

**Lector Univ. Dr. Mihaela Andreescu**  
**Profesor Dr. Alina Daniela Tănase**

# **TERAPIE REGENERATIVĂ CU CELULE STEM**

*- Note de curs -*

EDITURA HAMANGIU • BUCUREȘTI • 2023

## 2.2. Tipuri de celule stem

Celulele stem au o istorie interesantă, care a dat naștere la numeroase dezbateri și controverse. Când o celulă stem se divide, fiecare nouă celulă are potențialul fie de a rămâne o celulă stem, fie de a deveni un alt tip de celulă cu o funcție specializată.

Toate bolile cunoscute până în prezent au o bază celulară-un defect apărut în replicarea celulară, în regenerarea și repararea tisulară-care să creeze un teren propice pentru dezvoltarea și autointreținerea procesului patologic. Ținând cont de acest fapt se poate afirma, teoretic, că orice boală poate fi tratată folosind celule stem (2).

Medicina regenerativă reprezintă, așadar, procesul prin care se creează un țesut funcțional, viabil și se restabilește sau înlocuiește o funcție a țesutului sau organului afectat. Prin terapie celulară se înțelege procesul de transplantare a celulelor umane sau animale pentru înlocuirea sau repararea celulelor sau țesuturilor afectate.

Organismul uman are capacitatea să regenereze țesuturile deteriorate și acest proces este posibil datorită celulelor stem; primele cercetări în acest domeniu au fost efectuate de către savantul rus A. Fridenstein în 1960 (22). La ora actuală terapia cu celule stem constituie o direcție nouă în medicina modernă, numită medicină regenerativă care include transplantarea celulară pentru tratamentul diverselor maladii.

Primul transplant de măduvă osoasă de la un donator înrudit (frate geamăn) la un pacient cu leucemie a fost efectuat în 1956 de către Dr. E Donall Thomas în New York. În 1973 a fost efectuat primul transplant cu donator neînrudit la un copil de 5 ani din New York cu SCID și donator din Danemarca. În 1978 au fost descoperite celulele stem în sângele de cordon ombilical, iar în 1993 a avut loc primul transplant reușit cu celule din sânge placentar și de atunci transplantul medular cu celule din cordonul ombilical a devenit o practică curentă.

Pentru transplant pot fi utilizate celule stem hematopoietice din măduva osoasă, sânge periferic, sânge de cordon ombilical de la donatori sănătoși compatibili HLA (transplant alogen) sau măduva osoasă și sângele periferic al pacientului (transplant autolog). Sângele de cordon ombilical conține un număr substanțial de celule stem hematopoietice care poate fi recoltat la naștere, conservat și transplantat pacienților cărora nu li se găsește un donator. La ora actuală în lume există sute de bănci publice de sânge de cordon ombilical.

### 2.2.1. Celule stem mezenchimale

Conceptul de celule stem mezenchimale a câștigat multă popularitate în ultimul timp. Acest concept își are originea la sfârșitul sec. al XIX-lea când s-a emis ipoteza că anumite țesuturi cum ar fi, sângele, pielea, au abilitatea de a se reînnoi de-a lungul vieții unui organism chiar dacă aceste țesuturi sunt compuse din celule cu durată scurtă de viață. Mulți ani mai târziu, identificarea celulelor stem ca entități celulare a deschis noi orizonturi pentru dezvoltarea de metode de izolare a acestor celule din diferite țesuturi. În 1960 Friedenstein et al. au descris acest tip de celule în măduva osoasă, ca fiind diferite de celulele stem hematopoietice, sunt aderente în cultură, asemănătoare fibroblaștilor și prezintă proprietăți osteogenice. În 1991 Caplan în paralel cu izolarea celulelor stem embrionare umane (ES), propune termenul de celule stem mezenchimale MSCs pentru acest tip de celule.

Celulele mezenchimale au fost izolate din foarte multe țesuturi, cum ar fi, țesutul adipos, hepatic, splenic, pancreatic, renal, pulmonar și nervos. În ultimii ani, celulele mezenchimale din măduva osoasă și țesutul adipos (BM-MSCs și AT-MSCs) prezintă un mare potențial pentru repararea tisulară, datorită abilității lor de a se diferenția în celule osoase, adipoase, cartilajinoase, musculare, neuronale, hepatocite și epiteliale în condiții specifice de cultivare *in vitro*.

Celulele stem mezenchimale din măduva osoasă hematogenă BM-MSc (Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells) sunt recoltate prin aspirare medulară și sunt izolate prin separare în gradient de densitate. Procedura este invazivă și cu risc de infecție.

