

Revisão / Review

Características biológicas das células-tronco mesenquimais

Biological characteristics of mesenchymal stem cells

Sergio P. Bydlowski¹

Adriana A. Debes²

Luciana M. F. Maselli³

Felipe L. Janz⁴

Células-tronco são células indiferenciadas. Como tal, apresentam uma série de características que as tornam candidatas à utilização terapêutica. As principais características das células-tronco são a capacidade de autorrenovação e de se diferenciarem em diversos tipos celulares. Desta forma, acredita-se que células-tronco presentes nos diferentes tecidos tenham papel regenerativo quando estes sofrem uma lesão ou injúria. Entre os tecidos conhecidos por apresentarem células-tronco após a vida pós-natal, a medula óssea foi a mais estudada, por muitos anos, como fonte tanto de células-tronco hematopoéticas quanto de células-tronco mesenquimais, também denominadas de células mesenquimais estromais da medula óssea ou células estromais mesenquimais multipotentes. Estas células são um grupo de células clonogênicas, presentes no estroma da medula óssea, que, quando submetidas a diferentes estímulos apropriados, são capazes de se diferenciarem em várias linhagens de células, como a osteogênica, a condrogênica e a adipogênica e, possivelmente, em outros tipos celulares não mesodérmicos, como células neurais ou hepatócitos. Nesta revisão, as principais características das células-tronco mesenquimais serão abordadas, incluindo os marcadores moleculares e de membrana, as características de divisão e de diferenciação, a heterogeneidade e as aplicações clínicas potenciais. Rev. Bras. Hematol. Hemoter. 2009;31(Supl. 1):25-35.

Palavras-chave: Célula-tronco; célula-tronco mesenquimal; marcadores; diferenciação celular; aplicações clínicas.

Introdução e Definição

Células-tronco são células indiferenciadas. As principais características das células-tronco, tornando-as extremamente interessantes, são: sua capacidade de autorrenovação, ou seja, são capazes de se multiplicar, mantendo seu estado indiferenciado, proporcionando uma reposição ativa de sua população de maneira constante nos tecidos; e, mais interessante ainda, sua capacidade de se diferenciarem em diversos tipos celulares.¹ Desta forma, acredita-se que células-tronco presentes nos diferentes tecidos tenham papel regenerativo

quando estes sofrem uma lesão ou injúria.^{2,3}

Entre os tecidos conhecidos por apresentarem células-tronco após a vida pós-natal, a medula óssea foi a mais estudada, por muitos anos, como fonte tanto de células-tronco hematopoéticas (*hematopoietic stem cells* – HSC), quanto de células-tronco mesenquimais (*mesenchymal stem cell* – MSC).

Células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea humana (hMSC), também conhecidas como células-tronco esqueléticas, células estromais da medula óssea ou, como recentemente sugerido pela International Society for

¹Diretor do Laboratório de Genética e Hematologia Molecular, LIM-31, Hospital das Clínicas da FMUSP. Professor Associado de Hematologia e Hemoterapia da Faculdade de Medicina da USP – São Paulo-SP.

²Chefe do Departamento de Biologia Celular da Fundação Pró-Sangue, Hemocentro de São Paulo-SP.

³Vice-chefe do Laboratório de Genética e Hematologia Molecular, LIM-31, Hospital das Clínicas da FMUSP – São Paulo-SP.

⁴Bioquímico. Aluno de Pós-graduação da Faculdade de Medicina da USP – São Paulo-SP.

Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (USP) – São Paulo-SP.

Correspondência: Sergio Paulo Bydlowski

Av. Dr. Enéas Carvalho de Aguiar, 155, 1º andar, sala 43, Divisão de Pesquisa – Cerqueira César
05403-000 – São Paulo-SP – Brasil

E-mail: sbydlow@usp.br

Doi: 10.1590/S1516-84842009005000038

Cytherapy,^{4,14} células estromais mesenquimais multipotentes, são um grupo de células clonogênicas, presentes no estroma da medula óssea, capazes de diferenciação em várias linhagens de células do tipo mesodérmico e, possivelmente, mas ainda parte de assunto controverso, em outros tipos celulares não mesodérmicos, como células neurais ou hepatócitos. Estas células, quando submetidas a diferentes estímulos, foram descritas como capazes de diferenciações como a osteogênica,^{5,6} condrogênica,⁷ adipogênica,⁸ neurogênica⁹ e cardiogênica.¹⁰ As MSCs situam-se na fração estromal da medula óssea, que provê um microambiente que suporta a hematopoese. De fato, estas células fornecem o suporte do estroma para o crescimento e diferenciação de células-tronco hematopoéticas e para a hematopoese. Constituem uma população muito pequena. Na medula adulta fresca, são cerca de somente 0,01% a 0,0001% das células nucleadas. As MSCs são uma população heterogênea de células que proliferam, *in vitro*, como células aderentes ao plástico, tendo morfologia semelhante ao fibroblasto.

A presença de células-tronco não hematopoéticas na medula óssea foi primeiramente sugerida pelo patologista alemão Julius Clonheim, em 1867. Seu trabalho levantou a possibilidade de que a medula óssea pudesse ser a fonte de fibroblastos que depositam fibras colágenas como parte do processo normal de reparo. Friedenstein, na Rússia, foi o primeiro pesquisador a identificar células estromais precursoras, há mais de 40 anos; descreveu o isolamento, na medula óssea, de células clonogênicas aderentes ao substrato, em formato de espícula, em culturas em monocamadas, que definiu como unidades de colônias formadoras de fibroblastos (CFU-Fs). As células aderentes eram heterogêneas e ficavam inativas por dois a quatro dias, e aí começavam a proliferar rapidamente. Após várias passagens em cultura, as células aderentes se tornavam mais homogêneas fibroblastoides na aparência. Estas células são agora denominadas de células-tronco mesenquimais, pela habilidade em se diferenciarem em células do tipo mesenquimal, ou células estromais da medula, porque parecem originar-se do complexo de estruturas de suporte encontrado na medula. As observações iniciais de Friedenstein serviram de base para estudos posteriores, como os de Owen, na Grã-Bretanha, mostrando que as células estromais da medula óssea são os precursores comuns dos tecidos mesenquimais. Como resultado da capacidade de autorrenovação e diferenciação, as células estromais de medula óssea foram consideradas células-tronco por Caplan e denominadas de células-tronco mesenquimais.

As células estromais da medula óssea são raras e heterogêneas, como visto, sendo uma mistura de progenitores em diferentes estágios de comprometimento com a linhagem mesodérmica; somente uma pequena quantidade tem capacidade multipotencial e de autorrenovação. Aceita-se que a maior parte das células estromais progenitoras derivadas da medula óssea possa ser considerada, após a proliferação *in vitro*, como sendo MSCs. São células multipotentes, ou seja,

células que já se diferenciaram em direção a uma linhagem celular mais específica, embora possam se diferenciar em alguns tipos celulares distintos de diferentes tecidos, porém relacionados.¹¹

Como veremos, as MSCs podem ser encontradas não somente na medula óssea, mas também nos tecidos mesenquimais presentes em todos os órgãos do corpo; fornecem suporte estrutural, além de regular a passagem de células através dos tecidos. São capazes de expressar os marcadores de indiferenciação OCT-4, NANOG e SSAE 3/4.¹² Células-tronco mesenquimais, embora possuam uma capacidade de diferenciação mais limitada que as células-tronco embrionárias, apresentam grandes vantagens, levando-se em conta a facilidade de isolamento destas células, sua capacidade de propagação em cultura, e de não serem imunogênicas, podendo ser teoricamente empregadas em transplantes alogênicos.¹³

O propósito desta revisão é prover uma atualização relacionada à biologia das MSCs e aos desafios que cercam seu uso terapêutico.

