



**•INSTITUTO DE ORTOPEDIA  
E TRAUMATOLOGIA**

**HC-FMUSP**

# **EMPREGO DE CÉLULAS PROGENITORAS NO TRATAMENTO DA LESÃO MEDULAR CRÔNICA EM HUMANOS**

**Alexandre Fogaça Cristante**

**Prof. Tarcísio Eloy Pessoa de Barros Filho**

**..."AO EXAMINAR UM HOMEM QUE  
TENHA DESLOCADO VÉRTEBRA DO  
PESCOÇO, QUE NÃO MOVIMENTE  
SEUS BRAÇOS E SUAS PERNAS, COM  
PERDA DE URINA, VOCÊ PODE  
AFIRMAR :**

**É UMA LESÃO QUE NÃO DEVE  
SER TRATADA."**

**Papiro de Edwin Smith, 1700 A.C.**

# INCIDÊNCIA

- 15 a 40 casos / milhão (mundial)
- 28 a 50 casos / milhão (EUA)
- 40 casos / milhão (Brasil)
- 1750 casos / ano (São Paulo)

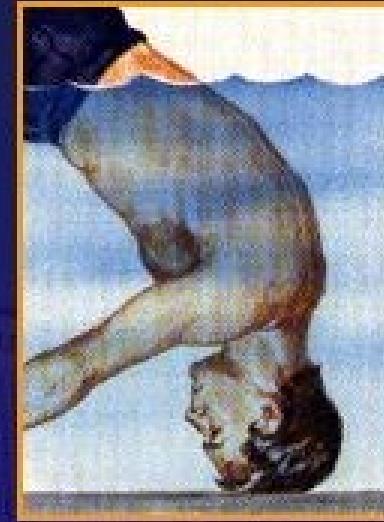
# ETIOLOGIAS

- Trauma
- Tumor
- Infecção
- Lesão vascular



# TRAUMA

- Veículos motorizados
- Armas de fogo
- Arma branca
- Esportes e atividades recreacionais



# Lesão Medular

## Lesão Primária

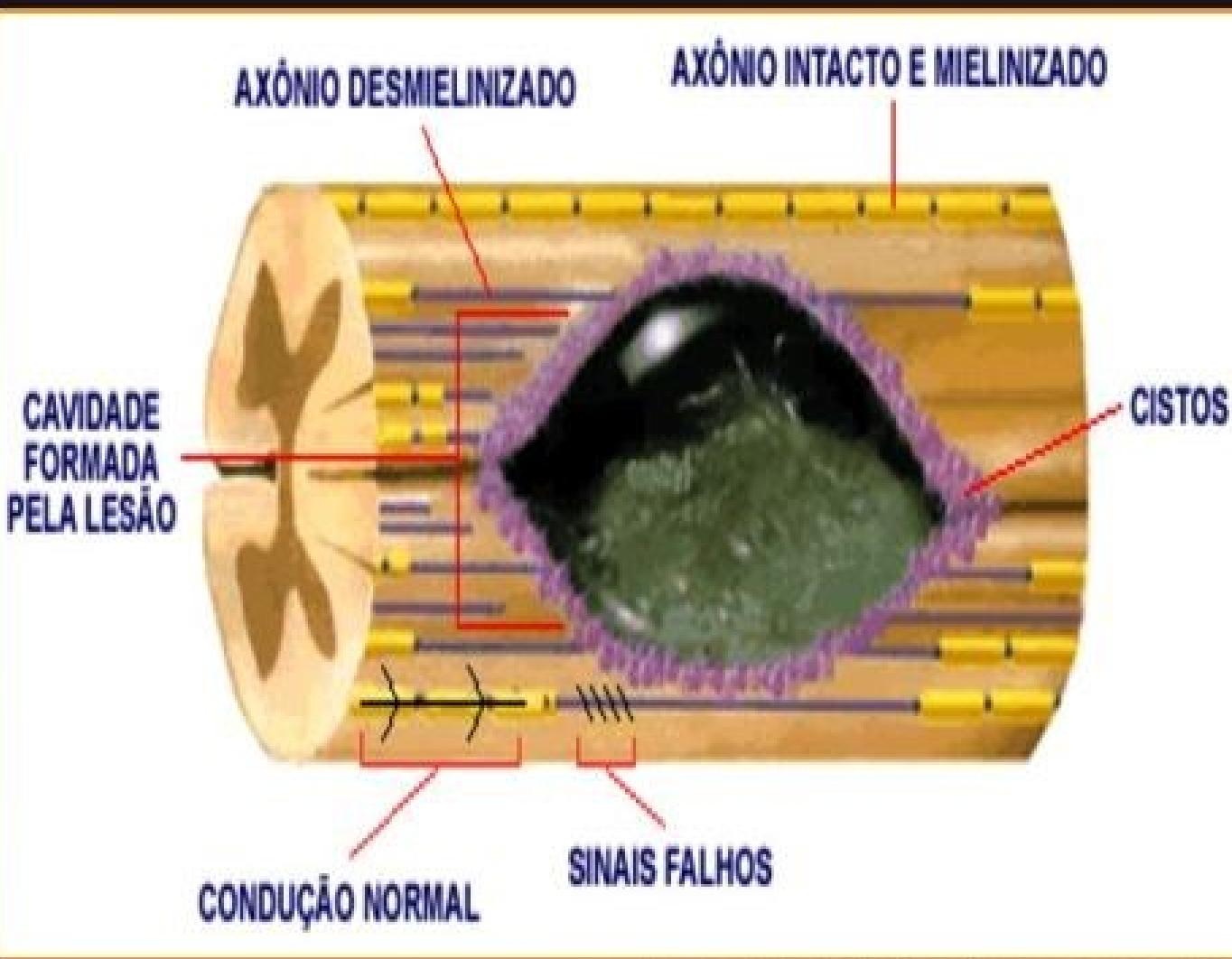
- Trauma Direto
- Trauma Indireto
- Compressão
- Isquemia

## Lesão Secundária

- Apoptose e Necrose Tecidual
- Fibrose
- Ausência de Regeneração Local

- Hemorragia
- Mediadores Inflamatórios
- Edema
- Isquemia
- Hipoxia

# LESÃO MEDULAR



# ABORDAGENS TERAPÊUTICAS

- Cirúrgica
- Farmacológica
- Meios físicos
- Biológica



# CIRÚRGICA

- Estabilização da coluna**  
–Legos – 2002
  
- Descompressão Medular**  
–Fehlings - 1999

# FARMACOLÓGICA

- **Corticosteróides**
  - **Naloxona (NASCIS 2)**
  - **Tirilazade (NASCIS 3)**
- 
- **4-Aminopiridina** → **MELHORA FUNCIONAL**
  - **Fatores neurotróficos – GM1** → **PROMOVER A REGENERAÇÃO**

# METILPREDINISOLONA

- **NASCIS**
- Primeira a demonstrar melhora significativa na recuperação em humanos
- única com alguma eficácia demonstrada e recomendada
- inibe a peroxidação lipídica