Celulele stem mezenchimale AT-MSc (Adipose Tissue Mesenchymal Stem Cells) sunt izolate din țesut adipos recoltat prin liposucție, lipoplastie sau lipectemie. Pentru izolarea lor se practică digestia enzimatică. Celulele stem mezenchimale PB-MSc (Peripheral Blood Mesenchymal Stem Cells) sunt izolate din sânge periferic prin separare pe gradient de densitate. Celulele stem mezenchimale reprezintă o sursă majoră de celule pentru terapia celulară, în principal datorită abilității lor de reînnoire și diferențiere în diferite tipuri.

Celulele stem sunt definite ca fiind clonogene, având capacitatea de reînnoire și diferențiere în diferite linii celulare. Calea lor de diferențiere este unidirecțională, trecând prin diferite stadii până la stadiul de celulă diferențiată. Diferențierea celulelor stem adulte, s-a presupus a fi restricționată doar la țesutul din care celulele stem rezidă (ex.: celulele stem

hematopoietice generează celule sanguine, progenitoare hepatice (celule ovale) hepatocite și colangiocite). În ultimii ani s-a demonstrat că celulele stem pot să sară bariera liniară și să se diferențieze în alte tipuri de celule printr-un proces de transdiferențiere. Modelul de transdiferențiere a celulelor stem explică de ce celule stem din măduva osoasă sau sânge periferic transplantate, au fost regăsite în țesuturi specifice de organ solid. Două mecanisme joacă un rol important în terapia celulară: eliberarea moleculelor de adezina și citokine în mediul extracelular în țesutul afectat și creșterea concentrației de celule stem la nivelul țesutului afectat.

### 2.2.1.1. Scurt istoric

Celulele stem mezenchimale au fost descoperite în anul 1970 de către A.J. Friedenstein, care le-a descris ca celule aderente, non-hematopoietice, capabile să formeze colonii fibroblastice *in vitro* (22). Friedenstein a denumit acest tip celular unități formatoare de colonii fibroblastice (eng. *fibroblastic colony-forming units*-CFU-Fs). Ulterior, T.M. Dexter a introdus un model de cultură pentru celulele stem hematopoietice, ce a facilitat cunoașterea ierarhiei celulare în sistemul hematopoietic. Astfel, CFU-Fs au fost identificate în stratul aderent stromal al culturilor propuse de Dexter (81), fapt care a inițiat teoria conform căreia aceste celule sunt prezente în stroma măduvei osoase. Concepția existenței CSM la vârful ierarhiei celulelor non-hematopoietice în măduva osoasă a apărut ca și consecință a unui sistem stromal cu celule stem stromale în vârful ierarhiei, propus de M. Owen (91) Această ierarhie nonhematopoietică a dus la cunoașterea proprietăților acestor tipuri de celule dintr-o varietate de țesuturi ca: tendon, ligament, țesut adipos, cartilaj, os (29).

Datorită capacității de proliferare în cultură și de diferențiere în condiții adecvate *in vitro* sau implantate *in vivo*, aceste tipuri de celule au fost definite ca celule stem mezenchimale (29). Faptul că măduva osoasă conține CSM este o descoperire foarte utilă datorită proprietății acestor celule de a se diferenția în tipuri celulare specifice țesuturilor, sub acțiunea stimulilor adecvați de diferențiere. CSM sunt distribuite la nivelul întregului organism, concept sugerat de numeroși cercetători care au izolat celule capabile să prolifereze și să se diferențieze în tipuri celulare, utilizând diverse organe ca surse celulare (28).

Societatea Internațională pentru Terapie Celulară (SITC) a propus ca termenul de *celulă stem mezenchimală* să fie utilizat numai pentru celulele

care îndeplinesc toate criteriile unei celule stem (25). Criteriile elaborate de SITC pentru definirea celulei stromale mezenchimale multipotente au fost minime: să fie pozitive pentru CD73, CD90, CD105 și negative pentru CD11b, CD14, CD19 sau CD 79 $\alpha$ , CD 34, Cd45 și HLA-DR; să se diferențieze *in vitro* în condroblaști, osteoblaști și adipocite (26).

Totuși, pe măsură ce știința evoluează, se preconizează o modificare în criteriile pentru nomenclatură.

În prezent, există studii contradictorii privind apartenența celulelor stem mezenchimale la populațiile celulare heterogene sau omogene. Cercetările care pledează pentru apartenența celulelor stem mezenchimale la populațiile celulare omogene au fost obținute într-un studiu datând din anul 1999, care arată că CSM cultivate în loturi preselectate au fost omogen pozitive sau omogen negative pentru 48 de molecule, astfel indicând apartenența la populații celulare omogene (19). Pe de altă parte, teoria apartenenței celulelor stem mezenchimale la populațiile celulare heterogene este sugerată de un studiu care a analizat CSM umane. Acesta arată că există clone apte de diferențiere în trei, două sau un singur tip celular matur, iar frecvența clonelor tripotente scade când celulele nu sunt amplificate în cultură (29). În plus, când CSM au fost cultivate o singură celulă/godeu, frecvența clonelor formatoare de colonii a fost de aproximativ 50% și au arătat proprietăți fenotipice similare cu cele ale populațiilor parentale (26). Aceste rezultate sugerează că CSM reprezintă populații heterogene.