Marcadores de MSC

Segundo a International Society for Cellular Therapy, são três os requerimentos mínimos para uma população de células ser classificada como MSC. A primeira é que MSCs são isoladas de uma população de células mononucleares com base à sua aderência seletiva, em cultura, à superfície do plástico, comparado, no caso da medula óssea, às células hematopoéticas; de qualquer modo, uma desvantagem deste método é uma possível contaminação por células hematopoéticas e a heterogeneidade celular com relação ao potencial de diferenciação. A segunda é que as expressões de CD105, CD73 e CD90 estejam presentes, e que CD34, CD45, CD14, ou CD11b, CD79, ou CD19 e HLA-DR não sejam expressos em mais de 95% das células em cultura. Por fim, que as células possam ser diferenciadas em osso, gordura e cartilagem.¹⁴

Um grande problema na caracterização das MSCs é que não há um marcador positivo definido e definitivo para elas. Há uma gama ampla de marcadores positivos descritos, mas cada grupo de investigadores usa diferentes marcadores, nenhum deles específico ou exclusivo. Talvez as diferenças entre os estudos possam ser atribuídas a variações nos métodos de cultura ou ao estágio de diferenciação das células. De qualquer modo, sem marcadores definidos, os estudos *in vivo* das linhagens celulares tornam-se muito difíceis.

Há um consenso geral que MSCs humanas adultas de medula óssea não expressam os marcadores hematopoéticos CD45 (marcador de todas as células hematopoéticas), CD34 (um marcador de célula-tronco hematopoética primitiva, raramente expressa em MSCs humanas, apesar de ser positiva em camundongos), e CD14. Não expressam CD11b (um marcador de célula imune) e glicoforina-A (marcador de linhagem eritróide). CD117 (um marcador de célula-tronco progenitora

hematopoética) está quase sempre ausente de MSCs humanas. Não expressam as moléculas coestimulatórias CD80, CD86 e CD40, ou as moléculas de adesão CD31 (PECAM-1, expresso em células endoteliais e hematopoéticas), CD18 (LCAMB), CD56 (NCAM-1). Expressam níveis variáveis de CD105 (endoglina), CD73 (ecto-5'-nucleotidase), CD44, CD90 (Thy-1), CD71 (receptor de transferrina), gangliosídeo GD2 e CD271 (receptor do fator de crescimento nervoso de baixa afinidade), que são reconhecidos pelo anticorpo monoclonal Stro-1, assim como as moléculas de adesão CD106 (VCAM-1), ALCAM, ICAM-1 e CD29. Estes são alguns dos marcadores expressos ou não descritos por diferentes grupos.¹⁵

Stro-1 é o marcador de MSC mais conhecido. A população de células negativas para Stro-1 não é capaz de formar colônias. Seleção negativa contra glicoforina-A, juntamente com seleção de células fortemente positivas para Stro-1 aumenta o número de CFU-Fs de células de medula óssea numa frequência de 1 a cada 10. Já o CD106 é identificado em cerca de 2% das células Stro-1-positivas, aumentando a frequência de CFU-Fs a 1 em cada 3. Entretanto, Stro-1 não é um marcador geral de MSCs, pois não é exclusivo de MSCs e sua expressão é gradativamente perdida durante a expansão em cultura, limitando o seu uso no isolamento de MSC ou sua identificação nas passagens iniciais. Talvez, porém, combinações como Stro-1 e CD106 poderiam constituir bons marcadores para a identificação de MSCs humanas.¹⁶

Células precursoras mesenquimais foram descritas no sangue de indivíduos normais, e estas expressam muitos dos mesmos marcadores das MSCs da medula, assim como a capacidade de diferenciação em células adiposas e osteoblásticas. Entretanto, parece haver uma população separada de células fibroblastoides, que são células precursoras mesenquimais circulantes no sangue, que podem migrar aos tecidos.

A expressão variável de muitos dos marcadores de linhagem pode ser devida não somente aos diferentes métodos de isolamento celular e características da cultura, mas também à variação na origem do tecido e às diferentes espécies. Por exemplo, o tecido adiposo humano é uma fonte de células-tronco multipotentes que podem diferenciar-se em várias linhagens mesenquimais *in vitro*. Mas, há algumas diferenças na expressão de marcadores particulares: expressam CD49d, o que não ocorre com as MSCs de medula óssea, enquanto estas expressam CD106, mas não as de tecido adiposo. CD106, nas MSCs de medula, tem sido associado funcionalmente à hematopoese; assim, a falta de sua expressão nas MSCs de tecido adiposo é consistente com a localização destas células em tecido não-hematopoético.¹⁵

Estes exemplos ilustram que as células precursoras mesenquimais são fenotipicamente heterogêneas e que a relação, semelhanças e diferenças entre as MSCs tradicionais de medula óssea e outras células semelhantes às MSCs, da própria medula ou de outros tecidos, ainda necessitam ser elucidadas.

Características das MSCs *in vitro*

As MSCs podem ser isoladas por vários métodos, sendo o mais frequente o gradiente de densidade para obtenção de células mononucleares. As células mononucleares isoladas são cultivadas com meio contendo soro fetal, sendo que as MSCs aderem ao plástico. Algumas células da linhagem hematopoética também podem aderir, mas, com o tempo, com as várias trocas do meio de cultura, são removidas. Portanto, enquanto este procedimento elimina a maior parte das células contaminantes, a heterogeneidade remanescente da cultura diminui progressivamente com as diversas passagens e, após determinado número delas, a cultura torna-se enriquecida pela fração que se autorrenova, as MSCs. As MSCs são fibroblastoides, com formato fusiforme.

Após um *lag* inicial, as células se dividem rapidamente. Durante seu crescimento inicial *in vitro*, formam colônias denominadas, em analogia com as células-tronco hematopoéticas, de colônia formadora de unidades de fibroblastos (CFU-f). Apesar de não serem imortais, as MSCs têm a capacidade de se expandir numerosas vezes em cultura, mantendo seu potencial de crescimento e pluripotencialidade, com um tempo de duplicação que depende do doador do qual as células foram obtidas e da densidade de plaqueamento inicial. De fato, a densidade de sementeira é um parâmetro crítico para assegurar uma boa taxa de expansão e a manutenção do potencial de diferenciação das MSCs. Alguns pesquisadores demonstraram que, para algumas culturas, há necessidade de iniciá-las com uma densidade muito baixa.

Estas células apresentam inibição do crescimento ao atingir a confluência, levando à necessidade de várias passagens sucessivas para se obterem grandes quantidades de MSCs altamente enriquecidas, com ausência de outros tipos celulares. Porém, se mais passagens são necessárias, isto pode alterar a qualidade das MSCs. Em humanos, após as primeiras três semanas de início da cultura, e cerca de 12 a 15 duplicações, passagens sucessivas levam à diminuição das taxas de proliferação celular, e as células progressivamente mostram perda da multipotencialidade. Estas alterações são mais pronunciadas quando se utiliza material de origem adulta do que as células derivadas de crianças.

O comprometimento das MSCs em uma dada linhagem específica é enormemente influenciada, *in vitro*, pelas condições de cultura, especialmente fatores de crescimento, como veremos mais adiante. Há graus diversos de heterogeneidade nas culturas, após isolamento e purificação; ocasionalmente encontram-se células arredondadas, pequenas, no meio das fibroblastoides. Esta diversidade levanta a questão sobre o que as MSCs realmente representam: células do estroma da medula óssea? Células capazes de formar tecido mesodérmico? Células capazes de formar outros tecidos? Todos estes tipos celulares? Em tese, na ausência de marcadores específicos, as MSCs podem incorporar um número de diferentes populações celulares,

todas potencialmente variáveis em suas características fenotípicas e de crescimento, sendo a diferenciação mesenquimal um denominador comum.

