

CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS – CARACTERIZAÇÃO, CULTIVO, PROPRIEDADES IMUNOLÓGICAS E APLICAÇÕES CLÍNICAS

MESENCHYMAL STEM CELLS – CHARACTERIZATION, CULTIVATION, IMMUNOLOGICAL PROPERTIES AND CLINICAL APPLICATIONS

Bruna Amorin, Vanessa de Souza Valim, Natália Emerim Lemos, Lauro Moraes Júnior, Annelise Martins Pezzi da Silva, Maria Aparecida Lima da Silva, Lucia Silla

RESUMO

As células-tronco mesenquimais (CTM) são consideradas células multipotentes não hematopoéticas com propriedades de autorrenovação e capacidade de diferenciação em tecidos mesenquimais e, possivelmente, em não mesenquimais. Vários estudos recentes têm reforçado o caráter multipotente destas células pela capacidade de diferenciarem-se em células derivadas da mesoderma embrionário: osteócitos, condroblastos e adipócitos.

Devido ao fácil isolamento e cultivo, potencial de diferenciação e produção de fatores de crescimento e citocinas, as CTMs têm se tornado as candidatas ideais para os protocolos da medicina regenerativa.

Este artigo revisa as principais características dessa célula, forma de obtenção e cultivo, propriedades imunológicas e aplicações clínicas.

Palavras-chave: células-tronco mesenquimais; cultura; terapia celular

ABSTRACT

Mesenchymal stem cells (MSC) are nonhematopoietic multipotent cells with self-renewal properties and the ability to differentiate into mesenchymal tissues and possibly nonmesenchymal cells. Several lines of evidence in the past few years have confirmed the ability of these cells to differentiate into cells derived from embryonic mesoderm, such as osteocytes, adipocytes and chondroblasts.

Because they are easy to isolate and culture and due to their differentiation potential and production of growth factors and cytokines, MSC have become ideal candidates for regenerative medicine protocols.

This study reviews the main characteristics of MSC, how to isolate and culture them, and their immunological properties and clinical applications.

Keywords: Mesenchymal stem cells; culture; cell therapy

Revista HCPA. 2012;32(1):71-81

Laboratório de Cultura Celular e Análise Molecular de Células Hematopoéticas, Centro de Pesquisa Experimental, Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Contato:

Lúcia Silla
lsilla@hcpa.ufrgs.br
Porto Alegre, RS, Brasil

As células-tronco, por definição, são células indiferenciadas, capazes de autorrenovação por meio de divisões mitóticas assimétricas (1). As principais características das células-tronco, tornando-as extremamente interessantes, são a 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 potencial capacidade de se diferenciar em diversos tipos celulares do mesmo tecido e, aparentemente, de tecidos diferentes (2).

As células-tronco são divididas em dois grandes grupos que dizem respeito ao seu local de origem: podem ser células-tronco embrionárias (CTE), quando são derivadas da massa celular interna do blastocisto embrionário; e células-tronco adultas (CTA) que são aquelas obtidas do sangue de cordão umbilical, da medula óssea e do sangue periférico; adicionalmente, acredita-se existirem células-tronco para tecidos ou órgãos específicos em todo o organismo adulto (3).

As CTEs são células pluripotentes dotadas de grande plasticidade, que apresentam características peculiares, como uma ilimitada capacidade de proliferação *in vitro* sob estímulos, além da possibilidade de formar células derivadas dos três folhetos embrionários em cultura (4, 5).

As CTAs podem ser consideradas populações celulares indiferenciadas mantidas no organismo adulto, onde participam da homeostase tecidual, gerando novas células em resposta ao repovoamento celular fisiológico ou a uma injúria (5-7).

Essas estão em estado quiescente ou de baixa proliferação, predominantemente nas fases G0 e G1 do ciclo celular, localizando-se em regiões específicas para o seu desenvolvimento e manutenção dos seus atributos, particularmente a capacidade de autorrenovação (8). Essas regiões são denominadas de nichos celulares e dentre os principais sítios estão: medula óssea (9), coração (10), rins, pele, fígado, pâncreas, ovários, cordão umbilical, placenta, líquido amniótico, âmnio, entre outros (11).