# **MEIOS FÍSICOS**

**– Hipotermia**

»KELLY Jr. - 1970

**– Oxigenoterapia hiperbárica**

»Galvão - 2003

# **BIOLÓGICA**

- fatores de crescimento tecidual
- células tronco



# CÉLULAS TRONCO

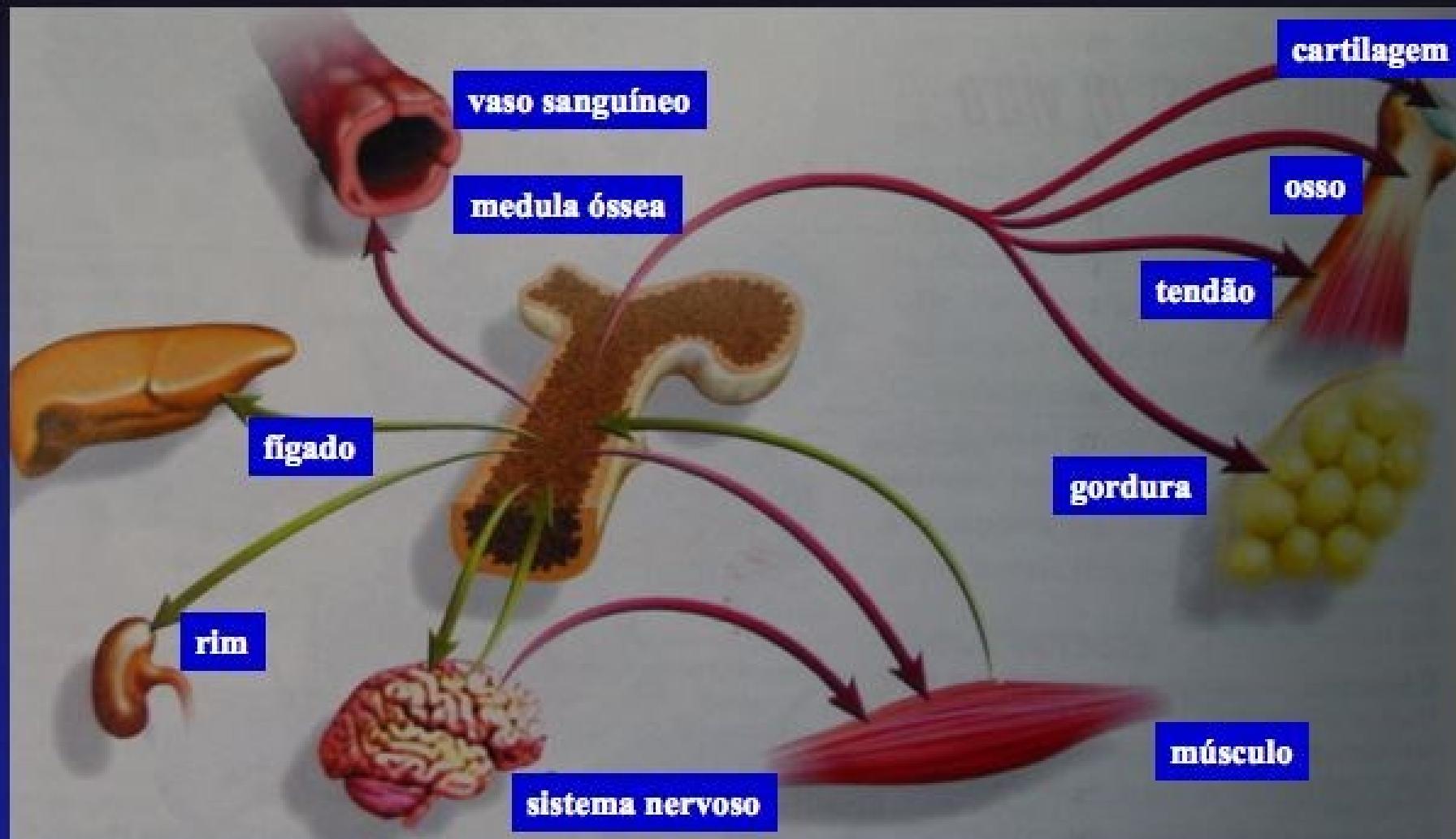
- Capazes de gerar todas as células
  - Embrionárias
    - blastocito
  - Adultas
    - Medula Óssea
    - Sangue Periférico
    - Cordão Umbilical
    - Fígado fetal
- Transplante de Medula Óssea



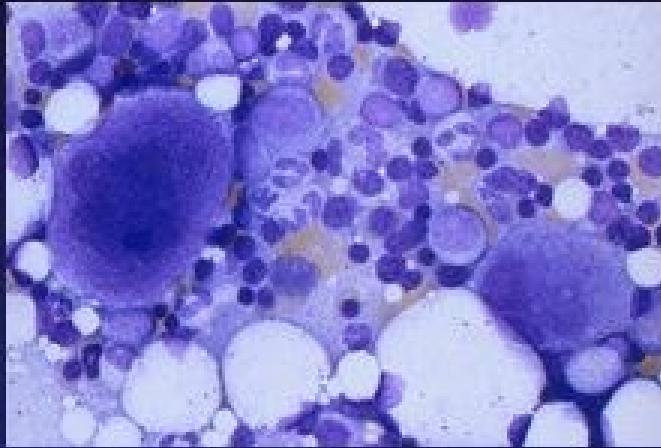
# Células Adultas

- Células multipotentes
- Proliferar
- Originar células de qualquer linhagem
- Estado diferenciado das células é reversível
  - » Brazelton, 2000; Clays, 2000
- Células indiferenciadas transplantadas podem se diferenciar em células deste tecido
  - » Hall; Watt, 1989; Potten ; Loeffler, 1990; Weissman, 2000

# POSSIBILIDADES



# **Células Adultas Células Indiferenciadas/Progenitoras**



- Duas populações na medula óssea
  - Células progenitoras hematopoéticas – CPH
  - Células progenitoras mesenquimais – CPM

# **Células Indiferenciadas/Progenitoras**

- CPH
  - Expressão do antígeno CD 34
  - Citometria de fluxo com anticorpo monoclonal anti CD34
  
- CPM
  - Não é conhecido marcador de superfície celular
  - Identificada somente através de cultura celular

## **Células Indiferenciadas/Progenitoras**

- Presentes na medula óssea
- 0,1% circulam no sangue periférico
- Fatores estimuladores de colônia podem aumentar este número em 50x

# **Células Indiferenciadas/Progenitoras**

- útil no tratamento do Parkinson e C. de Huntington
  - » Bjoklund; Ludvall 2000

- reparação de sistema nervoso
  - reconstrução funcional de circuitos neurais
  - produção de neurotransmissores, fatores de crescimento e anticorpos;
  - remielinização de axônios íntegros

» Freed, 1999; Okano, 2002

# Células Indiferenciadas/Progenitoras

- já foi provada a diferenciação em neurônio e células da glia
    - » McDonald, 1999
  - em ratos com lesão medular as células quando transplantadas
    - sobrevivem, migram e se diferenciam em células do sistema nervoso
    - diminuem a reação inflamatória em lesões agudas
    - melhoraram o desempenho de marcha
- » McDonald, 2002

# CÉLULAS TRONCO - HUMANOS

- Wirth em 2001
  - transplante de células neurais fetais humanas para pacientes com seringomielia pós traumática
  - melhora da espasticidade e algum grau de reversão do déficit neurológico antes apresentado.

# CÉLULAS TRONCO - HUMANOS

- Reier em 2001
  - transplante é possível
  - seguro
- Lakakos 2002
  - revisão bibliográfica
  - propõe que estudos clínicos já teriam embasamento suficiente para serem devolvidos com as evidências já obtidas

# **OBJETIVO**

**Avaliar o efeito da infusão de  
células progenitoras  
indiferenciadas autógenas no  
tratamento da lesão medular  
crônica**

INSTITUTO DE ORTOPEDIA  
E TRAUMATOLOGIA - I.O.T.

# **APROVAÇÃO**

- **Comissão de Análise de Projetos de Pesquisa**  
»CAPPesq
- **Comissão Nacional de Ética**  
»CONEP

# **SELEÇÃO DE PACIENTES**

## **• CRITÉRIOS DE INCLUSÃO**

- ambos os sexos**
- idade superior a dezoito anos**
- lesão medular traumática fechada completa - ASIA**
- tempo superior a dois anos e ausência de alteração neurológica**
- exames normais**
- exame de potencial evocado somato sensitivo de MMII revelando ausência de resposta cortical**
- termo de consentimento informado**

# **SELEÇÃO DE PACIENTES**

- CLASSIFICAÇÃO

- Tetraplégicos

- » diminuição de função neurológica nos membros superiores, tronco, membros inferiores e órgão pélvico;

- Paraplégicos

- » perda de função neurológica dos membros inferiores
    - » função dos membros superiores conservada.



# **SELEÇÃO DE PACIENTES**

- **TOTAL**
  - **INCLUÍDOS 39 PACIENTES**



# **MOBILIZAÇÃO DE CÉLULAS**

- Administração subcutânea de G-CSF na dose de 10ug/kg/dia por cinco dias consecutivos**



**INSTITUTO DE ORTOPEDIA  
E TRAUMATOLOGIA - I.O.T.**

# **COLETA DE CÉLULAS PROGENITORAS**

- Aférese – separador celular de fluxo contínuo, processamento de duas volemias**
- Uma coleta por dia, até obtenção de  $2,5 \times 10^6$  células CD34 positivas**
- Análise de células positivas realizada por citometria de fluxo**

# **CRIOPRESERVAÇÃO CELULAR**

- Células coletadas criopreservadas utilizando Dimetil Sulfóxido**
- Freezer mecânico**



# INFUSÃO DE CÉLULAS PROGENITORAS

## – Angiografia medular

- identificar artéria que irrigasse o sítio da lesão e perfundisse a artéria espinal anterior
- infusão de células



INSTITUTO DE ORTOPEDIA  
E TRAUMATOLOGIA - I.O.T.