Diferenciação das MSCs

A diferenciação celular ocorre normalmente já no útero materno nos primeiros estágios da gravidez, em um processo conhecido como organogênese.¹⁷ São vários os processos envolvidos na diferenciação celular, mas existem três principais:

a) *Interação célula-célula*: faz com que células muito próximas umas das outras passem a secretar substâncias que irão fornecer um ambiente propício à diferenciação, como o que ocorre durante o processo de gastrulação na embriogênese, onde as células se diferenciam para formar os três folhetos embrionários que darão origem aos diferentes órgãos do corpo.¹⁸

b) *Divisão celular*: as células podem se dividir de duas formas distintas. Na divisão simétrica, uma célula dá origem a duas células-filhas que são idênticas entre si e exatamente iguais à célula-mãe. Neste caso não ocorre diferenciação. Porém, na divisão assimétrica, a distribuição dos componentes celulares no momento da citocinese ocorre de forma desigual. Sendo assim, as células formadas são diferentes entre si, podendo uma delas ser igual ou diferente da célula-mãe e, desta forma, participar da formação de diferentes tecidos.¹⁹

c) *Regulação gênica*: existem muitos processos envolvidos na regulação gênica. Não discutiremos aqui mutações que interferem na expressão gênica, uma vez que estamos falando de processos de diferenciação que ocorrem em células normais, embora este não seja um fator a ser desprezado. Os dois processos principais na regulação gênica envolvem a acetilação da cromatina, que é responsável pela diferença entre heterocromatina – onde os genes encontram-se "escondidos" e, portanto, inativos, devido à formação dos nucleossomos e superenrolamento observado em determinadas regiões do genoma; e eucromatina – que é a região do genoma que se encontra geneticamente ativa, ou seja, os genes desta região do genoma estão sendo expressos. Este processo é regulado basicamente por duas enzimas: a histona-acetil-transferase, que promove a acetilação e, portanto, o desligamento do gene, e a histina-desacetilase, que remove os grupos acetila e torna, assim, os genes ativos. Acredita-se ainda que pequenas sequências de RNA de interferência pudessem atuar de maneira a sinalizar quais regiões do genoma seriam acetiladas ou não.²⁰ O outro processo envolvido na regulação gênica é o da metilação de determinadas sequências gênicas, principalmente as regiões promotoras que fazem com que o gene regulado por elas não seja expresso quando esta se encontrar metilada. Células diferentes expressam diferentes proteínas, o que as tornam distintas umas das outras.²¹

MSCs são capazes de formar osteoblastos, condrócitos e adipócitos *in vitro* e *in vivo*. Em adição à identificação das MSCs baseadas em suas características morfológicas ou fenotípicas, a habilidade de células clonais expandidas em formar estes três tipos celulares distintos é o único critério funcional disponível para identificar MSCs genuínas e distingui-las de preosteoblastos, preadipócitos ou precondrócitos, que dão origem a somente um tipo celular.

Vários estudos mostraram que as células precursoras estromais multipotenciais podem também diferenciar-se em linhagens germinativas não relacionadas, num processo denominado de transdiferenciação. Assim, MSCs podem diferenciar-se em células da linhagem mesodérmica, como osso, gordura e cartilagem, mas também teriam o potencial de diferenciação endodérmica e neuroectodérmica.¹⁶ Apesar das MSCs adultas serem consideradas comumente como de origem mesodérmica, MSCs embrionárias derivam do neuroepitélio e da crista neural. De fato, células estromais derivadas da medula óssea não constituem uma população homogênea.¹⁵

MSCs também são capazes de se diferenciar *in vitro*, sob condições apropriadas, em outras linhagens celulares, como tenócitos e células do mesoderma visceral (células endoteliais). Apesar de controverso, MSCs são relatadas como podendo se diferenciar em miócitos esqueléticos e cardiomiócitos e mesmo em células de origem não mesodérmica, como hepatócitos, células produtoras de insulina, e neurônios.

Diversos fatores, como métodos de isolamento, tipo de superfície da cultura, meio de cultura, densidade de semeadura, tratamento com diferentes fatores de crescimento e produtos químicos, afetam não somente a expansão e propriedades imunogênicas das MSCs, mas também a diferenciação. Idade do doador de células, ou presença, ou estágio de doença também podem influenciar.

Vários são os sinais químicos e/ou biológicos que atuam como indutores da diferenciação de MSCs. Fatores como TGF- β (o mais potente deles), IGF-1, bFGF, EGF, PDGF, Wnt, ascorbato estimulam o potencial de diferenciação das MSCs em condrócitos.⁷ Várias vias de sinalização intracelulares, como MAPK e Smads, são ativadas, induzindo vários fatores de transcrição (SOX9, SOX5, SOX6), levando à produção de proteínas de matriz celular, incluindo colágeno tipo II, agregcan, requeridos para a formação de cartilagem.

BFGF ou Wnt podem estimular o potencial de diferenciação osteogênica ou neural. O meio suplementado com 1,25-diidroxivitamina D3, 2-fosfato-ascorbato e β -glicero-fosfato pode induzir a diferenciação osteogênica.⁵ VEGF, por sua vez, estimula o potencial de diferenciação endotelial. Dexametasona, juntamente com isobutil-metilxantina, insulina e indometacina, estimulam o potencial adipogênico;⁸ vacúolos ricos em lipídeos, detectáveis por coloração com *oil red O*, acumulam-se no interior das células, que passam a expressar PPAR- γ 2. Meios com baixa concentração de soro

contendo dimetil-sulfóxido (DMSO) induzem a diferenciação em células semelhantes a neurônios.⁹ 5-azacitidina, anfo-tericina B e hidrocortisona¹⁰ diferenciam as MSCs em mio- blastos, em algumas situações são capazes de se fundir em miotúbulos e exibir batidas rítmicas. Nicotinamida e β- mercaptoetanol induzem diferenciação de MSCs de ratos em células β de ilhotas pancreáticas.

Com base nas informações fornecidas por diversos estudos foi proposto o seguinte modelo de regulação da diferenciação celular. A princípio as células poderiam ser divididas em dois grandes grupos: células-tronco e células "comprometidas". Nesta proposta, as células-tronco estariam sujeitas a modificações transcricionais gerando células precursoras sem modificações significativas em seu fenótipo ou capacidade de autorrenovação. Quando submetidas a estímulos específicos, MSCs sofrem divisão celular assimétrica, dando origem a uma célula que mantém a multipotência da célula-mãe e a outra apresentando uma capacidade mais restrita de diferenciação, tornando-se tripotente (dá origem a três diferentes tipos celulares) ou bipotente (dois tipos celulares). A partir deste momento, embora algumas células possam preservar similaridades morfológicas com as células multipotentes, apresentam diferenças na expressão gênica. Quando uma célula torna-se unipotente, ela possui propriedades específicas da linhagem final com produtos específicos e morfologia bem característica.

A diferenciação de MSCs pode ocorrer *in loco*, ou seja, MSCs são aplicadas no local da lesão e, a partir daí, estarão expostas aos estímulos locais que levariam à diferenciação celular, como já relatado em estudos em animais, principalmente nos estudos de reparo cardíaco após infarto de miocárdio.^{22,23} A diferenciação que ocorre, porém, é muito pouco controlada e os estudos em longo prazo mostraram que, com o passar do tempo, os indivíduos submetidos a experimentos nos quais as MSCs eram injetadas na circulação apresentavam arritmia cardíaca.²⁴

O mecanismo completo da diferenciação celular ainda não está definido¹² e para um melhor entendimento seria necessário responder a inúmeras questões. Como são os processos de diferenciação *in vivo*? Existe uma via regulatória comum que atua como um interruptor único e que pode ser manipulado para promover a diferenciação de células-tronco? Como células progenitoras e precursoras diferenciam-se seletivamente em um tipo celular e não outro? Células precursoras podem ser predeterminadas a desdiferenciar e mudar seu "comprometimento" e fenótipo? Será que células totalmente diferenciadas retêm sua multipotencialidade?