As primeiras CTAs estudadas e, conseqüentemente, as mais bem caracterizadas são as células hematopoéticas provenientes da medula óssea. Estas células são capazes de diferenciar-se nos constituintes mielóides e linfóides do sangue e há muito vêm sendo utilizadas com sucesso em transplantes para pacientes com falência medular ou com câncer (12).

Mais tarde foi isolado outro tipo de célula-tronco adulta, também constituinte da medula óssea, porém com propriedades diferentes das hematopoéticas: as células-tronco mesenquimais (CTM) ou células-tronco estromais. Elas receberam essa denominação porque derivam do folheto embrionário intermediário, o mesoderma, que é responsável pela formação dos tecidos ósseo, cartilaginoso e adiposo (13).

CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS

As CTMs são consideradas células multipotentes não hematopoéticas com propriedades de autorrenovação e capacidade de diferenciação em tecidos mesenquimais e, talvez, não mesenquimais (14). O primeiro relato das CTMs foi realizado pelo pesquisador russo Friedenstein e seus colaboradores, na década de 1970, que as descreveu como sendo células morfológicamente semelhantes a fibroblastos e com alta capacidade de adesão à superfície plástica (15). Vários estudos posteriores relataram a multipotência destas células, ou seja, a capacidade de diferenciarem-se em células derivadas da mesoderma embrionária: osteócitos, condroblastos e adipócitos (16-19).

Denominações utilizadas e caracterização básica das CTM

As CTMs, sobretudo aquelas oriundas da medula óssea humana, diferem muito quanto à nomenclatura utilizada. Inicialmente foram chamados de unidades formadoras de colônias fibroblastoides (CFU-F, colony forming unit fibroblast), devido à capacidade de aderir ao plástico das garrafas de cultivo e formar colônias de células similares aos fibroblastos (20). Foram também denominadas células-tronco ou progenitoras mesenquimais, pois diferenciavam-se em uma grande variedade de células não hematopoéticas (21) e de células estromais da medula óssea, porque pareciam originar-se de estruturas de suporte da medula óssea e podiam ser utilizadas como feeder layer para o crescimento das CTHs em cultura (15).

Em 2005, a sociedade internacional para terapia celular (ISCT – International Society for Cellular Therapy) propôs uma nova nomenclatura para designar a população de células fibroblastoides que crescem aderentes ao plástico, isoladas dos mais diversos tecidos e com capacidade de diferenciação multipotencial *in vitro*: células mesenquimais estromais multipotentes. A ISCT propõe, ainda, que o termo célula-tronco mesenquimal seja para aquelas que indubitavelmente, preenchem as características de células-tronco e ressalta que estas células compõem uma subpopulação das células aderentes ao plástico. A sigla CTM (MSC – do inglês, Mesenchymal Stem Cell) pode ser utilizada para estas situações, mas deve ser corretamente identificada (22).

Ainda de acordo com a ISCT, uma determinada população de células será classificada como célula-tronco mesenquimal quando apresentar três características-chave. A primeira é que as mesmas sejam isoladas com base nas suas propriedades de adesão seletiva à superfície do material onde são cultivadas (geralmente plástica); a segunda é a expressão de determinados antígenos de membrana e, por fim, que as células possam ser diferenciadas em tecido ósseo, gorduroso e cartilaginoso após estímulo (22).

ONTOGENIA E FONTES DE CTM

A ontogenia da CTM ainda não é bem conhecida. Acredita-se que a CTM multipotente descenda de uma célula pluripotente ou mesmo de outra multipotente presente durante a vida fetal em uma frequência muito maior. Está localizada na fração estromal da medula óssea que fornecem o suporte do estroma para o crescimento e diferenciação de células-tronco hematopoéticas e para hematopoese (23).

Acredita-se, também, que há a presença de uma camada de células estromais que daria sustentação a hematopoese na região aorto-gônoda-mesonéfrica em murinos, que o sangue humano fetal contém, durante as primeiras semanas, grande quantidade de CTHs e de células estromais e que ocorra um encontro de células fetais na circulação e nos tecidos maternos, mesmo décadas após a gravidez, que parecem participar na reparação tissular. Em combinação, estas observações apóiam a hipótese da existência de uma CT multi ou pluripotente que existe desde a idade gestacional precoce e que pode persistir por toda a vida do adulto (24).

