal stem cells express cardiomyogenic proteins but do not exhibit functional cardiomyogenic differentiation potential. *Stem Cells and Development*, *21*(13), 2457–70. doi:10.1089/scd.2011.0626
- Somoza, R., Juri, C., Baes, M., Wyneken, U., & Rubio, F. J. (2010). Intranigral transplantation of epigenetically induced BDNF-secreting human mesenchymal stem cells: implications for cell-based therapies in Parkinson's disease. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, *16*(11), 1530–40. doi:10.1016/j.bbmt.2010.06.006

- Song, L., Yang, Y.-J., Dong, Q.-T., Qian, H.-Y., Gao, R.-L., Qiao, S.-B., ... Gersh, B. J. (2013). Atorvastatin enhance efficacy of mesenchymal stem cells treatment for swine myocardial infarction via activation of nitric oxide synthase. *PloS One*, 8(5), 1–12. doi:10.1371/journal.pone.0065702
- Sordi, V., & Piemonti, L. (2010). Mesenchymal stem cells as feeder cells for pancreatic islet transplants. *The Review of Diabetic Studies*, 7(2), 132–43. doi:10.1900/RDS.2010.7.132
- Stone, K. R., Walgenbach, A. W., Freyer, A., Turek, T. J., & Speer, D. P. (2006). Articular cartilage paste grafting to full-thickness articular cartilage knee joint lesions: a 2- to 12-year follow-up. *Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery*, 22(3), 291–9. doi:10.1016/j.arthro.2005.12.051
- Ströjby, S., Eberstål, S., Svensson, A., Fritzell, S., Bexell, D., Siesjö, P., ... Bengzon, J. (2014). Intratumorally implanted mesenchymal stromal cells potentiate peripheral immunotherapy against malignant rat gliomas. *Journal of Neuroimmunology*, 274(1-2), 240–3. doi:10.1016/j.jneuroim.2014.07.014
- Sun, C.-K., Zhen, Y.-Y., Leu, S., Tsai, T.-H., Chang, L.-T., Sheu, J.-J., ... Yip, H.-K. (2014). Direct implantation versus platelet-rich fibrin-embedded adipose-derived mesenchymal stem cells in treating rat acute myocardial infarction. *International Journal of Cardiology*, 173(3), 410–23. doi:10.1016/j.ijcard.2014.03.015
- Sun, W., Zhang, K., Liu, G., Ding, W., Zhao, C., Xie, Y., ... Zhao, J. (2014). Sox9 gene transfer enhanced regenerative effect of bone marrow mesenchymal stem cells on the degenerated intervertebral disc in a rabbit model. *PloS One*, 9(4), 1–11. doi:10.1371/journal.pone.0093570
- Sundin, M., Barrett, A. J., Ringdén, O., Uzunel, M., Lönnies, H., Dackland, L., ... Blanc, K. Le. (2009). HSCT recipients have specific tolerance to MSC but not to the MSC donor. *Journal of Immunotherapy*, 32(7), 755–764. doi:10.1097/CJI.0b013e3181ab1807.HSCT
- Tarte, K., Gaillard, J., Lataillade, J.-J., Fouillard, L., Becker, M., Mossafa, H., ... Sensebé, L. (2010). Clinical-grade production of human mesenchymal stromal cells: occurrence of aneuploidy without transformation. *Blood*, 115(8), 1549–53. doi:10.1182/blood-2009-05-219907
- Thirumala, S., Goebel, W. S., & Woods, E. J. (2009). Clinical grade adult stem cell banking. *Organogenesis*, 5(3), 143–54. doi: 10.4161/org.5.3.9811

- Thomas, M. G., Stone, L., Evill, L., Ong, S., Ziman, M., & Hool, L. (2011). Bone marrow stromal cells as replacement cells for Parkinson's disease: generation of an anatomical but not functional neuronal phenotype. *Translational Research*, 157(2), 56–63. doi:10.1016/j.trsl.2010.11.001
- Tobin, L. M., Healy, M. E., English, K., & Mahon, B. P. (2013). Human mesenchymal stem cells suppress donor CD4+ T cell proliferation and reduce pathology in a humanized mouse model of acute graft-versus-host disease. *Clinical and Experimental Immunology*, 172(2), 333–48. doi:10.1111/cei.12056
- Todd, G. P., Leroux, M. A., & Danilkovitch-miagkova, A. (2011). Mesenchymal stem cells as vehicles for targeted therapies. In D. I. Kapetanović (Ed.), *Drug Discovery and Development - Present and Future* (Vol. 11, pp. 489–528). InTech.
- Tondreau, T., Meuleman, N., Delforge, A., Dejeneffe, M., Leroy, R., Massy, M., ... Lagneaux, L. (2005). Mesenchymal stem cells derived from CD133-positive cells in mobilized peripheral blood and cord blood: proliferation, Oct4 expression, and plasticity. *Cytotherapy*, 23(8), 1105–12. doi:10.1634/stemcells.2004-0330
- Torsvik, A., Røslund, G. V, Svendsen, A., Molven, A., Immervoll, H., McCormack, E., ... Bjerkvig, R. (2010). Spontaneous malignant transformation of human mesenchymal stem cells reflects cross-contamination: putting the research field on track - letter. *Cancer Research*, 70(15), 6393–6. doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-1305
- Toupet, K., Maumus, M., Peyrafitte, J.-A., Bourin, P., van Lent, P. L. E. M., Ferreira, R., ... Noël, D. (2013). Long-term detection of human adipose-derived mesenchymal stem cells after intraarticular injection in SCID mice. *Arthritis and Rheumatism*, 65(7), 1786–94. doi:10.1002/art.37960
- Van der Stok, J., Koolen, M. K. E., Jahr, H., Kops, N., Waarsing, J. H., Weinans, H., & van der Jagt, O. P. (2014). Chondrogenically differentiated mesenchymal stromal cell pellets stimulate endochondral bone regeneration in critical-sized bone defects. *European Cells & Materials*, 27, 137–48. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24554271>
- Vanleene, M., Saldanha, Z., Cloyd, K. L., Jell, G., Bou-Gharios, G., Bassett, J. H. D., ... Shefelbine, S. J. (2011). Transplantation of human fetal blood stem cells in the osteogenesis imperfecta mouse leads to improvement in multiscale tissue properties. *Blood*, 117(3), 1053–60. doi:10.1182/blood-2010-05-287565