Heterogeneidade e outras fontes de MSC ou células semelhantes às MSCs

Desde a primeira descrição das CFU-F, a principal fonte de MSCs permanece a medula óssea. A idade do doador é

importante, e a medula óssea de crianças contém uma maior concentração de CFU-F do que a de adultos. A quantidade de MSCs neste tecido varia, principalmente com a idade; assim, na medula óssea fetal existem 25 vezes mais MSCs do que na medula de uma pessoa adulta.²⁵

Apesar de terem sido originalmente isoladas da medula óssea,²⁶ MSCs e células semelhantes às MSCs têm sido obtidas de várias outras fontes potenciais. O sangue de cordão umbilical é uma delas.^{27,28} Em todo o mundo, bancos de sangue de cordão são formados e poderiam e deveriam ser utilizados para a obtenção de material celular. O sangue de cordão umbilical, na realidade, é o sangue fetal que fica retido na placenta no momento do nascimento, no qual é interrompida a circulação materno-fetal. Estudos mostram que as MSCs presentes no sangue de cordão são similares àquelas obtidas a partir de medula óssea no que diz respeito ao perfil morfológico e imunofenotípico e ao potencial de diferenciação.²⁵ No próprio cordão, a geléia de Wharton seria outra fonte importante de MSCs.

Estudos em animais e em doadores de sangue humanos mostraram ser possível isolar células com capacidade de diferenciação osteogênica e adipogênica na ausência de tratamento para a mobilização de células da medula óssea para o sangue periférico.^{29,30} Os resultados mostraram que o número de células formadoras de colônia com morfologia similar a fibroblastos pode variar bastante de animal para animal e entre os doadores. O perfil fenotípico destas células já apresenta a expressão de alguns marcadores osteogênicos, condrogênicos e miogênicos, mas não de células-tronco hematopoéticas e endoteliais. De maneira geral, este perfil era muito similar entre as espécies estudadas e parecidas com as de células estromais de medula.³⁰

Em anos recentes, MSCs e células semelhantes às MSCs foram identificadas em vários outros tecidos, além da medula óssea e sangue, tanto no indivíduo adulto (tecido adiposo, pericitos, pele – incluindo a derme – trabéculas ósseas, perioste, dente decidual, cartilagem articular, membrana sinovial, fluido sinovial, músculo esquelético), como no feto (líquido amniótico, placenta, fígado, baço, timo, pulmão). De fato, foi sugerido que células com características de células-tronco mesenquimais existem em virtualmente todos os órgãos e tecidos pós-natais.³¹⁻³⁸ Tanto células da placenta a termo quanto de biópsias de vilo coriônico permitem o isolamento de células de origem fetal e/ou materna, que são prontamente propagadas em cultura e apresentam potencial de diferenciação para diferentes tipos celulares.^{39,40} Também foram isoladas MSCs em tecidos doentes, como articulações com artrite reumatoide, sendo que estas células expressam receptores de proteínas morfo- genéticas de osso.⁴¹

MSCs isoladas de diferentes tecidos mostram características fenotípicas similares. Entretanto, apresentam diferentes propensões para proliferar e diferenciar em resposta aos mesmos estímulos com vários fatores de crescimento.

Assim, não está claro se estas células são as mesmas MSCs, apesar de existirem evidências de que o nicho perivascular é um microambiente comum às MSCs residentes de diferentes tecidos. Apesar de células-tronco específicas de diferentes tecidos variarem no fenótipo, na morfologia, no potencial de proliferação e na capacidade de diferenciação, por apresentarem muitas características comuns atribuídas à contraparte presente na medula óssea, sugere-se que ontogeneticamente seriam similares.^{15,16}

Aplicações clínicas das MSCs

As células-tronco apresentam um potencial muito grande no tratamento de diversas doenças. Porém, estes estudos estão apenas no início e, embora já se tenham alguns resultados altamente promissores, é necessário ter em mente que muito pouco se sabe a respeito dos efeitos em longo prazo deste tipo de terapia. Mais ainda, da mesma forma que pacientes reagem de forma diferente a medicamentos, esta terapia pode ser útil para certo número de indivíduos, enquanto para outros pode não ter efeito nenhum.⁴² Sendo assim, muitos estudos ainda devem ser realizados.

A grande capacidade de potencial de diferenciação das MSCs, a possibilidade de enxerto, seus efeitos imunossuppressores e sua expansão em cultura levaram ao aumento do interesse clínico relativo ao uso destas células, através de infusão intravenosa ou administração dirigida ao local de interesse, em numerosas situações patológicas. No caso de estudos utilizando MSCs em ensaios clínicos, bilhões de MSCs isoladas ou ligadas a biomateriais, são necessárias. A produção de MSCs para este propósito necessita da observação e aderência às boas práticas de manufatura, para assegurar a liberação do "medicamento celular" de modo seguro, reprodutível e eficiente. Entretanto, não existem padrões para esta finalidade em ensaios clínicos. Todas as etapas do processo necessitam ainda ser definidas, a saber: material utilizado (doador, tecido original, procedimentos de coleta, de enriquecimento do meio, de separação); processamento da cultura (densidade celular, número de passagens, meio de cultura); aparelhos para cultura (qual o melhor sistema fechado; utilização de métodos analíticos para detecção de compostos ativos indesejáveis e impurezas); controle de qualidade (condições de elegibilidade do doador, padrões para o fenótipo e potencial funcional, determinação da segurança microbiológica; verificação da ausência de transformação durante o processo de cultura).⁴³

Apesar destas considerações e da necessidade de mais conhecimentos básicos para melhor compreender os processos envolvidos na manutenção destas células-tronco e nas diferenciações celulares, muito já tem sido estudado quanto a suas possíveis aplicações. Uma das áreas da medicina em que as células-tronco têm sido empregadas é a cardiologia. A doença coronariana e a insuficiência cardíaca são responsáveis pelo maior índice de morbidade na sociedade ocidental,

com alta taxa de mortalidade.²² São várias as doenças que podem afetar o bom funcionamento do músculo cardíaco: coronariopatias,⁴⁴ infarto do miocárdio,⁴⁵⁻⁴⁹ doença de Chagas,⁵⁰ outras miocardiopatias.⁵¹ Várias linhagens celulares como células-tronco embrionárias, células nucleadas da medula óssea, mioblastos, progenitores endoteliais e mesenquimais e células-tronco cardíacas foram utilizadas com variada eficácia e segurança nos ensaios pré-clínicos e clínicos, no tratamento de infarto agudo do miocárdio e insuficiência cardíaca crônica,⁵² mostrando melhora da função cardíaca após a terapia celular.⁵³ Porém, alguns experimentos mostram a inabilidade em formar cardiomiócitos e estabelecer junções de condução do estímulo elétrico, podendo haver a possibilidade de taquicardia ventricular por reentrada.^{54,55}

Na ortopedia, o principal alvo terapêutico é a osteoporose. As células-tronco seriam utilizadas para repovoar o osso com células novas e mais funcionais.^{56,57} Em lesões articulares com perda ou deformação de discos cartilagosos, os estudos mostram melhora das articulações pela infusão de condrócitos ou, ainda, pela reconstrução *in vitro* com a utilização de *scaffolds*.⁵⁸

Apesar das evidências de que MSCs podem transdiferenciar em múltiplos tipos celulares, *in vivo*, a real contribuição das MSCs ao reparo tecidual não é claro. A falta de transdiferenciação consistente *in vivo* pode ser resultado do número limitado de células precursoras mesenquimais derivadas de linhagens embrionárias não mesodérmicas, como recentemente indicado pela diminuição rápida no número de MSCs de origem neuroepitelial na medula óssea adulta. Pode ser que, na vida pós-natal, a importância relativa das MSCs provenientes de outras origens embrionárias diminua pelo aumento da importância das MSCs mesodérmicas. Assim, apesar de ter sido proposto que as MSCs poderiam ser utilizadas para regeneração em qualquer tecido, as evidências demonstram que o uso destas células na reconstrução exclusivamente através de mecanismos de diferenciação serviria somente para o reparo ósseo.