Além disso, a correlação inversa entre a presença de CTMs no cordão umbilical e a idade gestacional, também observada para as CTHs, sugere que as células mesenquimais migrem precocemente, durante o desenvolvimento, dos seus sítios primários para outros tecidos fetais (17). Contudo, a real identidade desta célula e a sua correlação com as CTMs expandidas in vitro ainda necessitam ser definidas.

No ser humano, a medula óssea é a fonte mais conhecida de CTM, mas também já foram isoladas de outros órgãos e tecidos, tais como tecido muscular esquelético e derme (25), tecido adiposo (26), membrana sinovial (27), endotélio da veia umbilical (28) e da veia safena (29), rim (30), sangue de cordão umbilical e placentário (31,32), medula óssea (33), cartilagem articular (34), ligamento periodontal (35) e pulmão (36).

Do sangue periférico, ainda é uma questão em aberto. Fernandez et al. (37) reportaram a presença de células "estromais" no sangue periférico mobilizado. Já os estudos de Zvaifler et al. (38) e Kuznetsov et al. (39) demonstraram que a CTM circula no sangue periférico, mas que é extremamente rara. Um outro estudo feito por Kassis et al., com o auxílio de microesferas de fibrina, isolou CTM de sangue periférico mobilizado, coletado por aférese, de doadores normais (40).

ISOLAMENTO E CULTIVO DE CTM DA MEDULA ÓSSEA

Atualmente existem diversos métodos de isolamento de CTM da medula óssea. Tradicionalmente, estas células são isoladas utilizando-se o método originalmente descrito por Friedenstein (41), que se

baseia na capacidade que estas células têm de aderir ao plástico (41).

Resumidamente, o método é realizado da seguinte maneira: o aspirado de medula óssea é processado utilizando-se um gradiente de centrifugação como, por exemplo, o ficoll. As células são coletadas e plaqueadas em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), enriquecido com soro fetal bovino e penicilina/estreptomicina (42).

Após 24h (43) a 72h (16,44), todo o meio de cultivo é trocado com o objetivo de remover as células não aderentes. As células restantes são cultivadas em câmara úmida, a 37° C com 5% de CO₂ e o meio de cultivo é trocado a cada 3 a 4 dias até atingir confluência em torno de 80%, o que ocorre por volta de 14 dias, quando as células são tripsinizadas e expandidas por passagens subsequentes (18).

Essas células apresentam inibição do crescimento ao atingir a confluência, levando à necessidade de várias passagens sucessivas para se obter grandes quantidades de MSCs altamente enriquecidas, com ausência de outros tipos celulares. Porém, se mais passagens são necessárias, isso pode alterar a qualidade das MSCs (23).

A expansão de CTM in vitro possui o risco de acumular mudanças genéticas e epigenéticas na célula, o que pode levar a uma transformação celular e ao câncer (45). O cultivo de CTM na presença de reagentes de origem xenogênica, como o soro fetal bovino, também limita a utilização destas células em ensaios clínicos (46).

Diversos autores demonstraram a capacidade de substituir o uso de soro fetal bovino pelo lisado de plaquetas no cultivo de CTM (47-51). Este procedimento previne a contaminação das células cultivadas com patógenos bovinos e a xenoimunização, mantendo a capacidade de proliferação e diferenciação, e assim permite a utilização destas células cultivadas na terapia celular para o tratamento de diversas doenças (46).

Outros métodos de isolamento de CTM já foram descritos como a seleção positiva (52) ou negativa (32,44) em colunas.

MORFOLOGIA E CARACTERÍSTICAS IMUNOISTOQUÍMICAS DA CTM

As CTMs originam colônias após cultivo celular em baixa densidade ou sorting de uma única célula (24). Presume-se que essas colônias sejam derivadas de uma única célula precursora (16). As colônias com mais de 50 células, quando contadas após 10 a 14 dias de cultivo das células mononucleares (CMN) da medula óssea, são chamadas de CFU-F (13,44).

Na microscopia, a CTM apresenta-se como uma célula fibroblastoide alongada, fusiforme e pontiaguda, com

núcleo eucromático, oval, grande e central e citoplasma abundante. Também podem ser observadas, à microscopia eletrônica, cisternas do retículo endoplasmático rugoso dilatadas, vacúolos lipídicos cheios ou vazios, corpos lisossomais e grande quantidade de polirribossomos e ribossomos livres citoplasmáticos, além de filamentos de actina bem organizados em suas extremidades (53). Quando senescentes, as CTMs são grandes, largas, achatadas, proliferam lentamente e expressam uma β -galactosidase associada à senescência (54). Células com morfologia intermediária são observadas no decorrer do cultivo (43).