- Velpula, K. K., Dasari, V. R., & Rao, J. S. (2012). The homing of human cord blood stem cells to sites of inflammation - unfolding mysteries of a novel therapeutic paradigm for glioblastoma multiforme. *Cell Cycle*, *11*, 2303–2313. doi:10.4161/cc.20766
- Venkataramana, N. K., Kumar, S. K. V, Balaraju, S., Radhakrishnan, R. C., Bansal, A., Dixit, A., ... Totey, S. M. (2010). Open-labeled study of unilateral autologous bone-marrow-derived mesenchymal stem cell transplantation in Parkinson's disease. *Translational Research*, *155*(2), 62–70. doi:10.1016/j.trsl.2009.07.006
- Venkataramana, N. K., Pal, R., Rao, S. a V, Naik, A. L., Jan, M., Nair, R., ... Chaitanya, K. (2012). Bilateral transplantation of allogenic adult human bone marrow-derived mesenchymal stem cells into the subventricular zone of Parkinson's disease: a pilot clinical study. *Stem Cells International*, 1–12. doi:10.1155/2012/931902
- Viswanathan, S., Keating, A., Deans, R., Hematti, P., Prockop, D., Stroncek, D. F., ... Rao, M. S. (2014). Soliciting strategies for developing cell-based reference materials to advance mesenchymal stromal cell research and clinical translation. *Stem Cells and Development*, *23*(11), 1157–67. doi:10.1089/scd.2013.0591
- Wan, J., Xia, L., Liang, W., Liu, Y., & Cai, Q. (2013). Transplantation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells promotes delayed wound healing in diabetic rats. *Journal of Diabetes Research*, 1–11. doi:10.1155/2013/647107
- Wang, S., Li, Y., Zhao, J., Zhang, J., & Huang, Y. (2013). Mesenchymal stem cells ameliorate podocyte injury and proteinuria in a type 1 diabetic nephropathy rat model. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, *19*(4), 538–46. doi:10.1016/j.bbmt.2013.01.001
- Wang, S., Qu, X., & Zhao, R. C. (2012). Clinical applications of mesenchymal stem cells. *Journal of Hematology & Oncology*, *5*(1), 19. doi:10.1186/1756-8722-5-19
- Wang, Y., Han, Z.-B. Z. C., & Song, Y.-P. (2012). Safety of mesenchymal stem cells for clinical application. *Stem Cells International*, 1–4. doi:10.1155/2012/652034
- Wei, X., Yang, X., Han, Z., Qu, F., Shao, L., & Shi, Y. (2013). Mesenchymal stem cells: a new trend for cell therapy. *Acta Pharmacologica Sinica*, *34*(6), 747–54. doi:10.1038/aps.2013.50
- Weng, J. Y., Du, X., Geng, S. X., Peng, Y. W., Wang, Z., Lu, Z. S., ... Xiang, a P. (2010). Mesenchymal stem cell as salvage treatment for refractory chronic GVHD. *Bone Marrow Transplantation*, *45*(12), 1732–40. doi:10.1038/bmt.2010.195