Como na ortopedia, as células-tronco seriam utilizadas na reumatologia para ajudar o organismo a desenvolver nova cartilagem em doenças como lúpus eritematoso sistêmico ou artrite reumatoide, para o restabelecimento das funções normais dos tecidos afetados.^{59,60}

Na neurologia, as propostas são várias. Uma é o reparo de danos na medula espinal através da reposição das células neurais, revertendo quadros de paralisia. Caso ocorra implantação destas células-tronco, com diferenciação em neurônios motores, seria possível obter a reversão do quadro de paralisia.⁶¹ Outra doença neurológica é o acidente vascular cerebral, que, dependendo da dimensão da área cerebral atingida e do tipo de lesão, hemorrágica ou isquêmica, também pode levar a uma paralisia incapacitante, geralmente uma hemiplegia. As células-tronco seriam infundidas na área da lesão no cérebro levando a um repovoamento do tecido necrosado e possível melhora na incapacitação motora.^{62,63}

Na esclerose lateral amiotrófica, para a geração de um novo tecido neural ao longo da medula espinhal.^{64,65} Na doença de Parkinson, doença neurodegenerativa causada pela degeneração progressiva e perda dos neurônios produtores de dopamina, levando ao aparecimento do tremor característico da doença, rigidez e diminuição anormal da mobilidade,⁶⁶ a terapia celular seria indicada para reposição destes neurônios produtores de dopamina, o que levaria a uma melhora do quadro geral da doença, tornando-a menos incapacitante.^{67,68} Em outra doença neurodegenerativa, a doença de Alzheimer, as células-tronco poderiam tornar-se parte da cura pela reposição de células cerebrais.⁶⁹

Na endocrinologia, o principal alvo de estudos é a diabetes. Em alguns tipos de diabetes não seria indicada a utilização de células-tronco, como nos consequentes à obesidade. Porém, quando a diabetes ocorre devido à falta de insulina, a terapia celular, através do fornecimento de novas células produtoras de insulina, poderia ser a solução.^{70,71}

Na oftalmologia, a terapia celular seria de utilidade nos casos de cegueira, dependendo da avaliação do que levou a este quadro; haveria a possibilidade de reparo quer do nervo ótico quer das células da retina.⁷² Outra área que vem sendo estudada é a recuperação da córnea com células-tronco com capacidade de diferenciação em queratinócitos e condrócitos.⁷³

Em urologia e nefrologia, a terapia celular seria utilizada no tratamento da insuficiência renal aguda com perda ou disfunção das células epiteliais dos túbulos renais,⁷⁴ cuja proposta seria o repovoamento da área afetada pelas células remanescentes, que apresentam alta capacidade proliferativa.

Na pneumologia, um dos interesses é o tratamento da fibrose cística, onde uma alteração na molécula de CFTR (regulador de condutância transmembrana da fibrose cística) provoca um acúmulo de muco no pulmão, dificultando o funcionamento pulmonar. O transplante de células-tronco seria eficiente, nestes casos, assim como na asma, por criar um ambiente anti-inflamatório no pulmão, além de promover crescimento de novo tecido pulmonar.⁷⁵

Na ginecologia, as células-tronco apresentam duas áreas de interesse. Os carcinomas ovarianos podem ser sensíveis à quimioterapia. Ensaios clínicos utilizando quimioterapia associada ao resgate da medula óssea por transplante de células-tronco hematopoéticas foram realizados com resposta satisfatória. Alguns trabalhos ainda demonstram a utilização das células-tronco hematopoéticas de sangue de cordão umbilical no tratamento dos tumores sólidos do ovário e da mama.^{76,77} Outra área de interesse, em ginecologia, está relacionada com o fato bem conhecido de que a unidade fetoplacentária e o organismo materno se comunicam principalmente através da produção de compostos bioquímicos e hormonais. De fato, as necessidades metabólicas e vitais do feto são transmitidas para a mãe através de um diálogo com a utilização destes compostos, que são produzidos pelo feto com a mediação da placenta. Atualmente, sabemos que o

transporte materno-fetal também inclui células que podem ser úteis para o diagnóstico genético pré-natal não invasivo de doenças fetais.^{78,79} Já foi demonstrado que o trânsito destas células entre feto e mãe tanto pode ser maléfico, pois já foi sugerido que doenças autoimunes em mulheres podem ser devidas à presença e manutenção por longos períodos de células fetais no organismo materno, como benéfico, pois já se demonstrou que células-tronco fetais podem alcançar a circulação materna e se diferenciar em folículo tireoide maduro no interior de adenoma tireoidiano.⁷⁸

Na dermatologia, as células-tronco têm sido avaliadas na reposição epitelial de áreas de queimadura, na cicatrização de feridas crônicas e no tratamento do vitiligo, entre outros.^{80,81}

Um dos principais alvos de pesquisas, já em desenvolvimento, com células-tronco encontra-se na área de oncologia e, principalmente a onco-hematologia.⁸² A utilização de células-tronco, nestes casos, estaria relacionada com a reconstrução dos tecidos. Dentre os muitos protocolos de pesquisa cadastrados no FDA americano, a grande maioria está relacionada com cânceres hematológicos, provavelmente porque grande parte dos estudos com células-tronco era, até bem pouco tempo, realizado com células originárias de medula óssea; portanto, células-tronco adultas que se acreditava terem uma capacidade limitada de diferenciação em outros tipos celulares. Dos protocolos de pesquisa cadastrados no FDA e que participam do banco de dados disponibilizado pelo NIH, 76,1% deles estão relacionados com câncer, e destes, 70% são hematológicos. Dos protocolos que definem o número de indivíduos a participarem do estudo, foi possível verificar que a grande maioria participa das pesquisas envolvendo o estudo das células-tronco em câncer (85,5% dos indivíduos).⁸³ As aplicações clínicas de células tronco/progenitoras CD34+ consistem em transplante tanto alogênico (malignidades hematopoéticas, imunodeficiências, aplasia de medula óssea, doenças do metabolismo, hemoglobinopatias) como autólogo (leucemias agudas, mielomas, linfomas, câncer de mama e de ovário, tumor de célula germinativa, doenças autoimunes).⁸⁴⁻⁹¹

As MSCs têm também atuação na imunidade. As células-tronco mesenquimais têm ações imunorregulatórias e interagem com todas as células envolvidas na resposta imune. Diferentes moléculas ou citocinas estão envolvidas nesta ação imunorregulatória. Muitos relatos descrevem as MSCs como tendo propriedades imunossupressoras, através da modulação de muitas funções da célula T, incluindo a sua ativação e que, *in vitro*, as MSCs são capazes de inibir a proliferação, diferenciação e quimiotaxia de células B.⁹² De fato, o fenótipo imune das MSCs (descrito como MHC I+, MHC II-, CD40-, CD80-, CD86-) é avaliado como não imunogênico e que o transplante em um hospedeiro alogênico não requereria imunossupressão. MHCs classe I poderiam ativar as células T mas, com a ausência de moléculas coestimulatórias, não haveria um sinal secundário, deixando as

células T anérgicas. Além disso, a importância farmacológica destas células envolve a capacidade de secretar moléculas biologicamente importantes, expressar receptores específicos, permitir manipulação genética e serem suscetíveis a moléculas que modificam o seu comportamento natural.⁹³ Este enfoque também pode ser utilizado no tratamento das imunodeficiências, tanto a primária como a imunodeficiência combinada severa.^{84,85,94}

Considerações finais

MSCs possuem um potencial de diferenciação multi-linhagem e podem ser dirigidas para crescerem e se diferenciarem em linhagens celulares específicas em certas condições de microambiente. Estas características fazem com que estas células possam ter um grande potencial em várias aplicações terapêuticas, como participar da regeneração tecidual, corrigir distúrbios hereditários, refrear a inflamação crônica, liberar agentes biológicos. Assim, a administração de MSCs é promissora como nova estratégia para tratar uma ampla gama de doenças.