# TETRAPLÉGICOS



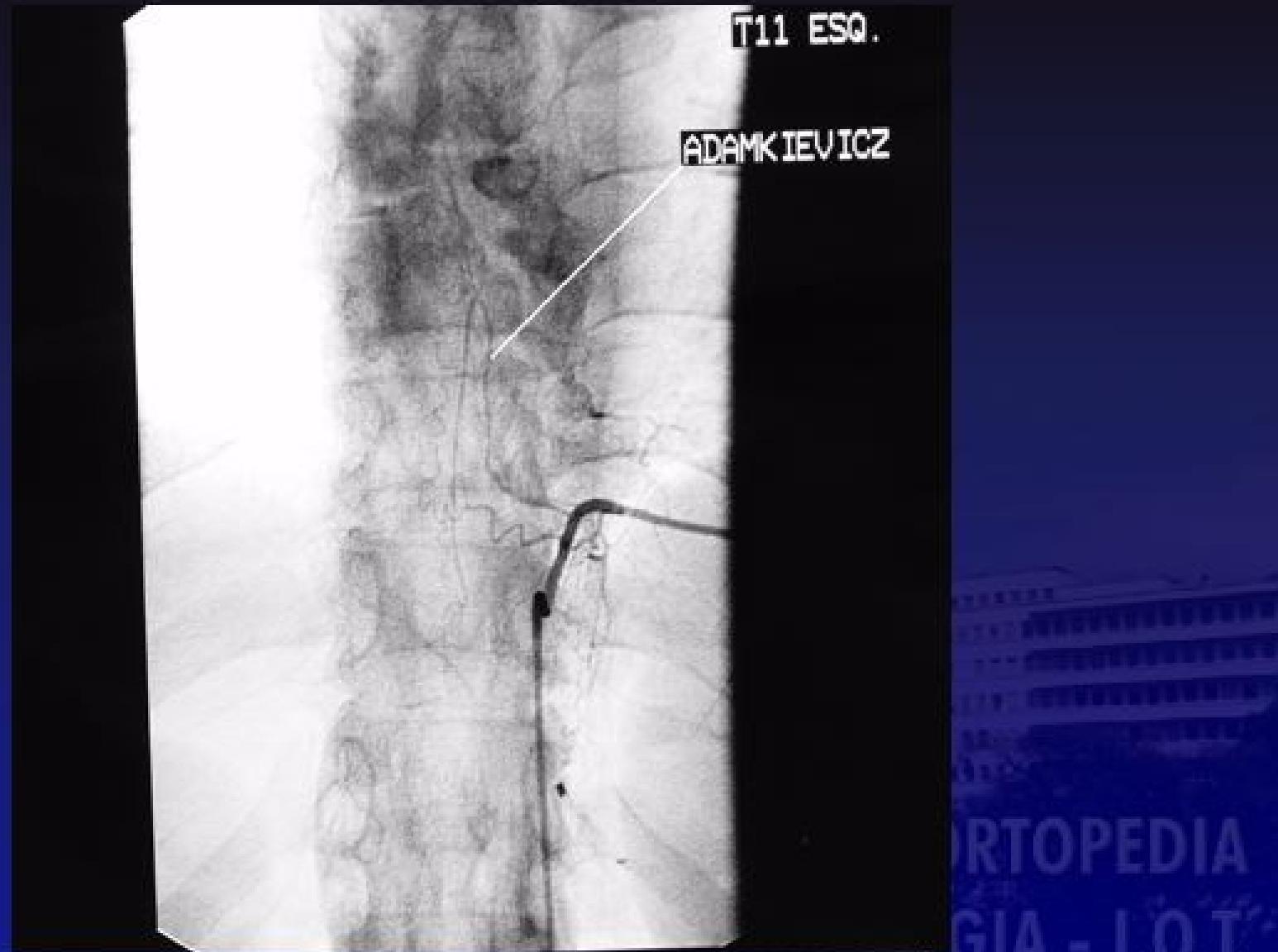
VERTEBRAL ESO

Dos-MAN

1

MORTOPEDIA  
THERAPEUTIC  
ORTHOPEDIC SURGERY - I.O.T.

# PARAPLÉGICOS



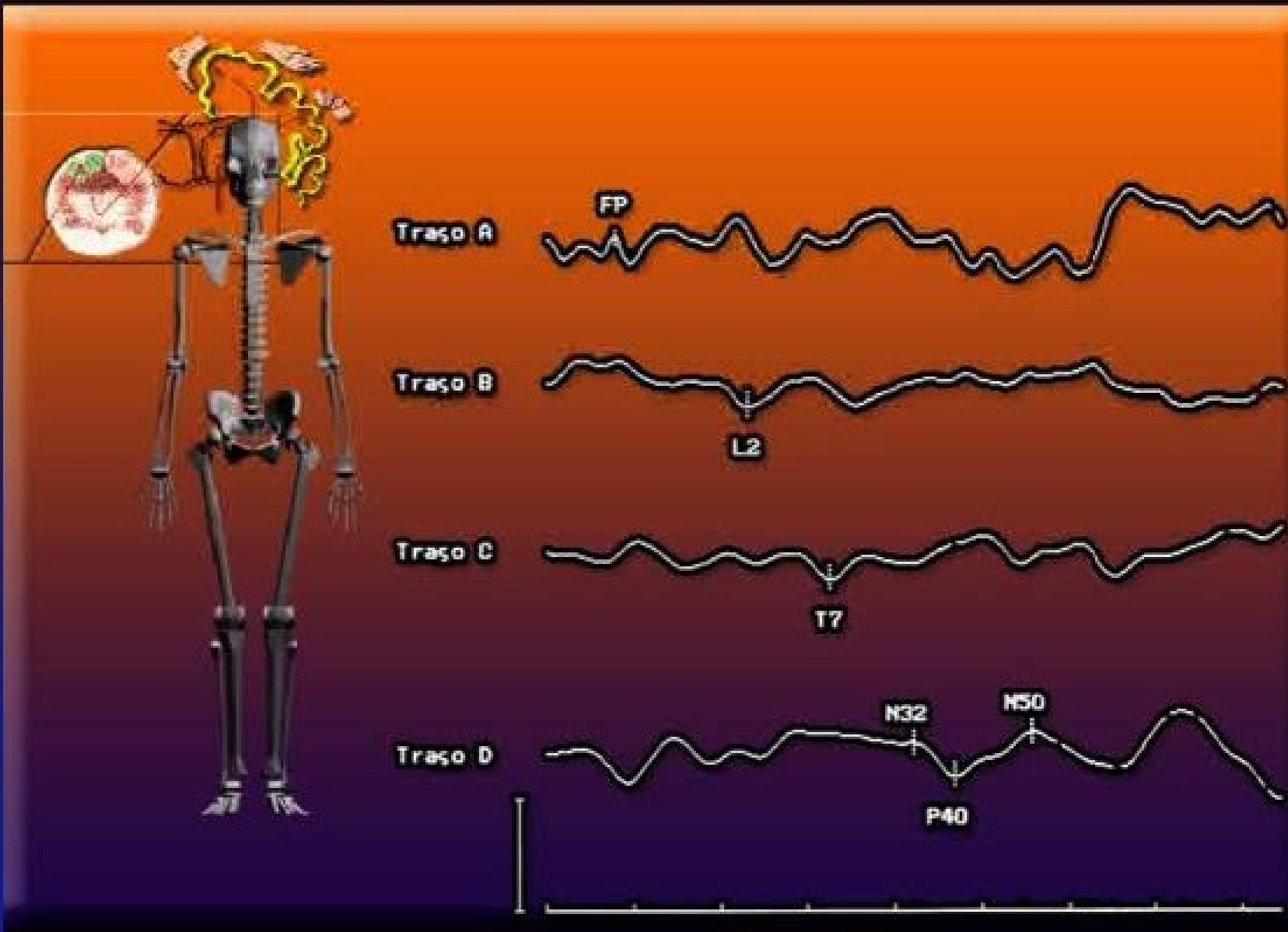
DORTOPEDIA  
GIA - I.O.T.