- Weyand, B., Dominici, M., Hass, R., Jacobs, R., & Kasper, C. (Eds.). (2013a). *Mesenchymal stem cells: basics and clinical application I*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. doi: 10.1007/978-3-642-35671-1
- Weyand, B., Dominici, M., Hass, R., Jacobs, R., & Kasper, C. (Eds.). (2013b). *Mesenchymal stem cells: basics and clinical application II*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. doi: 10.1007/978-3-642-37944-4
- Williams, A. R., Hatzistergos, K. E., Addicott, B., McCall, F., Carvalho, D., Suncion, V., ... Hare, J. M. (2013). Enhanced effect of combining human cardiac stem cells and bone marrow mesenchymal stem cells to reduce infarct size and to restore cardiac function after myocardial infarction. *Circulation*, *127*(2), 213–23. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.112.131110
- Wong, R. S. Y. (2011). Mesenchymal stem cells: angels or demons? *Journal of Biomedicine & Biotechnology*, *2011*. doi:10.1155/2011/459510
- Wu, Y., Wang, Z., Cao, Y., Xu, L., Li, X., Liu, P., ... Han, Z. (2013). Cotransplantation of haploidentical hematopoietic and umbilical cord mesenchymal stem cells with a myeloablative regimen for refractory/relapsed hematologic malignancy. *Annals of Hematology*, *92*(12), 1675–84. doi:10.1007/s00277-013-1831-0
- Xi, J., Yan, X., Zhou, J., Yue, W., & Pei, X. (2013). Mesenchymal stem cells in tissue repairing and regeneration: Progress and future. *Burns & Trauma*, *1*(1), 13–20. doi:10.4103/2321-3868.113330
- Xie, J., Han, Z., Naito, M., Maeyama, A., Kim, S. H., Kim, Y. H., & Matsuda, T. (2010). Articular cartilage tissue engineering based on a mechano-active scaffold made of poly(L-lactide-co-ε-caprolactone): In vivo performance in adult rabbits. *Journal of Biomedical Materials Research Part B, Applied Biomaterials*, *94*(1), 80–8. doi:10.1002/jbm.b.31627
- Xing, L., Jiang, Y., Gui, J., Lu, Y., Gao, F., Xu, Y., & Xu, Y. (2013). Microfracture combined with osteochondral paste implantation was more effective than microfracture alone for full-thickness cartilage repair. *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy*, *21*(8), 1770–6. doi:10.1007/s00167-012-2031-5
- Xiong, Y.-Y., Fan, Q., Huang, F., Zhang, Y., Wang, Y., Chen, X.-Y., ... Liu, Q.-F. (2014). Mesenchymal stem cells versus mesenchymal stem cells combined with cord blood for engraftment failure after autologous hematopoietic stem cell transplantation: a pilot prospective, open-label, randomized trial. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, *20*(2), 236–42. doi:10.1016/j.bbmt.2013.11.002

- Xu, H., Yang, Y.-J., Qian, H.-Y., Tang, Y.-D., Wang, H., & Zhang, Q. (2011). Rosuvastatin treatment activates JAK-STAT pathway and increases efficacy of allogeneic mesenchymal stem cell transplantation in infarcted hearts. *Circulation Journal*, 75(6), 1476–1485. doi:10.1253/circj.CJ-10-1275
- Yagi, H., Soto-gutierrez, A., Parekkadan, B., Kitagawa, Y., Tompkins, G., Kobayashi, N., & Yarmush, M. L. (2010). Mesenchymal stem cells: mechanisms of immunomodulation and homing. *Cell Transplant*, 19(6), 667–679. doi:10.3727/096368910X508762.Mesenchymal
- Yan, M., Sun, M., Zhou, Y., Wang, W., He, Z., Tang, D., ... Li, H. (2013). Conversion of human umbilical cord mesenchymal stem cells in Wharton's jelly to dopamine neurons mediated by the Lmx1a and neurturin in vitro: potential therapeutic application for Parkinson's disease in a rhesus monkey model. *PloS One*, 8(5), 1–17. doi:10.1371/journal.pone.0064000
- Yang, C., Lei, D., Ouyang, W., Ren, J., Li, H., Hu, J., & Huang, S. (2014). Conditioned media from human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells and umbilical cord-derived mesenchymal stem cells efficiently induced the apoptosis and differentiation in human glioma cell lines in vitro. *BioMed Research International*, 1–13. doi:10.1155/2014/109389
- Yang, W.-H., Yang, C., Xue, Y.-Q., Lu, T., Reiser, J., Zhao, L.-R., & Duan, W.-M. (2013). Regulated expression of lentivirus-mediated GDNF in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells and its neuroprotection on dopaminergic cells in vitro. *PloS One*, 8(5), 1–12. doi:10.1371/journal.pone.0064389
- Yang, Y.-J., Qian, H.-Y., Huang, J., Li, J.-J., Gao, R.-L., Dou, K.-F., ... Geng, Y.-J. (2009). Combined therapy with simvastatin and bone marrow-derived mesenchymal stem cells increases benefits in infarcted swine hearts. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 29(12), 2076–82. doi:10.1161/ATVBAHA.109.189662
- Yang, Z., Li, K., Yan, X., Dong, F., & Zhao, C. (2010). Amelioration of diabetic retinopathy by engrafted human adipose-derived mesenchymal stem cells in streptozotocin diabetic rats. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*, 248(10), 1415–22. doi:10.1007/s00417-010-1384-z
- Yong, R. L., Shinojima, N., Fueyo, J., Gumin, J., Vecil, G. G., Marini, F. C., ... Lang, F. F. (2009). Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells for intravascular delivery of oncolytic adenovirus Δ 24-RGD to human gliomas. *Cancer Research*, 69(23), 8932–40. doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-3873