Datele actuale cu privire la CSM au fost obținute în mare parte datorită experimentelor *in vitro* utilizând culturi celulare, ceea ce face ca transpunerea rezultatelor *in vivo* să fie dificilă. Nu pot fi utilizați aceiași markeri de identificare a CSM din culturi celulare pentru recunoașterea celulelor stem *in vivo* datorită faptului că expresia markerilor poate fi influențată mai degrabă de condițiile de cultură decât de caracteristicile CSM *in situ* (29.)

De-a lungul timpului s-a sugerat că CSM prezintă similarități cu pericitele *in vitro* (28) și sunt asociate cu vasele sanguine *in vivo* (23). Pericitele sunt celule localizate la nivelul vaselor sanguine, în contact intim cu celulele endoteliale. Termenul *pericite* poate fi însă folosit pentru o serie de celule periendoteliale, indiferent de localizarea anatomică sau de integrarea lor la nivelul membranei bazale a vaselor sanguine (celule mezangiale ale glomerulilor renali, celule perisinusoide în sinusoidale, celule stelate hepatice). În viziunea cercetătorilor, unele pericite reprezintă celule stem în țesuturile de origine și corespund celulelor stem mezenchimale din țesuturile conjunctive (28).

O consecință a asocierii CSM cu vasele sanguine este corelarea frecvenței coloniilor fibroblastice observate în CFU-Fs cu densitatea vasculară. Cu toate acestea, pericitele și CSM nu sunt echivalente. CSM provenind din diverse surse tisulare prezintă diferențe privind expresia genelor și potențialul de diferențiere observate la CSM obținute din organe diferite, fapt care sugerează că CSM sunt formate încă din perioada prenatală. Cel mai important candidat pentru înlocuirea celulelor stem mezenchimale în țesuturile conjunctive *in vivo* sunt pericitele, însă nu există încă dovezi clare că acestea posedă același potențial de auto-reînnoire.

Recent, Sachetti et al. au arătat că celulele adventiciale reticulare CD146 pozitive (pericitele din măduva osoasă) implantate cobailor, sunt capabile să formeze un mediu hematopoietic, păstrându-și această caracteristică la implantări ulterioare (7). Totuși, aceste celule au fost crescute în cultură anterior implantării și nu s-au înregistrat date de reînnoire *in vivo*, deși numărul celulelor implantate ulterior nu a fost evaluat. Este tehnic dificilă demonstrarea auto-reînnoirii CSM *in vivo* datorită ratei de turn-over a țesuturilor conjunctive, cu mult sub cea a țesuturilor hematopoietice (8).

Datorită caracteristicilor biologice, CSM au devenit o posibilitate terapeutică atractivă atât pentru bolile maligne prin capacitatea de localizare la nivelul tumorii, cât și în medicina regenerativă prin potențialul de diferențiere. CSM posedă proprietatea de a înlocui celulele afectate și pot fi utilizate ca supresoare în bolile grefă-versus-gazdă (13). Cunoașterea efectelor CSM asupra dezvoltării tumorale și a metastazării au devenit ținta celor mai recente studii de specialitate. Rezultatele acestor studii sunt însă controversate. Unele studii relevă faptul că CSM pot iniția cancerul *in vivo* (16) sau se pot transforma în celule tumorale *in vitro* (12) pe când un număr important de studii recente demonstrează inhibiția creșterii tumorale și o rată de supraviețuire a pacienților mai mare (13). Terapia cu CSM și-a găsit aplicabilitatea în ultima perioadă, fiind utilizată experimental *in vitro* și *in vivo*, inducând apoptoza celulelor tumorale și inhibând metastazarea carcinomului hepatocelular și de prostată (14). În plus, terapia cu CSM și-a dovedit eficacitatea într-un model de sarcom Kaposi, o tumoră angio-genică puternic inflamatorie, prin efectele antitumorale exercitate (6). Cu toate acestea, s-a stabilit că CSM joacă un rol important și în dezvoltarea anumitor boli maligne prin factorii secretați ce activează diverse căi de semnalizare celulară, însă mecanismul prin care CSM acționează asupra creșterii tumorale și metastazării nu este pe deplin elucidat. Impedimentul principal în interpretarea cu precizie a efectelor CSM în bolile maligne este reprezentat de utilizarea a diverse linii celulare tumorale și de variațiile în tehnicile și modelele experimentale (13).