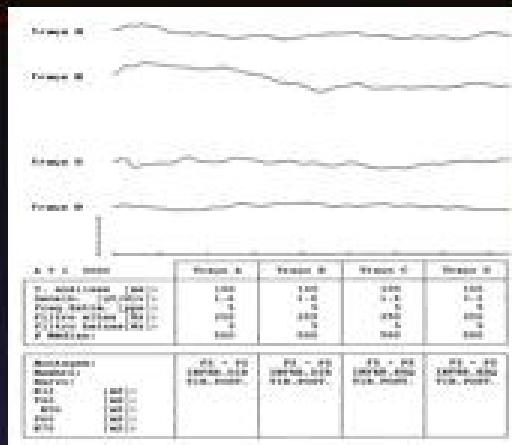
# SEGUIMENTO

- potencial evocado somato sensitivo

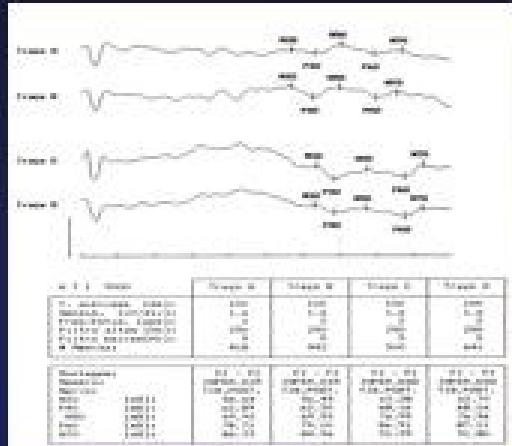


# PARAPLÉGICOS

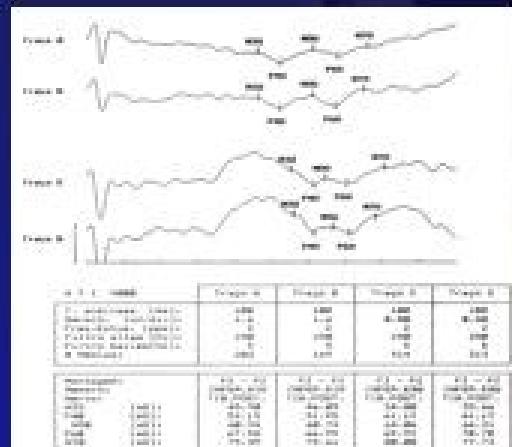




22/04/03



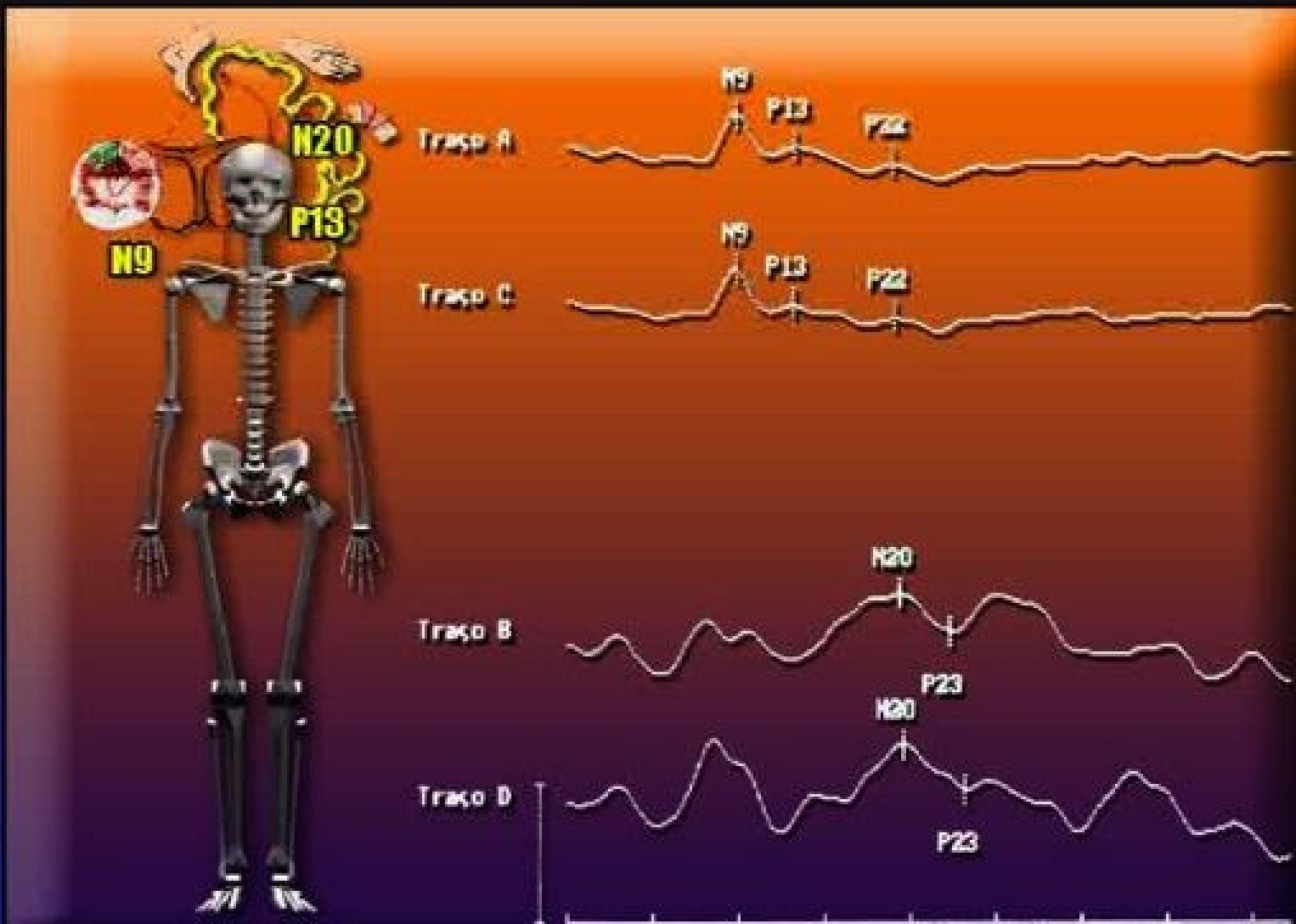
27/05/03



04/05/04

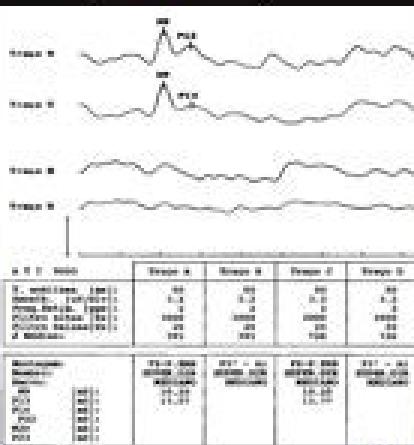
**TUTÔ DE ORTOPEDIA  
E RUMATOLOGIA - I.O.T.**

# TETRAPLÉGICOS



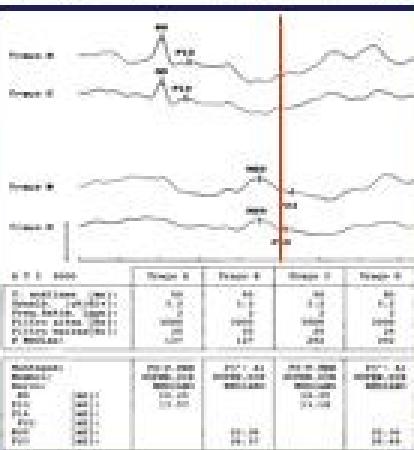
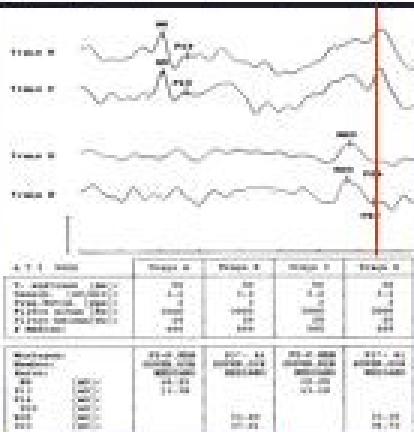
# MSD

03  
01  
04



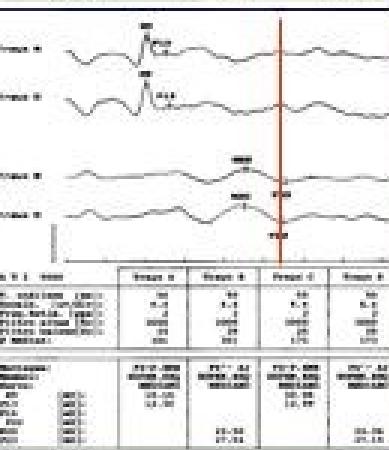
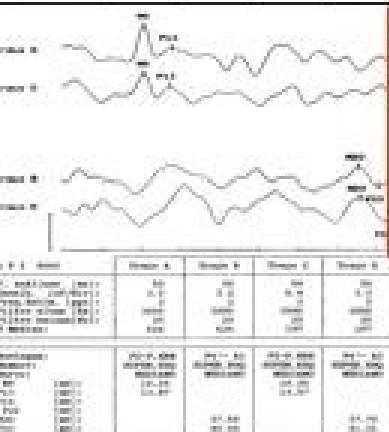
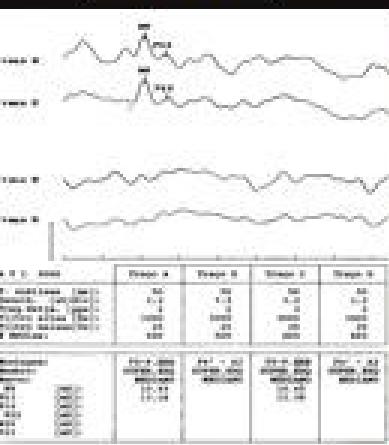
# MSE

24  
06  
04



# MMII

07  
12  
04



# **Melhora Neurológica**

- surgimento de resposta cortical aos estímulos periféricos de membros superiores e inferiores**
  
- a normalização do tempo de latência até a obtenção de resposta cortical aos estímulos periféricos de membros superiores em pacientes tetraplégicos**
  - » que já apresentavam alguma resposta cortical aos estímulos**

# Perfil da Amostra

- 39 pacientes
- Sexo
  - 11 mulheres
  - 28 homens



# Perfil da Amostra

- **Tipo de paralisia**

- 27 paraplégicos
  - 12 tetraplégicos

- **Nível de lesão**

- C 2 - C 4              15,4%
  - C 5 – T 1              20,5%
  - T 2 – L 164,1%



# Perfil da Amostra

## Causa da lesão

- **61,5%**      automóvel
- **17,9%**      esporte, queda ou mergulho
- **15,4%**      motocicleta
- **5,1%**      veículo aéreo