- Yousefi, F., Ebtekar, M., Soleimani, M., Soudi, S., & Hashemi, S. M. (2013). Comparison of in vivo immunomodulatory effects of intravenous and intraperitoneal administration of adipose-tissue mesenchymal stem cells in experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). *International Immunopharmacology*, *17*(3), 608–16. doi:10.1016/j.intimp.2013.07.016
- Zhang, Q., Wang, H., Yang, Y.-J., Dong, Q.-T., Wang, T.-J., Qian, H.-Y., ... Jin, C. (2014). Atorvastatin treatment improves the effects of mesenchymal stem cell transplantation on acute myocardial infarction: The role of the RhoA/ROCK/ERK pathway. *International Journal of Cardiology*, 1–10. doi:10.1016/j.ijcard.2014.07.071
- Zhang, Q., Yang, Y.-J., Wang, H., Dong, Q.-T., Wang, T.-J., Qian, H.-Y., & Xu, H. (2012). Autophagy activation: a novel mechanism of atorvastatin to protect mesenchymal stem cells from hypoxia and serum deprivation via AMP-activated protein kinase/mammalian target of rapamycin pathway. *Stem Cells and Development*, *21*(8), 1321–32. doi:10.1089/scd.2011.0684
- Zhang, Y., & Dou, Z. (2014). Under a nonadherent state, bone marrow mesenchymal stem cells can be efficiently induced into functional islet-like cell clusters to normalize hyperglycemia in mice: a control study. *Stem Cell Research & Therapy*, *5*, 66. doi:10.1186/scrt455
- Zhao, Q.-S., Xia, N., Zhao, N., Li, M., Bi, C.-L., Zhu, Q., ... Cheng, Z.-F. (2014). Localization of human mesenchymal stem cells from umbilical cord blood and their role in repair of diabetic foot ulcers in rats. *International Journal of Biological Sciences*, *10*(1), 80–9. doi:10.7150/ijbs.7237
- Zhao, R. C. (2013). *Essentials of mesenchymal stem cell biology and its clinical translation*. Revista. Dordrecht: Springer Science & Business Media. Disponível em <http://books.google.com/books?id=ycBEAAAAQBAJ&pgis=1>
- Zhao, S.-L., Zhang, Y.-J., Li, M.-H., Zhang, X.-L., & Chen, S.-L. (2014). Mesenchymal stem cells with overexpression of midkine enhance cell survival and attenuate cardiac dysfunction in a rat model of myocardial infarction. *Stem Cell Research & Therapy*, *5*(2), 37. doi:10.1186/scrt425
- Zhou, H., Guo, M., Bian, C., Sun, Z., Yang, Z., Zeng, Y., ... Zhao, R. C. (2010). Efficacy of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in the treatment of sclerodermatous chronic graft-versus-host disease: clinical report. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, *16*(3), 403–12. doi:10.1016/j.bbmt.2009.11.006

ANEXO A – POTENCIAL MECANISMO DE IMUNOMODULAÇÃO

Tabela A: Principais fatores mediadores da ação imunomoduladora das MSC em cada tipo de célula do Sistema Imunitário.

| Tipo de célula | Função no Sistema Imunitário | Fatores libertados | | Ação das MSC sobre as células | Aplicações clínicas (exemplos) | Referências Bibliográficas |
|-------------------|---|--------------------|--|--|--------------------------------|---|
| | | MSC | Células do SI | | | |
| Células T | Reconhecimento de antigénios, manutenção da auto-tolerância, lise das células infetadas, ativação de outros linfócitos e interação com células responsáveis pela resposta inata | (IFN- γ) | - | Balço das células Th1/Th2 com \uparrow Th2 | GvHD, EAE, RA | (Chase & Vemuri, 2012; Ghannam et al., 2010; Haddad, 2011) |
| | | IDO | \downarrow IL-2 | \downarrow proliferação e citotoxicidade | | |
| | | PGE2 | | \uparrow diferenciação em células Treg | | |
| | | HLA-G5 | \uparrow IL-10 (imDC) \uparrow TGF- β | \uparrow angiogénese após lesão | | |
| Células NK | Marcação e lise de células com ausência de expressão de MHC-I na sua superfície | TGF- β 1 | \downarrow IL-12, IL-15 | \downarrow proliferação e citotoxicidade | GvHD | (Chase & Vemuri, 2012; Ghannam et al., 2010; Haddad, 2011; Yagi et al., 2010) |
| | | HLA-G5 | e IFN- γ | | | |
| | | PGE2 | - | | | |
| | | IDO + PGE2 | - | | | |

Tabela A (Continuação): Principais fatores mediadores da ação imunomoduladora das MSC em cada tipo de célula do Sistema Imunitário.

| Tipo de célula | Função no Sistema Imunitário | Fatores libertados | | Ação das MSC sobre as células | Aplicações clínicas (exemplos) | Referências Bibliográficas |
|----------------------------|---|--------------------|--|---|---|--|
| | | MSC | Células do SI | | | |
| Células Dendríticas | Principal e mais potente tipo de APC | PGE2 IL-6 | ↓ CD40, CD80, CD83, CD86, IL-12 e TNF α ↑ IL-1 β e IL-10 | ↓ diferenciação de monócitos em DC (↓ MHC-II) | Prevenção da GvHD | (Ghannam et al., 2010; Mundra, Gerling, & Mahato, 2013; Yagi et al., 2010) |
| Macrófagos | Eliminação de patógenos sem marcadores para opsonização <hr/> APC | PGE2 | ↓ TNF α e IL-12 ↑ IL-10 <hr/> ↑ IL-10 | Balanco dos fenótipos M1/M2 com ↑ M2 <hr/> ↓ atividade de APC | GvHD, aterosclerose, sepsis, regeneração de feridas | (Chase & Vemuri, 2012; Shi et al., 2010) |
| Células B | Resposta imune humoral primária e secundária | IL-6 PD-L1 | - - | ↓ apoptose ↓ diferenciação | SLE | (Chase & Vemuri, 2012; Ghannam et al., 2010) |
| Neutrófilos | Fagocitose dos microrganismos e fusão com grânulos intracelulares aquando da inflamação | PGE2 IL-6 | ↑ IL-10 (macrófagos) - | ↓ recrutamento, migração e invasão dos tecidos ↓ apoptose e "burst" respiratório | Sepsis, Lesão Pulmonar Aguda, DM, AMI | (Chase & Vemuri, 2012; Ghannam et al., 2010; Shi et al., 2010) |