As CTMs indiferenciadas coram-se pela fosfatase alcalina, sudan-black, colágeno IV, fibronectina e não se coram pela esterase. A matriz que contorna as CTMs contém colágeno do tipo I e laminina da membrana basal. Além disso, um grupo de colônias pode, também, sintetizar um antígeno associado ao fator VIII, o que indicaria uma provável origem endotelial (55).

EXPANSÃO E PROLIFERAÇÃO DA CTM

A cinética da expansão em cultura das CTMs pode ser dividida em três fases: 1) inicial, com duração de 3 a 4 dias, ocorre logo após o plaqueamento das CMN da MO e o crescimento celular é muito lento; 2) logarítmica, durante as primeiras passagens, apresenta um crescimento acelerado; 3) plateau: inicia-se quando a célula atinge a senescência e perde a capacidade de expansão (56, 57).

Um estudo feito por Colter et al. (57) demonstrou que as CTMs podem ser expandidas por mais de 50 vezes quando plaqueadas em diluições muito baixas como 1,5 células/cm². Contudo, se expandiam por apenas 15 vezes quando plaqueadas em concentrações de 5000 células/cm². Os autores concluíram ainda que seja possível expandir e obter mais de 1013 CTMs de apenas 20 mL de MO (57).

Stenderup et al. (58) avaliaram dois grupos de doadores normais com idades que variavam entre 18 e 29 e 66 a 81 anos e encontraram uma capacidade de duplicação da população celular significativamente menor para as células do grupo mais velho comparado com o grupo mais jovem. Concluíram também que as CTMs obtidas dos doadores mais idosos, apesar de manterem a capacidade de diferenciação em adipócitos e osteócitos, exibem uma diminuição do potencial de proliferação, assim como uma aceleração no processo de senescência, se comparadas às dos doadores jovens.

Quanto às horas necessárias para a duplicação celular durante a fase de crescimento logarítmico, Conget e Minguell (59) encontraram um valor de 33 horas, enquanto que Stute et al. (60) de 24 horas.

IMUNOFENOTIPAGEM DAS CTMS

Todas as células do organismo apresentam um conjunto de marcadores de superfície que

caracterizam a singularidade biológica e a marca das células que os contêm. Contudo, as CTM apresentam poucos marcadores imunofenotípicos específicos (55,61), sendo sua caracterização estabelecida pela identificação de um perfil de marcadores específicos e não específicos.

As diferenças quanto à intensidade de expressão dos diversos antígenos podem ser explicadas devido às variações no método de cultivo e na fase evolutiva em que as células são avaliadas (62).

A população de CTMs isoladas da medula óssea de humanos e camundongos expressa em sua superfície marcadores moleculares como: CD44 (receptor de hialuronato), CD105 (endoglina: marcador angiogênico), CD106 (VCAM-1: molécula de adesão vascular), CD166 (ALCAM: moléculas de adesão de leucócitos ativados), CD29 (integrinas VLA- β), CD73 (SH3 e SH4), CD90 (Thy-1), Stro-1 (estroma de suporte da hematopoese) e Sca-1 (63-65).

Kolf et al. afirmaram que o marcador Stro-1 é o melhor marcador a se investigar quando se deseja pesquisar a presença de CTM. Entretanto, esse marcador é gradualmente perdido durante a expansão em culturas. Talvez, porém, combinações como Stro-1 e CD106 poderiam constituir bons marcadores para a identificação de CTM humanas (64).

Existe um consenso na literatura de que as CTMs não possuem marcadores típicos de células de linhagens hematopoéticas e endoteliais, como, por exemplo: CD11b (marcador de célula imune - integrina Mac-1), CD14 (receptor de lipopolissacarídeo LPS), CD31 (PECAM-1: molécula de adesão plaquetária), CD33 (receptor transmembrana de células mieloides), CD34 (receptor de células endoteliais), CD133 e CD45 (presentes em todas as células hematopoéticas). Sendo assim, a ausência dos antígenos CD14, CD34 e CD45 na superfície dessas células mesenquimais permite distingui-las das precursoras hematopoéticas.