### Ocorrência ou não de melhora neurológica

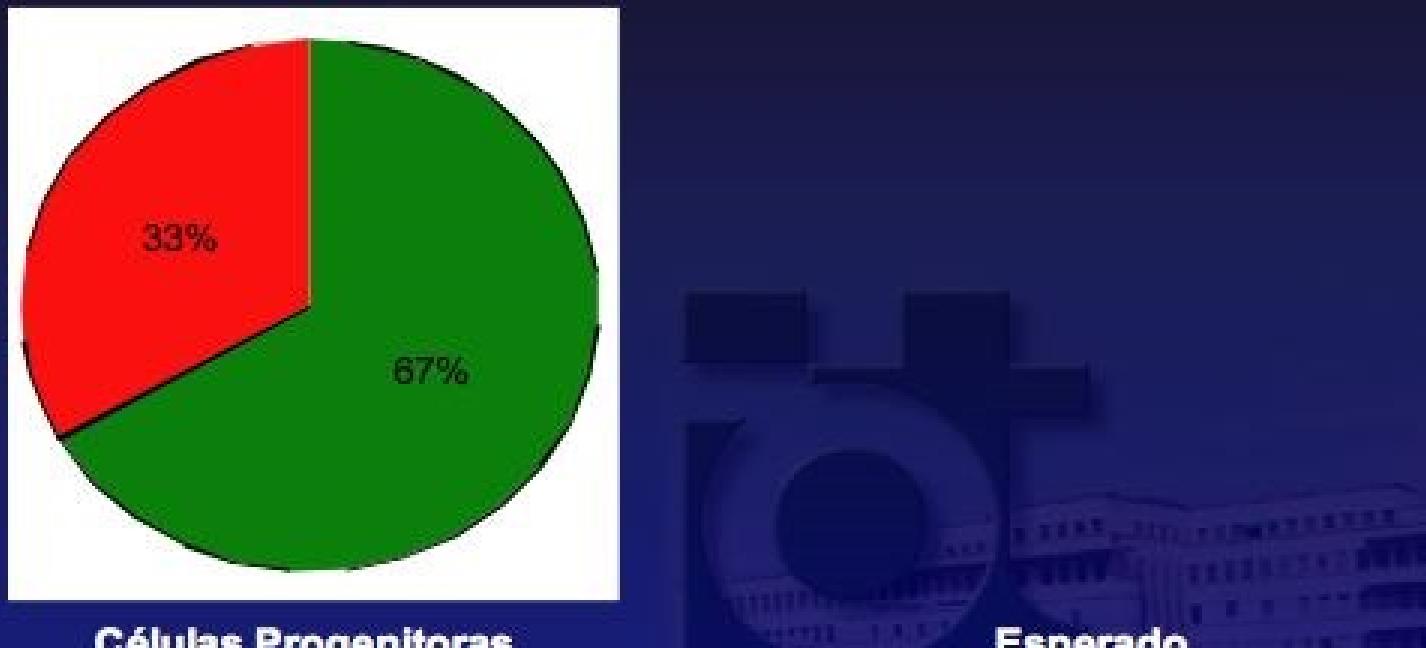
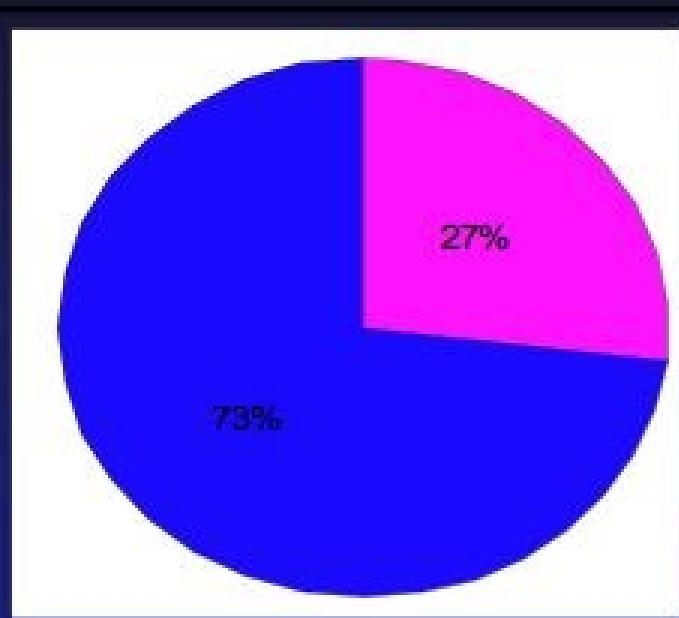


Gráfico 17 Ocorrência, ou não, da melhora neurológica dos pacientes (potencial evocado) após a infusão das células progenitoras indiferenciadas autólogas de acordo com o tipo de tratamento.

### Sexo dos pacientes agrupados de acordo com a ocorrência da melhora neurológica



Com

█ Feminino

Sem

█ Masculino

P=1,00

Gráfico 8

Sexo dos pacientes agrupados de acordo com a ocorrência ou não, da melhora neurológica (potencial evocado) após infusão das células progenitoras indiferenciadas autógenas.

### Idade por ocasião da lesão agrupados de acordo com a ocorrência de melhora neurológica

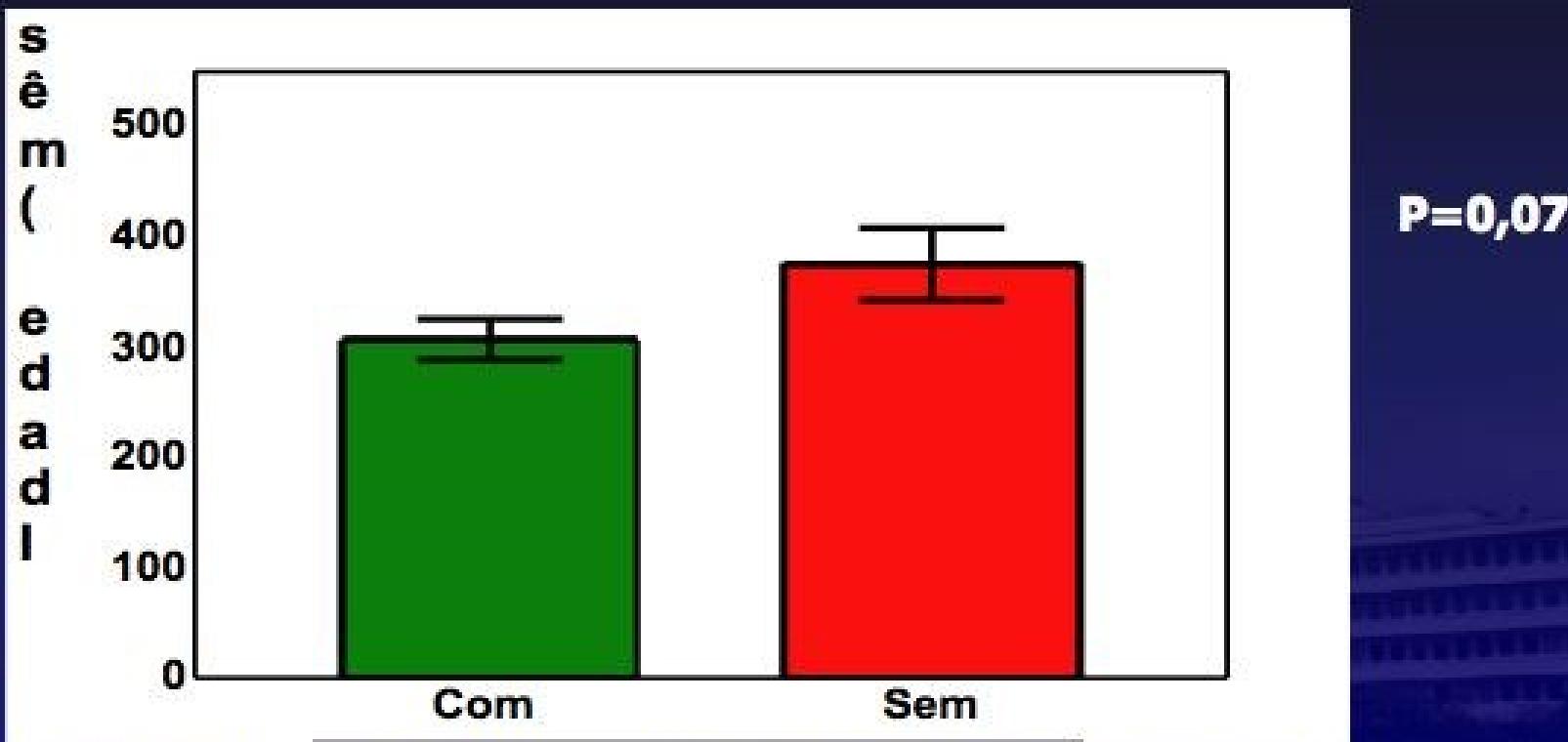


Gráfico 9 Idade (mês) dos pacientes por ocasião da lesão medular agrupados de acordo com a ocorrência, ou não, da melhora neurológica (potencial evocado) após a infusão das células progenitoras indiferenciadas autógenas