Legenda: ↓, Inibição/baixa expressão; ↑, Estimulação/elevada expressão; SI, Sistema Imunitário; APC, Células Apresentadoras de Antígenos; MHC-I, Complexo *Major* de Histocompatibilidade de Classe I; imDC, Células Dendríticas imaturas; GvHD, Doença do Enxerto contra o Hospedeiro; EAE, Encefalomielite Autoimune Experimental; RA, Artrite Reumatoide; SLE, Lúpus Eritematoso Sistémico; DM, Diabetes Mellitus; AMI, Enfarte Agudo do Miocárdio.

ANEXO B – ESTUDOS RECENTES

Tabela B 1: Principais estudos pré-clínicos em complicações crónicas da Diabetes Mellitus.

| | Fonte das células | Modelo | Via de administração | Principais resultados | Mecanismo proposto | Referências Bibliográficas |
|-------------|-------------------|---------------------------------|----------------------|---|---|--|
| Nefropatia | hUC-MSC | DM em Rato (estreptozotocina) | IV | ↓ proteinúria, expansão mesangial e deposição de ECM Hipertrofia renal e glomerular Hiperglicémia | ↑ VEGF e IGF-1 (MSC) ↓ enxerto das MSC no rim | (J. H. Park, Hwang, Hwang, Han, & Ha, 2012) |
| | AT-MSC | DM em Rato (estreptozotocina) | IV | ↓ TNF α , IL-1B e IL-6 | ↓ ativação da via MAPK | (Y. Fang et al., 2012) |
| | hAT-MSC | <i>In vitro</i> (> [glucose]) | - | ↓ apoptose dos podócitos intactos | Secreção de EGF | (D. Li et al., 2013) |
| | BM-MSC | DM 1 em Rato (estreptozotocina) | IA | Manutenção dos podócitos Prevenção da albuminúria Hiperglicémia | ↑ BMP-7 e ↓ VEGF Restauração da expressão de proteínas | (Shuai Wang, Li, Zhao, Zhang, & Huang, 2013) |
| | BM-MSC | DM em Rato (estreptozotocina) | IV | Prevenção da glomerulosclerose ↓ infiltração dos macrófagos no rim | ↓ TNF α , IL-1B e IL-6 (macrófagos) ↓ MCP-1 por ↑ HGF (MSC) | (S.-S. Lv et al., 2013) |
| | BM-MSC | DM 1 em Rato (estreptozotocina) | IP | ↓ <i>stress</i> oxidativo (↓ ROS) | ↓ recaptação de glucose pelas células mesangiais (↓ GLUT-1) | (S. Lv et al., 2014) |
| Retinopatia | BM-MSC | DM em Rato (estreptozotocina) | IV | ↑ função e regeneração renal ↓ apoptose | ↑ VEGF e TGF-B, TNF α Controlo da via bcl2/Bax | (Abdel Aziz et al., 2014) |
| | hAT-MSC | DM em Rato (estreptozotocina) | IV | ↑ integridade da barreira sangue-retina ↓ glicémia | <i>Homing</i> das MSC à retina e diferenciação em fotorreceptores e astrócitos | (Z. Yang et al., 2010) |
| Neuropatia | hUC-MSC | DM 2 em Rato (estreptozotocina) | Intravítreo | Diminuição da apoptose e lesão oxidativa da retina | ↑ FC neuroprotetores na retina | (Scalinci et al., 2011) |
| | BM-MSC | DM em Rato (estreptozotocina) | IM | ↑ densidade capilar ↑ rapidez de formação do tecido de granulação e re-epitelização com cura acelerada | ↑ VEGF ↑ proliferação de fibroblastos, células vasculares endoteliais, células basais e células epiteliais do folículo do pelo | (Wan, Xia, Liang, Liu, & Cai, 2013) |

Tabela B 1 (Continuação): Principais estudos pré-clínicos em complicações crônicas da Diabetes Mellitus.