Entretanto, os mecanismos que direcionam as MSCs para uma determinada linhagem são em grande parte desconhecidos. Esta situação faz com que as aplicações clínicas e terapêuticas de células-tronco ainda sejam incertas, a não ser que conhecimentos críticos venham a ser obtidos, relativos a vários aspectos, como os sinais que controlam sobrevivência, proliferação e diferenciação, que irão expandir as aplicações terapêuticas potenciais destas células.

Em resumo, a promessa da medicina regenerativa e curativa baseada em células-tronco e, particularmente, nas MSCs, depende criticamente da identificação de mecanismos e de moléculas que controlam e mediam a diferenciação de uma determinada linhagem específica, o estabelecimento destas células em determinado tecido de interesse, e as cascatas de sinalização que controlam a sobrevivência e proliferação celulares.

Abstract

Stem cells are undifferentiated cells. They show various characteristics that make them suitable for clinical applications. The main stem cell characteristics are their capacity of auto-renewal and of differentiation into different cell lines so it is quite possible that stem cells in different tissues exhibit a regenerative role when these tissues are injured. Bone marrow is the best studied tissue as a source of hematopoietic stem cells as well as mesenchymal stem cells (also known as mesenchymal stromal cells or mesenchymal stromal multipotent cells); clonogenic cells in the bone marrow stroma. They are able to differentiate under specific stimuli in several cell lines including osteogenic, chondrogenic and adipogenic cells, and probably in other non-mesodermic cell lines such as neural cells or hepatocytes. Here the main characteristics of mesenchymal stem cells will be discussed, including the molecular and membrane markers, the

division and differentiation properties, the heterogeneity, and the potential clinical applications. Rev. Bras. Hematol. Hemoter. 2009; 31(Supl. 1):25-35.

Key words: *Stem cell; mesenchymal stem cell; markers; cell differentiation; clinical applications.*

Referências Bibliográficas

1. Lemischka IR. Stem cell biology: a view toward the future. *Ann N Y Acad Sci.* 2005;1044:132-8.
2. Blau HM, Brazelton TR, Weimann JM. The evolving concept of a stem cell: entity or function? *Cell.* 2001;105(7):829-41.
3. Fodor WL. Tissue engineering and cell based therapies, from the bench to the clinic: the potential to replace, repair and regenerate. *Reprod Biol Endocrinol.* 2003;1:102.
4. Abdallah BM, Kassem M. Human mesenchymal stem cells: from basic biology to clinical applications. *Gene Ther.* 2008;15(2):109-16.
5. Kulterer B, Friedl G, Jandrositz A, Sanchez-Cabo F, Prokesch A, Paar C, et al. Gene expression profiling of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow during expansion and osteoblast differentiation. *BMC Genomics.* 2007;8:70.
6. Park KS, Lee YS, Kang KS. In vitro neuronal and osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells from human umbilical cord blood. *J Vet Sci.* 2006;7(4):343-8.
7. Hashimoto J, Kariya Y, Miyazaki K. Regulation of proliferation and chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells by laminin-5 (laminin-332). *Stem Cells.* 2006;24(11):2346-54.
8. De Gemmis P, Lapucci C, Bertelli M, Tognetto A, Fanin E, Vettor R, et al. A real-time PCR approach to evaluate adipogenic potential of amniotic fluid-derived human mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev.* 2006;15(5):719-28.
9. Anisimov SV, Christophersen NS, Correia AS, Li JY, Brundin P. "NeuroStem Chip": a novel highly specialized tool to study neural differentiation pathways in human stem cells. *BMC Genomics.* 2007;8:46.
10. Amado LC, Saliaris AP, Schuleri KH, St John M, Xie JS, Cattaneo S, et al. Cardiac repair with intramyocardial injection of allogeneic mesenchymal stem cells after myocardial infarction. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2005;102(32):11474-9.
11. Abdallah BM, Kassem M. Human mesenchymal stem cells: from basic biology to clinical applications. *Gene Ther.* 2008;15(2):109-16.
12. Baksh D, Song L, Tuan RS. Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. *J Cell Mol Med.* 2004;8(3):301-16.
13. Bobis S, Jarocha D, Majka M. Mesenchymal stem cells: characteristics and clinical applications. *Folia Histochem Cytobiol.* 2006;44(4):215-30.
14. Horwitz EM, Le Blanc K, Dominici M, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, et al. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 2005;7(5):393-5.
15. Liu ZJ, Zhuge Y, Velazquez OC. Trafficking and differentiation of mesenchymal stem cells. *J Cell Biochem.* 2009;106(6):984-91.
16. Kolf CM, Cho E, Tuan RS. Mesenchymal stromal cells. Biology of adult mesenchymal stem cells. Regulation of niche, self-renewal and differentiation. *Arthritis Res Ther.* 2007;9(1):204.
17. Sadler TW. *Langman Embriologia Médica.* 9ª ed. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, RJ. Pp.131-137, 2005