### Idade dos pacientes por ocasião da coleta de sangue de acordo com a ocorrência de melhora neurológica

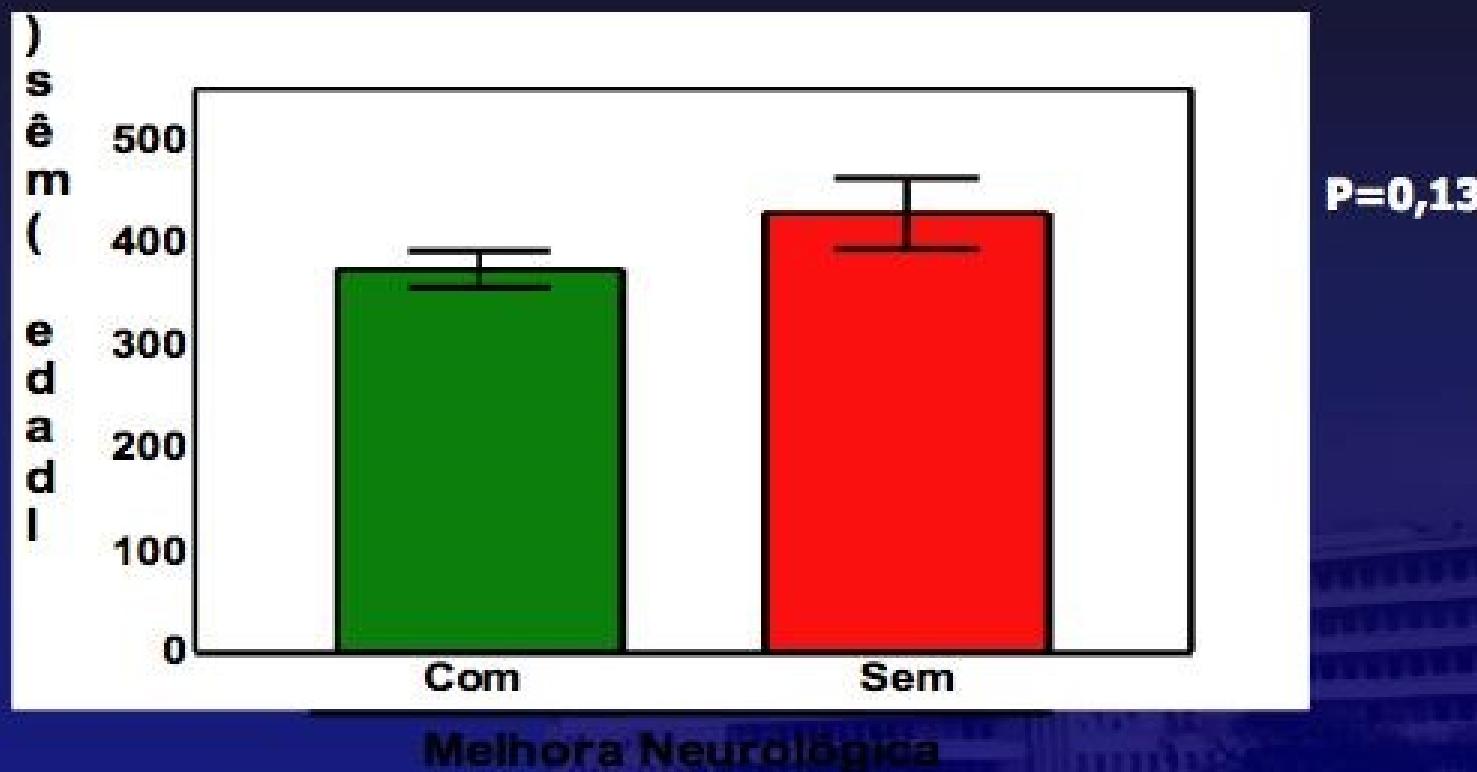


Gráfico 10 Idade (mês) dos pacientes por ocasião da coleta de sangue agrupados de acordo com a ocorrência, ou não, da melhora neurológica (potencial evocado) após a infusão das células progenitoras indiferenciadas autógenas

## Resultados

### Idade dos pacientes por ocasião da infusão de acordo com a ocorrência de melhora neurológica

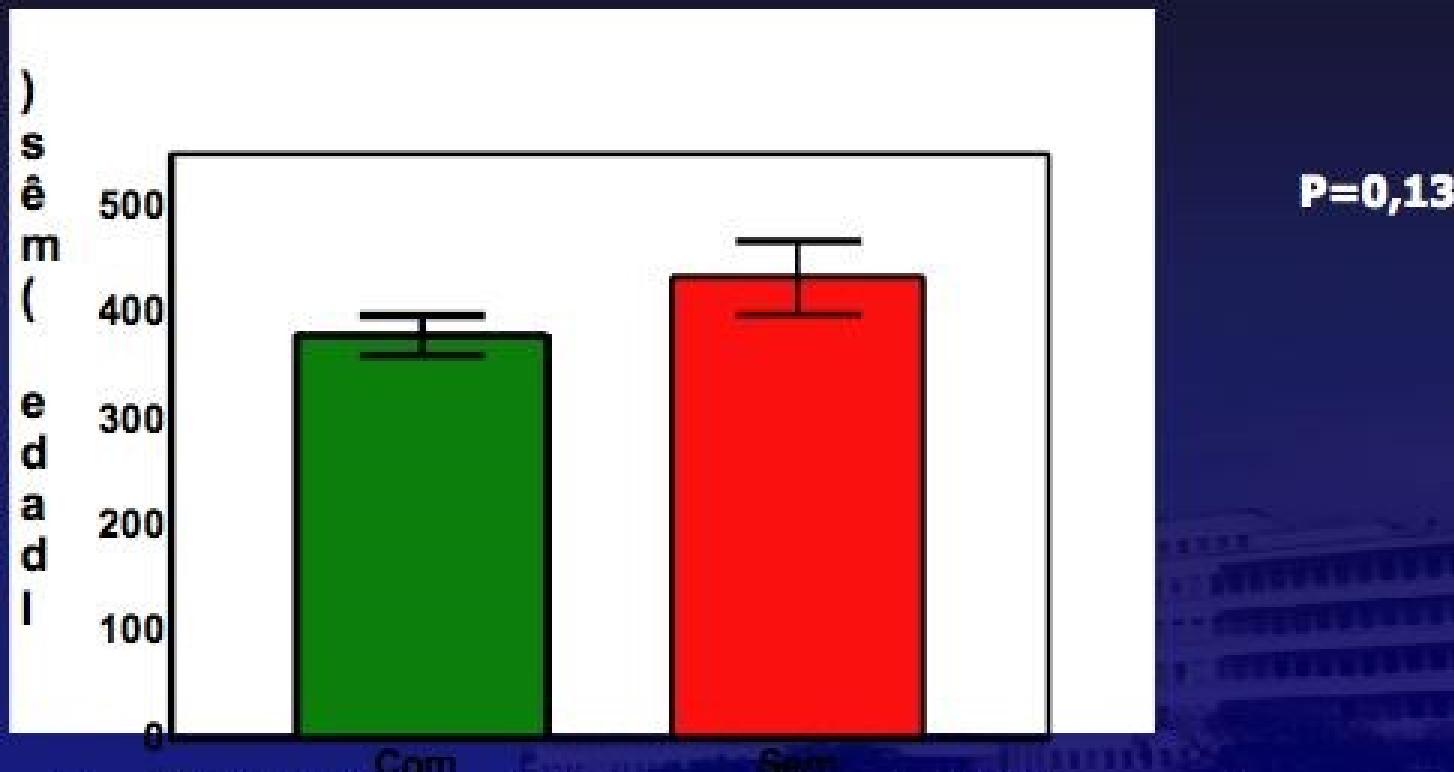


Gráfico 11 Idade (anos) dos pacientes por ocasião da infusão agrupados de acordo com a ocorrência, ou não, da melhora neurológica (potencial evocado) após a infusão das células progenitoras indiferenciadas autógenas