| | Fonte das células | Modelo | Via de administração | Principais resultados | Mecanismo proposto | Referências Bibliográficas |
|-------------|-------------------|---|-------------------------------------|--|---|-------------------------------|
| Neuropatia | hUC-MSC | DM 1 em Rato (estreptozotocina) | IA | ↑ reparação | Homing à ulceração Diferenciação na linhagem epidérmica ↑ colagénio tipo I e III | (Q.-S. Zhao et al., 2014) |
| | hWJ-MSC | <i>In vitro</i> (> [glucose]) Rato | - Tópica (em matriz de Hidrogel) | ↑ proliferação e migração dos fibroblastos à ferida ↑ remodelação e organização da ECM e re-epitelização completa | ↑ expressão de genes pró-regeneração da ferida pelos fibroblastos | (Arno et al., 2014) |
| | BM-MSC | <i>In vitro</i> (> [glucose]) | - | Migração N dos queratinócitos à ferida | pFAK N e ↑ MMP-2, EGF e IGF-1 | (Kato et al., 2014) |
| | BM-MSC | DM em orelha de coelho | Tópica (matriz de colagénio) | ↑ % cura ↑ angiogénese | O colagénio mantém a função e viabilidade das MSC e funciona como substrato para que permaneçam na lesão | (O'Loughlin et al., 2013) |
| | hAT-MSC | DM em Rato (mutação no recetor leptina) | Tópica (matriz de fibroína de seda) | Aceleração da cura | A fibroína de seda funciona como substrato para que as MSC adiram, proliferem e permaneçam na lesão ↑ VEGF | (Navone et al., 2014) |
| Cardiopatia | BM-MSC | DM em Rato (estreptozotocina) | IC | ↓ suscetibilidade a arritmia ventricular | ↑ rácio das fibras nervosas parassimpático/simpático e germinação de nervos cardíacos | (S.-S. Lv et al., 2013) |
| | BM-MSC | DM em Rato (estreptozotocina) | RO | Função elétrica e mecânica N (↑ sensibilidade β-adrenérgica) ↓ hiperglicémia e ↑ peso corporal ↓ resposta inflamatória Homeostase | ↑ expressão de recetores adrenérgicos β1 Corticosterona N e ↓ insulinémia e leptinémia ↓ IFN-γ plasmático AMPK N | (Monnerat-Cahli et al., 2014) |

Legenda: ↑, Aumento; ↓, Diminuição; N, Níveis normais/basais; [glucose], Concentração de glucose; DM, Diabetes Mellitus; IC, Intracardíaca; IA, Intra-arterial; IM, Intramuscular; IP, Intraperitoneal; IV, Intravenosa; RO, Retro-orbital.

Tabela B 2: Principais resultados da ação das MSC na GvHD obtidos em diversos ensaios clínicos.

| GvHD | Fase | n | Dador | Principais resultados | Sobrevivência | Referências Bibliográficas |
|----------------|-------------|------------------------|----------------------|------------------------------|----------------------|-----------------------------------|
| <i>Aguda</i> | II | 32 | NR (Prochymal®) | 23 (RC); 6 (RP); 2 (SR) | 120 dias (91%) | (Kebriaei et al., 2009) |
| | ND | 13 | NR (Prochymal®) | 7 (RC); 5 (RP); 0 (SR) | 229 dias (média) | (Prasad et al., 2011) |
| | I/II | 14 | NR | 12 (RC); 1 (RP); 0 (SR) | 2 anos (35%) | (Muroi et al., 2013) |
| | I | 40 | NR | 11 (RC), 16 (RP); 13 (SR) | 2 anos (39%) | (Introna et al., 2014) |
| | II | 25 | NR | 11 (RC); 6 (RP); 7 (SR) | ND | (Sánchez-Guijo et al., 2014) |
| | I | 12 | HLAhi familiar ou NR | 7 (RC); 4 (RP); 1 (SR) | 3 anos (55%) | (R. Herrmann et al., 2012) |
| | 7 | 2 (RC); 2 (RP); 3 (SR) | | 8 meses (média) | | |
| <i>Crônica</i> | I | 4 | NR | ND | 14 meses (média) | (Zhou et al., 2010) |
| | I | 19 | HLAi ou NR | 4 (RC); 10 (RP); 0 (SR) | 2 anos (77,7%) | (Weng et al., 2010) |

Legenda: ND, Não discriminado; NR, Não relacionado; HLAhi, HLA haploidêntico; HLAi, HLA idêntico; RC, Resposta completa; RP, Resposta parcial; SR, Sem resposta.

Tabela B 3: Principais conclusões sobre a ação das MSC na Esclerose Múltipla (MS), verificadas nos estudos mais recentes.

| Fase | n | Origem das células | Via de administração | Principais conclusões | Referências Bibliográficas |
|-------|-----------------|--|---------------------------|---|--|
| I/IIA | 10 | BM-MSc autólogas | Intravenosa | Seguro e aplicável Melhoria da função, fisiologia e estrutura visual (neuroproteção) | (Connick et al., 2011) (Connick et al., 2012) |
| - | 10 (A) 4 (C) | BM-MSc-NP autólogas (com MS) vs. alogénicas (sem MS) | - | MSc isoladas de doentes com MS ≈ MSc normais ↓ potencial de diferenciação em linhagens mesodermais no CNS ↑ diferenciação das NSC do hospedeiro por secreção de fatores bioativos | (Harris, Faroqui, et al., 2012) |
| - | 25 | BM-MSc autólogas | Intratecal Intratecal | Sem diferenças significativas de citocinas no sangue periférico Ação neuroregeneradora localizada no CNS | (Mohyeddin Bonab et al., 2013) |
| - | 1 | UC-MSc alogénicas BM-MSc autólogas | Intratecal Intravenosa | Transplante de UC-MSc seguro e eficaz | (Hou et al., 2013) |
| I | 24 | BM-MSc autólogas | Intravenosa | Seguro e aplicável | (“First US Study”, 2014) |

Legenda: ↑, Aumento; ↓, Diminuição; BM, Medula Óssea; UC, Cordão Umbilical; MSC-NP, Progenitores Neurais derivados das MSC; A, Amostra; C, Controlo; MS, Esclerose Múltipla; NSC, Células Estaminais Neurais; CNS, Sistema Nervoso Central.