18. Wagers AJ, Christensen JL, Weissman IL. Cell fate determination from stem cells. *Gene Ther.* 2002;9(10):606-12.
19. Knoblich JA. Asymmetric cell division during animal development. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2001;2(1):11-20.
20. Gibbons RJ. Histone modifying and chromatin remodelling enzymes in cancer and dysplastic syndromes. *Hum Mol Genet.* 2005 ;14 Spec No 1:R85-92.
21. Sakashita K, Koike K, Kinoshita T, Shiohara M, Kamijo T, Taniguchi S, *et al.* Dynamic DNA methylation change in the CpG island region of p15 during human myeloid development. *J Clin Invest.* 2001;108(8):1195-204.
22. Strauer BE, Brehm M, Zeus T, Bartsch T, Schannwell C, Antke C, *et al.* Regeneration of human infarcted heart muscle by intracoronary autologous bone marrow cell transplantation in chronic coronary artery disease: the IACT Study. *J Am Coll Cardiol.* 2005;46(9):1651-8.
23. Klein HM, Ghodsizad A, Marktanner R, Poll L, Voelkel T, Mohammad Hasani MR, *et al.* Intramyocardial implantation of CD133+ stem cells improved cardiac function without bypass surgery. *Heart Surg Forum.* 2007;10(1):E66-9.
24. Donmez A, Zoghi M, Cagiran S, Acarlar C, Tombuloglu M. The effect of hematopoietic progenitor cells' temperature on cardiac arrhythmias in patients given peripheral blood progenitor cells. *Transfus Apher Sci.* 2006;34(3):245-51.
25. Panepucci RA, Siufi JL, Silva WA Jr, Proto-Siquiera R, Neder L, Orellana M, *et al.* Comparison of gene expression of umbilical cord vein and bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells.* 2004;22(7):1263-78.
26. Soukup T, Mokrý J, Karbanová J, Pytlík R, Suchomel P, Kucerová L. Mesenchymal stem cells isolated from the human bone marrow: cultivation, phenotypic analysis and changes in proliferation kinetics. *Acta Medica (Hradec Kralove).* 2006;49(1):27-33.
27. Kadivar M, Khatami S, Mortazavi Y, Taghikhani M, Shokrgozar MA. Multilineage differentiation activity by human umbilical vein-derived mesenchymal stem cells. *Iranian Biomed J.* 2006; 10:175-84.
28. Kestendjieva S, Kyurkchiev D, Tsvetkova G, Mehandjiev T, Dimitrov A, Nikolov A, Kyurkchiev S. Characterization of mesenchymal stem cells isolated from the human umbilical cord. *Cell Biol Int.* 2008;32(7):724-32.
29. He Q, Wan C, Li G. Concise review: multipotent mesenchymal stromal cells in blood. *Stem Cells.* 2007;25(1):69-77.
30. Bashey A, Donohue M, Liu L, Medina B, Corringham S, Ihasz A, *et al.* Peripheral blood progenitor cell mobilization with intermediate-dose cyclophosphamide, sequential granulocyte-macrophage-colony-stimulating factor and granulocyte-colony-stimulating factor, and scheduled commencement of leukapheresis in 225 patients undergoing autologous transplantation. *Transfusion.* 2007;47(11):2153-60.
31. Delo DM, De Coppi P, Bartsch G Jr, Atala A. Amniotic fluid and placental stem cells. *Methods Enzymol.* 2006;419:426-38.
32. Alviano F, Fossati V, Marchionni C, Arpinati M, Bonsi L, Franchina M, *et al.* Term Amniotic membrane is a high throughput source for multipotent Mesenchymal Stem Cells with the ability to differentiate into endothelial cells in vitro. *BMC Dev Biol.* 2007;7:11.
33. De Coppi P, Bartsch G Jr, Siddiqui MM, Xu T, Santos CC, Perin L, *et al.* Isolation of amniotic stem cell lines with potential for therapy. *Nat Biotechnol.* 2007;25(1):100-6.
34. Gonzalez R, Maki CB, Pacchiarotti J, Csontos S, Pham JK, Slepko N, *et al.* Pluripotent marker expression and differentiation of human second trimester Mesenchymal Stem Cells. *hem Biophys Res Commun.* 2007;362(2):491-7.
35. Bossolasco P, Montemurro T, Cova L, Zangrossi S, Calzarossa C, Buiatiotis S, *et al.* Molecular and phenotypic characterization of human amniotic fluid cells and their differentiation potential. *Cell Res.* 2006;16(4):329-36.
36. De Bari C, Dell'Accio F, Tylzanowski P, Luyten FP. Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. *Arthritis Rheum.* 2001 Aug;44(8):1928-42.
37. Fickert S, Fiedler J, Brenner RE. Identification of subpopulations with characteristics of mesenchymal progenitor cells from human osteoarthritic cartilage using triple staining for cell surface markers. *Arthritis Res Ther.* 2004;6(5):R422-32.
38. Miura M, Gronthos S, Zhao M, Lu B, Fisher LW, Robey PG, *et al.* SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(10):5807-12.
39. Mannello F, Tonti GA. Concise review: no breakthroughs for human mesenchymal and embryonic stem cell culture: conditioned medium, feeder layer, or feeder-free; medium with fetal calf serum, human serum, or enriched plasma; serum-free, serum replacement nonconditioned medium, or ad hoc formula? All that glitters is not gold! *Stem Cells.* 2007;25(7):1603-9.
40. Sotiropoulou PA, Perez SA, Salagianni M, Baxevasis CN, Papamichail M. Characterization of the optimal culture conditions for clinical scale production of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells.* 2006;24(2):462-71.
41. Uccelli A, Moretta L, Pistoia V. Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nat Rev Immunol.* 2008;8(9):726-36.
42. Summer R, Fine A. Mesenchymal progenitor cell research: limitations and recommendations. *Proc Am Thorac Soc.* 2008; 5(6):707-10.
43. Sensebé L. Generation and characterization of mesenchymal stromal cells for clinical application. *ISBT Science Series.* 2009;4:31-6.
44. Jackson KA, Majka SM, Wang H, Pocius J, Hartley CJ, Majesky MW, *et al.* Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells. *J Clin Invest.* 2001;107(11): 1395-402.
45. Assmus B, Honold J, Schächinger V, Britten MB, Fischer-Rasokat U, Lehmann R, *et al.* Transcoronary transplantation of progenitor cells after myocardial infarction. *N Engl J Med.* 2006;355(12): 1222-32.
46. Mazhari R, Hare JM. Mechanisms of action of mesenchymal stem cells in cardiac repair: potential influences on the cardiac stem cell niche. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med.* 2007;4 Suppl 1:S21-6.
47. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Jakoniuk I, Anderson SM, Li B, *et al.* Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature.* 2001;410(6829):701-5.
48. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Limana F, Jakoniuk I, Quaini F, *et al.* Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001; 98(18):10344-9.
49. Vanderheyden M, Vercauteren S, Mansour S, Delrue L, Vandekerckhove B, Heyndrickx GR, *et al.* Time-dependent effects on coronary remodeling and epicardial conductance after intracoronary injection of enriched hematopoietic bone marrow stem cells in patients with previous myocardial infarction. *Cell Transplant.* 2007;16(9): 919-25.
50. Vilas-Boas F, Feitosa GS, Soares MB, Mota A, Pinho-Filho JA, Almeida AJ, *et al.* Early results of bone marrow cell transplantation to the myocardium of patients with heart failure due to Chagas disease. *Arq Bras Cardiol.* 2006;87(2):159-66.
51. Arom KV, Ruengsakulrach P, Jotisakulratana V. Intramyocardial angiogenic cell precursor injection for cardiomyopathy. *Asian Cardiovasc Thorac Ann.* 2008;16(2):143-8.