### Tempo de doença de acordo com a ocorrência de melhora neurológica

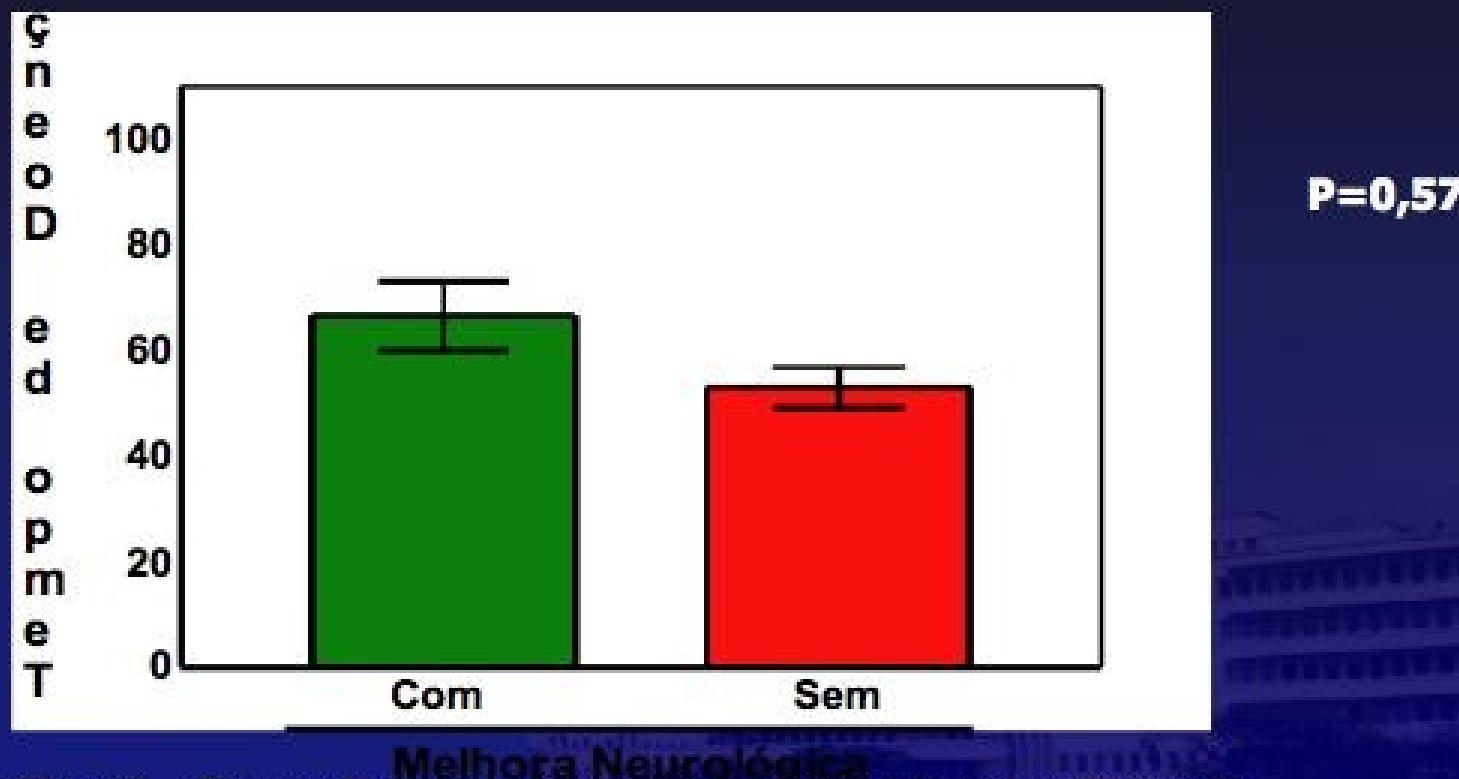


Gráfico 12

Tempo de doença dos pacientes (mês) agrupados de acordo com a ocorrência, ou não, da melhora neurológica (potencial evocado) após a infusão das células progenitoras indiferenciadas autógenas

### Nível de lesão de acordo com a ocorrência de melhora neurológica

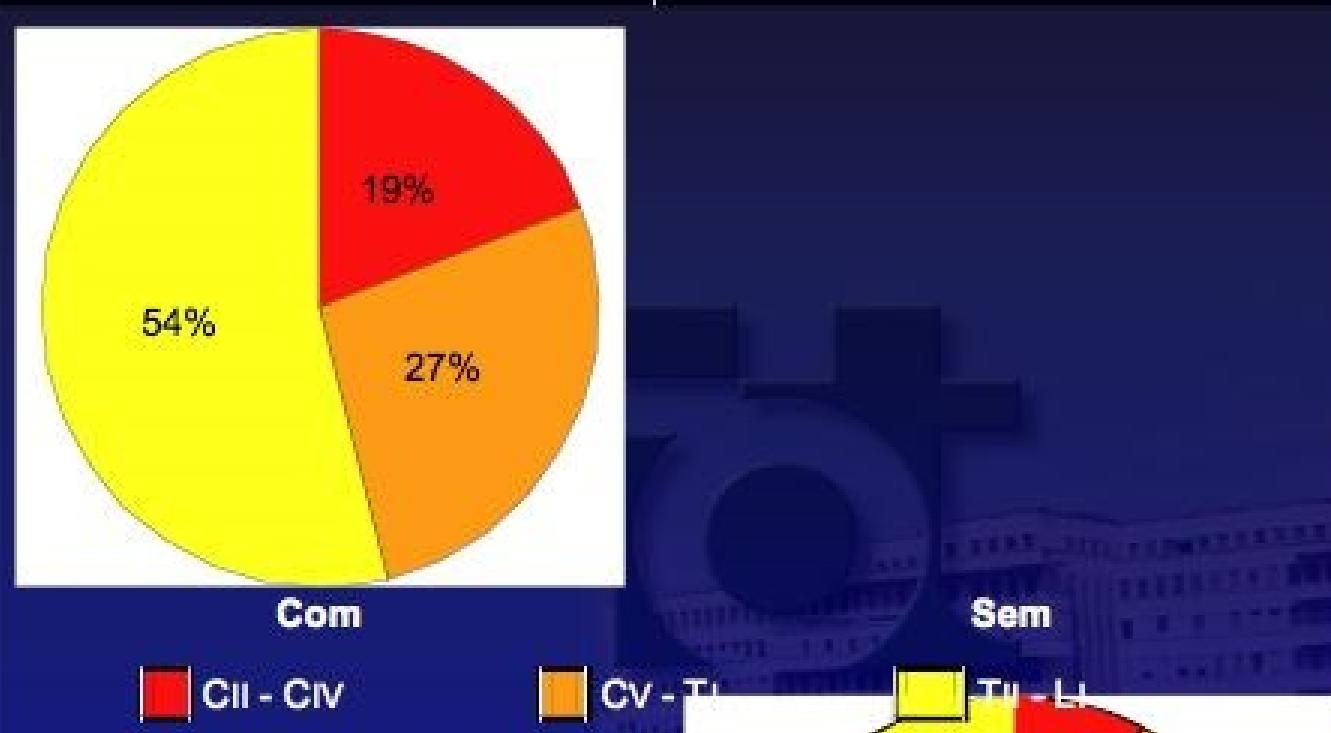
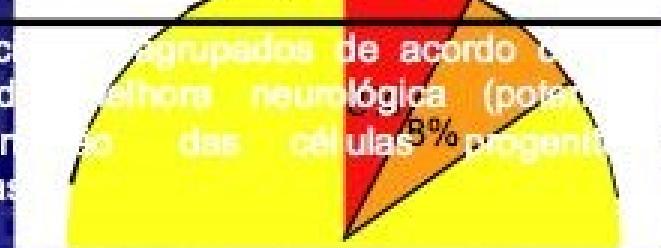


Gráfico 13 Nível da lesão dos pacientes agrupados de acordo com a ocorrência, ou não, de melhora neurológica (potencial evocado) após a imunoterapia das células indiferenciadas autógenas