Tabela B 4: Principais resultados da ação das MSC a nível cardíaco, obtidos em ensaios clínicos recentes.

| Nome | Fase | n | Condição | Comparadores | Via de administração | Principais conclusões | Referências Bibliográficas |
|-----------------|--------|----|----------|----------------------------------|----------------------|---|----------------------------|
| <i>POSEIDON</i> | I/II | 30 | CMI | MSC autólogas vs. MSC alogénicas | TE | Segurança na administração de MSC autólogas e alogénicas Eficácia inversamente proporcional à dose de células (20 milhões vs. 200 milhões) | (Hare et al., 2012) |
| <i>C-CURE</i> | II/III | 47 | CMI | MSC cardiopoiéticas vs. placebo | TE | ↓ EF e SV do LV Perfil de segurança semelhante ao placebo | (Bartunek et al., 2013) |
| <i>TAC-HFT</i> | I/II | 65 | CMI | MSC vs. BMC vs. placebo | TE | Segurança na administração de MSC e BMC ↓ fibrose e ↑ massa de miocárdio viável pelas MSC | (Heldman et al., 2014) |
| <i>SEED-MS</i> | II/III | 80 | AMI | MSC vs. sem intervenção | IC | Segurança na administração de MSC Recuperação do miocárdio se administrado nas 6 horas seguintes ao evento | (J.-W. Lee et al., 2014) |

Legenda: ↑, Aumento; ↓, Diminuição; CMI, Cardiomiopatia Isquémica; AMI, Enfarte Agudo do Miocárdio; TE, Transendocárdio; IC, Intracoronária; SV, Volume Sistólico; LV, Ventrículo Esquerdo; EF, Fração de ejeção; BMC, Células Mononucleares da Medula Óssea.

ANEXO C – ENSAIOS CLÍNICOS EM DESENVOLVIMENTO

Tabela C: Avaliação atual das MSC em ensaios clínicos (compilação a partir das bases de dados disponíveis nos sítios na Internet *clinicaltrialsregister.eu* e *clinicaltrials.gov*).

| Identificação | Fase | Intervenção | Patologia | Estado |
|--------------------|--------|---|-----------------------------|-----------------|
| <i>NCT02247973</i> | II | BM-MSA alogénicas | Anemia Aplástica | Por convite |
| <i>NCT02218437</i> | IV | UC-MSA + ATG | | Em recrutamento |
| 2008-005594-35* | III | MSA | Doenças hematológicas | Ativo |
| <i>NCT02097641</i> | II | BM-MSA alogénicas | ARDs | Em recrutamento |
| <i>NCT01902082</i> | I | AT-MSA alogénicas | | |
| <i>NCT00877903</i> | II | Prochymal® | Enfarte Agudo do Miocárdio | Ativo |
| <i>NCT01652209</i> | III | Hearticellgram®AMI | | Em recrutamento |
| <i>NCT01770613</i> | II | BM-MSA alogénicas | STEMI | Ativo |
| 2009-017752-28* | II | AT-MSA | CMI | |
| <i>NCT01591200</i> | II | BM-MSA alogénicas | Cirrose | Em recrutamento |
| <i>NCT01233102</i> | I/II | UC-MSA | | |
| <i>NCT01728727</i> | | | | |
| <i>NCT01854125</i> | III | BM-MSA autólogas | | Por convite |
| <i>NCT01483248</i> | I/II | MB-MSA | | |
| <i>NCT01983709</i> | I | BM-MSA alogénicas | Cancro da próstata | Em recrutamento |
| <i>NCT02068794</i> | I/II | AT-MSA + MV-NIS | Cancro do ovário recorrente | |
| <i>NCT02079324</i> | I | GX-051 | Cancro da cabeça e pescoço | |
| <i>NCT00690066</i> | II | Prochymal® | Diabetes Mellitus de tipo 1 | Desconhecido |
| <i>NCT01157403</i> | II/III | BM-MSA autólogas | | Em recrutamento |
| <i>NCT01374854</i> | I/II | UC-MSA | | Ativo |
| <i>NCT01759823</i> | II/III | BM-MSA autólogas | Diabetes Mellitus de tipo 2 | Em recrutamento |
| <i>NCT01954147</i> | I/II | UC-MSA + GLP-1 | | Ativo |
| <i>NCT01157650</i> | I/II | AT-MSA autólogas | | |
| <i>NCT00482092</i> | III | Prochymal® | Doença de Crohn | Ativo |
| <i>NCT01233960</i> | | | | |
| 2011-005966-39* | II | MSA | | |
| 2011-001822-81* | I/II | MSA alogénicas | Prevenção da GvHD | Ativo |
| <i>NCT01765634</i> | II | BM-MSA alogénicas | GvHD aguda | Em recrutamento |
| <i>NCT02241018</i> | II/III | MSA + Ac monoclonal CD25 + inibidores da calcineurina | | |
| 2011-003237-33* | III | BM-MSA alogénicas | | Ativo |
| 2006-004420-37* | III | Prochymal® | | Acesso Alargado |
| <i>NCT00759018</i> | - | | | |
| <i>NCT01522716</i> | I | MSA alogénicas | | Ativo |
| <i>NCT01765660</i> | II | BM-MSA alogénicas | GvHD crónica | Em recrutamento |
| <i>NCT00972660</i> | II | MSA alogénicas | | Por convite |
| <i>NCT01297413</i> | I/II | BM-MSA alogénicas | Acidente Vascular Cerebral | Em recrutamento |
| 2011-003551-18* | II | AT-MSA alogénicas | | Ativo |