52. Hüttmann A, Gutersohn A, Noppeney R, Neumann T, Erbel R, Dührsen U. Rapid succession of peripheral blood progenitor cell mobilization cycles in patients with chronic heart failure: effects on the hematopoietic system. *Transfusion*. 2006;46(8):1424-31.
53. Dai W, Kloner RA. Myocardial regeneration by human amniotic fluid stem cells: challenges to be overcome. *J Mol Cell Cardiol*. 2007;42(4):730-2.
54. Patel AN, Sherman W. Cardiac stem cell therapy from bench to bedside. *Cell Transplant*. 2007;16(9):875-8.
55. van Laake LW, Hassink R, Doevendans PA, Mummery C. Heart repair and stem cells. *J Physiol*. 2006;577(Pt 2):467-78.
56. Raisz LG. Pathogenesis of osteoporosis: concepts, conflicts, and prospects. *J Clin Invest*. 2005;115(12):3318-25.
57. Cancedda R, Bianchi G, Derubeis A, Quarto R. Cell therapy for bone disease: a review of current status. *Stem Cells*. 2003;21(5):610-9.
58. Kunisaki SM, Fuchs JR, Steigman SA, Fauza DO. A comparative analysis of cartilage engineered from different perinatal mesenchymal progenitor cells. *Tissue Eng*. 2007;13(11):2633-44.
59. Dazzi F, van Laar JM, Cope A, Tyndall A. Cell therapy for autoimmune diseases. *Arthritis Res Ther*. 2007;9(2):206.
60. Brinkman DM, de Kleer IM, ten Cate R, van Rossum MA, Bekkering WP, Fasth A, et al. Autologous stem cell transplantation in children with severe progressive systemic or polyarticular juvenile idiopathic arthritis: long-term follow-up of a prospective clinical trial. *Arthritis Rheum*. 2007;56(7):2410-21.
61. Chernykh ER, Stupak VV, Muradov GM, Sizikov MY, Shevela EY, Leplina OY, et al. Application of autologous bone marrow stem cells in the therapy of spinal cord injury patients. *Bull Exp Biol Med*. 2007;143(4):543-7.
62. Zhao LR, Duan WM, Reyes M, Keene CD, Verfaillie CM, Low WC. Human bone marrow stem cells exhibit neural phenotypes and ameliorate neurological deficits after grafting into the ischemic brain of rats. *Exp Neurol*. 2002;174(1):11-20.
63. Kajiguchi M, Kondo T, Izawa H, Kobayashi M, Yamamoto K, Shintani S, et al. Safety and efficacy of autologous progenitor cell transplantation for therapeutic angiogenesis in patients with critical limb ischemia. *Circ J*. 2007 Feb;71(2):196-201.
64. Mazzini L, Mareschi K, Ferrero I, Vassallo E, Oliveri G, Boccaletti R, et al. Autologous mesenchymal stem cells: clinical applications in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurol Res*. 2006;28(5):523-6.
65. Mazzini L, Mareschi K, Ferrero I, Vassallo E, Oliveri G, Nasuelli N, et al. Stem cell treatment in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *J Neurol Sci*. 2008;265(1-2):78-83.
66. Timmer M, Müller-Ostermeyer F, Kloth V, Winkler C, Grothe C, Nikkhah G. Enhanced survival, reinnervation, and functional recovery of intrastriatal dopamine grafts co-transplanted with Schwann cells overexpressing high molecular weight FGF-2 isoforms. *Exp Neurol*. 2004;187(1):118-36.
67. Lindvall O. Neural transplantation: a hope for patients with Parkinson's disease. *Neuroreport*. 1997;8(14):iii-x.
68. Kordower JH, Rosenstein JM, Collier TJ, Burke MA, Chen EY, Li JM, et al. Functional fetal nigral grafts in a patient with Parkinson's disease: chemoanatomic, ultrastructural, and metabolic studies. *J Comp Neurol*. 1996;370(2):203-30.
69. McKay RD. Stem cell biology and neurodegenerative disease. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2004;359(1445):851-6.
70. Lee RH, Seo MJ, Reger RL, Spees JL, Pulin AA, Olson SD, et al. Multipotent stromal cells from human marrow home to and promote repair of pancreatic islets and renal glomeruli in diabetic NOD/scid mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006;103(46):17438-43.
71. Noguchi H. Stem cells for the treatment of diabetes. *Endocr J*. 2007;54(1):7-16.
72. Herrmann WA, Muecke M, Koller M, Gabel VP, Lohmann CP. Keratocyte density in the retroablation area after LASEK for the correction of myopia. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2007;245(3):426-30.
73. Baratz KH, Nau CB, Winter EJ, McLaren JW, Hodge DO, Herman DC, et al. Effects of glaucoma medications on corneal endothelium, keratocytes, and subbasal nerves among participants in the ocular hypertension treatment study. *Cornea*. 2006;25(9):1046-52.
74. Mollura DJ, Hare JM, Rabb H. Stem-cell therapy for renal diseases. *Am J Kidney Dis*. 2003;42(5):891-905.
75. Neuringer IP, Randell SH. Stem cells and repair of lung injuries. *Respir Res*. 2004;5:6.
76. Perillo A, Bonanno G, Pierelli L, Rutella S, Scambia G, Mancuso S. Stem cells in gynecology and obstetrics. *Panminerva Med*. 2004;46(1):49-59.
77. Perillo A, Pierelli L, Scambia G, Leone G, Mancuso S. The role of hematopoietic stem cells in the treatment of ovarian cancer. *Panminerva Med*. 2002;44(3):197-204.
78. Bianchi DW. Fetal cells in the mother: from genetic diagnosis to diseases associated with fetal cell microchimerism. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2000;92(1):103-8.
79. Bianchi DW. Fetomaternal cell trafficking: a new cause of disease? *Am J Med Genet*. 2000;91(1):22-8.
80. Falanga V, Iwamoto S, Chartier M, Yufit T, Butmarc J, Kouttab N, et al. Autologous bone marrow-derived cultured mesenchymal stem cells delivered in a fibrin spray accelerate healing in murine and human cutaneous wounds. *Tissue Eng*. 2007;13(6):1299-312.
81. Nie X, Zhang JY, Cai KJ, Yang MH, Xiao AH, Da Hu H, et al. Cosmetic improvement in various acute skin defects treated with tissue-engineered skin. *Artif Organs*. 2007;31(9):703-10.
82. Cheung AM, Kwong YL, Liang R, Leung AY. Stem cell model of hematopoiesis. *Curr Stem Cell Res Ther*. 2006;1(3):305-15.
83. <http://www.ClinicalTrials.gov>.
84. García JM, Español T, Gurbindo MD, Casas C C. Update on the treatment of primary immunodeficiencies. *Allergol Immunopathol (Madr)*. 2007;35(5):184-92.
85. Notarangelo LD, Forino C, Mazzolari E. Stem cell transplantation in primary immunodeficiencies. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2006 Dec;6(6):443-8.
86. Choi JS, Lee SH, Chung SJ, Yoo KH, Sung KW, Koo HH. Assessment of converting from intravenous to oral administration of cyclosporin A in pediatric allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients. *Bone Marrow Transplant*. 2006;38(1):29-35.
87. Jakubowski AA, Small TN, Young JW, Kernan NA, Castro-Malaspina H, Hsu KC, et al. T cell depleted stem-cell transplantation for adults with hematologic malignancies: sustained engraftment of HLA-matched related donor grafts without the use of antithymocyte globulin. *Blood*. 2007;110(13):4552-9.
88. Kim I, Lee KH, Choi Y, Keam B, Koo NH, Yoon SS, et al. Allogeneic stem cell transplantation for patients with advanced hematological malignancies: comparison of fludarabine-based reduced intensity conditioning versus myeloablative conditioning. *J Korean Med Sci*. 2007;22(2):227-34.
89. Jaing TH, Yang CP, Hung IJ, Chen SH, Sun CF, Chow R. Transplantation of unrelated donor umbilical cord blood utilizing double-unit grafts for five teenagers with transfusion-dependent thalassemia. *Bone Marrow Transplant*. 2007;40(4):307-11.

90. Kelly PF, Radtke S, von Kalle C, Balcik B, Bohn K, Mueller R, *et al*. Stem cell collection and gene transfer in Fanconi anemia. *Mol Ther*. 2007;15(1):211-9.
91. Laport GG, Sandmaier BM, Storer BE, Scott BL, Stuart MJ, Lange T, *et al*. Reduced-intensity conditioning followed by allogeneic hematopoietic cell transplantation for adult patients with myelodysplastic syndrome and myeloproliferative disorders. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2008;14(2):246-55.
92. Ball LM, Bernardo ME, Roelofs H, Lankester A, Cometa A, Egeler RM, *et al*. Cotransplantation of ex vivo expanded mesenchymal stem cells accelerates lymphocyte recovery and may reduce the risk of graft failure in haploidentical hematopoietic stem-cell transplantation. *Blood*. 2007;110(7):2764-7.
93. Chamberlain G, Fox J, Ashton B, Middleton J. Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem Cells*. 2007;25(11):2739-49.
94. Aiuti A, Cassani B, Andolfi G, Mirolo M, Biasco L, Recchia A, *et al*. Multilineage hematopoietic reconstitution without clonal selection in ADA-SCID patients treated with stem cell gene therapy. *J Clin Invest*. 2007;117(8):2233-40.

Avaliação: O tema apresentado consta da pauta elaborada pelo editor, Professor Milton Artur Ruiz, e coeditores deste suplemento, Professores Sergio Paulo Bydlowski e Adriana Seber.

Conflito de interesse: não declarado

Recebido: 20/04/2009

Aceito: 22/04/2009