### Causa externa da lesão de acordo com a ocorrência de melhora neurológica

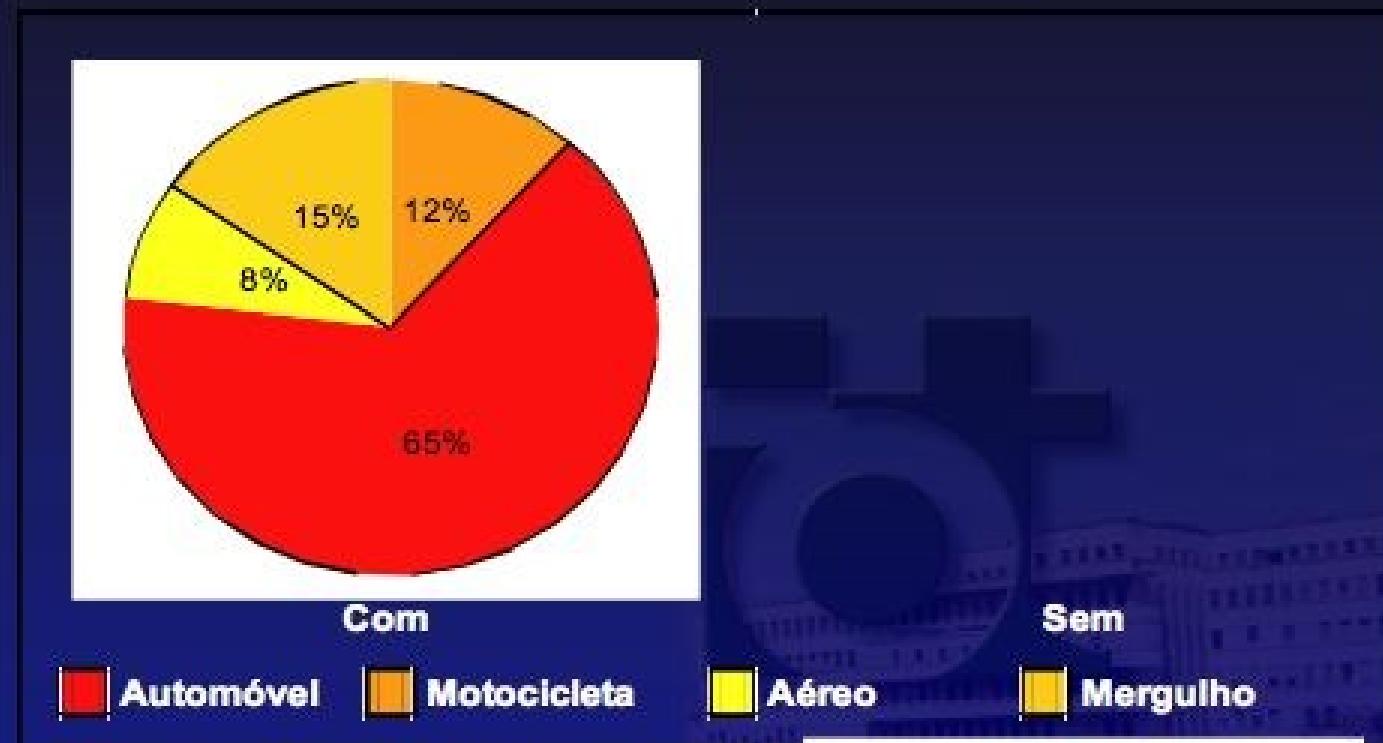
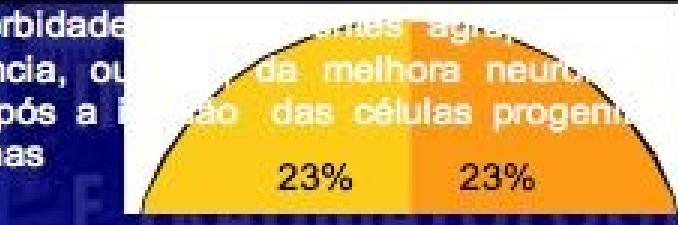
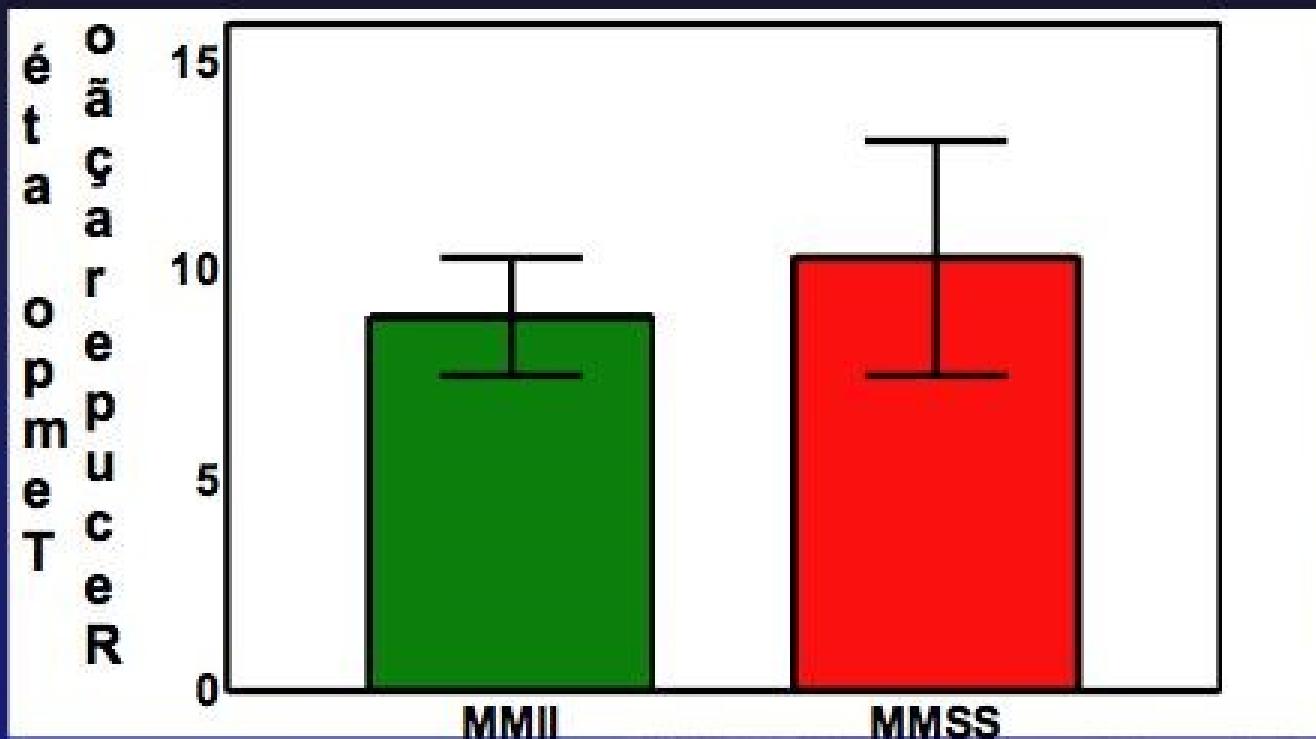


Gráfico 14

Causa extrema de morbidade de acordo com a ocorrência, ou não, de melhora neurológica (potencial evocado) após a infusão das células progenitoras indiferenciadas autógenas



### Tempo após a infusão até a ocorrência de melhora neurológica



# **COMPLICAÇÕES**

- **três:**
  - um caso de pneumotórax
  - dois casos de reação alérgica localizada durante a infusão de contraste
    - » Estes três pacientes concluíram todas as etapas do protocolo e não foi necessária a exclusão destes pacientes.
- **Não foram observados**
  - óbitos
  - piora do quadro neurológico
  - doença metaplásica.



# AÇÃO DO TRANSPLANTE DE CÉLULAS TRONCO

- variedade de mecanismos:
  - não específicos
    - ações tróficas,
    - liberação hormonal,
    - transmissores
  - específicos
    - reinervação de células hospedeiras
    - estabelecimento de conexões recíprocas entre o tecido transplantado e o tecido hospedeiro.

» (Bregman, 1986; Bregman, 1994; Horner, 1994).

## **ESTUDO EM HUMANOS**

- **Lakatos em 2002**
  - necessidade de ensaios clínicos para dar seqüência aos então promissores estudos experimentais já realizados.
- **Dobkin e Havton em 2004**
  - encorajam os estudos clínicos com células progenitoras
  - comitê de ética internacional para avaliação dos protocolos
  - pacientes com lesões completas e crônicas
    - de modo a minimizar os riscos de piora neurológica que poderia ocorrer em pacientes com lesão aguda ou incompleta.

# CÉLULAS TRONCO ADULTAS AUTÓLOGAS

- PROBLEMAS ÉTICOS, TÉCNICOS E IMUNOLÓGICOS  
NO EMPREGO DE CÉLULAS EMBRIONÁRIAS
- AUTÓLOGO – EVITAR IMUNOSSUPRESSÃO

» Whittemore, 1999; Debrovner, 2000

# **LESÕES TRAUMÁTICAS FECHADAS**

- FISIOPATOLOGIA MAIS CONHECIDA E  
ESTUDADA**



## **TEMPO DE LESÃO SUPERIOR A DOIS ANOS**

- **recuperação neurológica em pacientes com lesão completa ocorre nos primeiros 6 a 9 meses depois da lesão e que após 12 a 18 meses, praticamente não há mais recuperação**

» Burns em 2001, Ditunno em 1987, Waters em 1992, Waters em 1994

- **alteração no estado neurológico destes pacientes após inclusão no estudo poderia ser creditada a terapêutica testada.**
  - » optou-se por utilizar o quadro neurológico inicial dos pacientes como controle

# **POSITIVAÇÃO DO POTENCIAL EVOCADO**

- EXPLICAÇÃO**

- formação de novas sinapses entre os neurônios hospedeiros com os neurônios derivados das células tronco transplantadas**  
» Bregman, 1993
  - células gliais derivadas das células transplantadas que poderiam remielinizar células e restaurar suas propriedades de condução elétrica**  
» Crowe, 1997

## **POSITIVAÇÃO DO POTENCIAL EVOCADO**

- não se conseguiu identificar nenhum fator que se correlacionasse com uma chance maior de resposta ao implante de células tronco.
- somente a idade dos pacientes por ocasião da lesão revelou uma tendência de que quanto menor fosse a idade por ocasião da lesão maior seria a probabilidade de resposta ao implante de células tronco.

## **COMPARAÇÃO**

- Embora existam vários ensaios clínicos por todo o mundo envolvendo o uso de células progenitoras, poucos artigos foram publicados até o momento.
- Park et al. em 2005, descreveram num ensaio que incluiu seis pacientes com lesão medular completa que receberam transplantes de células progenitoras
  - Todos os seis pacientes tiveram melhora neurológica.

# FUTURO

- associação
- engenharia genética
  - orientação das células a serem transplantadas
  - produção de substâncias importantes para estimular a regeneração celular

**A infusão de células progenitoras autógenas em pacientes com lesão medular completa crônica levou a positivação do exame de potencial evocado somato-sensitivo em 66,7% dos pacientes**

**Para dois anos e meio de  
seguimento, o protocolo de  
mobilização, coleta e infusão de  
células progenitoras mostrou-se  
seguro.**