Tabela C (Continuação): Avaliação atual das MSC em ensaios clínicos (compilação a partir das bases de dados disponíveis nos sítios na Internet *clinicaltrialsregister.eu* e *clinicaltrials.gov*).

| Identificação | Fase | Intervenção | Patologia | Estado | |
|-----------------|--------|------------------------------------|-------------------------------|--------------------|-------|
| NCT01609283 | I | MSC autólogas | Esclerose Lateral Amiotrófica | Em recrutamento | |
| NCT01494480 | II | UC-MS | | Por convite | |
| 2011-006254-85* | I/II | AT-MS | Esclerose Lateral Amiotrófica | Ativo | |
| NCT02017912 | II | BM-MS-NTF autólogas | | Em recrutamento | |
| NCT01777646 | | | | | |
| NCT01895439 | I/II | BM-MS | | Em recrutamento | |
| NCT01745783 | | | | | |
| NCT01364246 | I/II | UC-MS | | Em recrutamento | |
| NCT01606215 | I/II | MSC autólogas | | Esclerose Múltipla | Ativo |
| 2012-002357-35* | | | | | |
| 2012-000518-13* | | | | | |
| NCT01933802 | I | BM-MS-NP autólogas | | | |
| 2012-002067-10* | I/II | BM-MS | Artrite juvenil | Ativo | |
| NCT01547091 | I/II | UC-MS +/- DMARDs | Artrite Reumatoide | Em recrutamento | |
| NCT00891501 | II/III | BM-MS | Defeitos da cartilagem | Em recrutamento | |
| NCT01733186 | I/II | CARTISTEM® | | | |
| NCT01626677 | III | CARTISTEM® vs. Microfratura | | Ativo | |
| 2012-004444-30* | II | MS alogénicas | DDD | Ativo | |
| NCT01958502 | II | BM-MS + BMP2 + matriz de colagénio | Defeitos ósseos | Em recrutamento | |
| 2012-003139-50* | II | MS autólogas + MBCP | Reconstrução do maxilar | Ativo | |
| NCT01895413 | I/II | BM-MS | Osteoartrite | Em recrutamento | |
| NCT01183728 | I/II | BM-MS | | | |
| 2009-017405-11* | | | | | Ativo |
| NCT01586312 | I/II | BM-MS alogénicas | | | |
| NCT01453738 | II | MS alogénicas | | | |
| NCT02172885 | I | MS HLAi | Osteogenesis Imperfecta | Em recrutamento | |
| 2012-002553-38* | | | | | |
| NCT01275612 | I | MS | IR aguda | Em recrutamento | |
| NCT02195323 | I | BM-MS | IR crónica | | |
| NCT01840540 | I | AT-MS | ARAS | | Ativo |

Legenda: AT; Tecido Adiposo; BM; Medula Óssea; MB, Sangue Menstrual; UC, Cordão Umbilical; ARDs, Síndrome de Dificuldade Respiratória Aguda; STEMI, Enfarte do Miocárdio com Elevação do Segmento ST; CMI, Cardiomiopatia Isquémica; GvHD, Doença do Enxerto contra o Hospedeiro; DDD; Doença Degenerativa do Disco; IR, Insuficiência Renal; ARAS, Estenose Aterosclerótica da Artéria Renal; ATG; Globulina Antitimócito; MV-NIS, Vírus do Sarampo Oncolítico codificador do Simportador Sódio-iodo da tiroide; GX-051, MS geneticamente modificadas com IL-12; GLP-1, Liraglutida; Ac, Anticorpo; MS-NTF, MS secretoras de Fatores Neurotróficos; MS-NP, Percursos Neurais derivados das MS; DMARDs, Fármacos Modificadores da Doença; BMP2, Proteína Morfogenética do Osso 2; MBCP, Matriz Microporosa Bifásica de Fosfato de Cálcio; HLAi, HLA idêntico.

*Número EudraCT (*European Union Drug Regulating Authorities Clinical Trials*)

Notas: Os produtos Hearticellgram®AMI (hBM-MS autólogas – Pharmicell Co. Ltd.), CARTISTEM® (hUC-MS alogénicas – Medipost Co. Ltd.) e Prochymal® (hBM-MS alogénicas – Mesoblast, Ltd.) são produtos comerciais, expandidos *ex vivo*, previamente autorizados pela FDA para integrar ensaios clínicos.