Embora já tenham sido identificados oito marcadores de superfície para identificação de MSC, a ISCT concorda que apenas a identificação dos marcadores CD105, CD73 e CD90, quando não estiverem expressos marcadores hematopoéticos, é suficiente para a caracterização imunofenotípica dessas células. Contudo, essa caracterização deve sempre estar acompanhada da demonstração da aderência celular por longos períodos em cultura e da diferenciação destas em pelo menos duas linhagens celulares distintas (22).

FASES DO CULTIVO DE CTM E A RELAÇÃO COM A CITOGENÉTICA

A vida de uma CTM pode ser dividida em três fases, dependendo da sua idade in vitro - fase 1: quando completa menos de 50% da vida celular; fase 2: fase crescimento lento, na qual conclui 50 a 80% da sua existência; fase

3: fase de senescência, durante a qual há uma parada na proliferação celular. No campo da biogerontologia, baseado em características morfológicas, bioquímicas e nas características moleculares, as células na fase 1 são consideradas jovens e na fase 3 senescentes (58).

A senescência replicativa é um fenômeno característico do cultivo de células comprometidas *ex vivo*. Há uma parada na proliferação celular o que limita a geração de um grande número de células. Ocorre secundariamente a vários fatores, incluindo o progressivo encurtamento do telômero, secundário à perda progressiva da atividade telomerase (66).

Após o seu cultivo moderado, as CTMs mantêm seu cariótipo normal e não perdem a atividade da telomerase. Contudo, no cultivo extenso, as funções celulares diminuem, fato confirmado pelos sinais evidentes de senescência e/ou apoptose (17,67). Além disso, um ambiente de estresse por baixas e altas concentrações de oxigênio pode afetar a estabilidade cromossômica das CTMs e assim contribuir para diferentes propriedades biológicas. A estabilidade cromossômica de CTM sobre essas condições é relevante para preparação da CTM e sua aplicação clínica em regeneração tecidual (68).

Alguns experimentos demonstram que as CTMs humanas retêm morfologia estável, fenótipo e características genômicas durante a expansão (69) enquanto outros sugerem lesões genômicas que apareceriam em culturas após várias passagens. Grigorian et al. (70) observaram que em uma de duzentas culturas de CTMs examinadas, obtida de doadores sem patologias e cultivadas sob condições-padrão houve alterações morfológicas, proliferativas e cariotípicas no decorrer das passagens. As células dessa cultura anormal mantiveram características imunofenotípicas de células mesenquimais, porém algumas delas (em torno de 15 a 25%) tiveram numerosas aberrações cromossômicas numéricas e estruturais.

Existem também estudos reportando acúmulo de mutações seguidas de transformações malignas das células mesenquimais de camundongos (71). Quanto ao surgimento de características tumorigênicas foi demonstrado em culturas de CTMs humanas, após um grande número de passagens *in vitro* (>50) (70,72).

Em contrapartida, alterações cromossômicas não foram observadas em outro estudo que avaliou os efeitos da hipóxia ou normóxia nas CTMs (68).

CICLO CELULAR

Estudos de ciclo celular revelaram que, enquanto uma pequena fração das CTMs está ativamente engajada na proliferação (aproximadamente 10% das células se encontram nas fases S + G2 + M), a maioria das células se encontra na

fase G0-G1 do ciclo celular (59), o que sugere uma alta competência destas células em se diferenciar (17). Entretanto, estudos que distinguem as células em crescimento das quiescentes evidenciam que apenas 20% destas encontram-se na fase G0 (não ciclantes) do ciclo celular (59).

DIFERENCIAÇÃO

Como mencionado anteriormente, as células-tronco são capazes de formar osteócitos, condrócitos e adipócitos tanto *in vivo* como *in vitro*. Somada à identificação das CTMs baseadas em suas características fenotípicas, a capacidade destas células formarem, ao menos, estes três tipos celulares distintos são um dos critérios funcionais disponíveis para identificá-las até então (64).

Existem evidências ainda controversas de que as CTMs podem, além de diferenciar-se em células de linhagem mesodérmica, também dar origem às células dos sítios endodérmicos e neuroectodérmico, pelo do processo de transdiferenciação. Dentre estas diferenciações *in vitro*, sob condições de cultivo apropriadas, estão as derivações em tenócitos, células musculares, cardiomiócitos, células endoteliais, hepatócitos e neurônios (64).

Um trabalho de Baksh et al. demonstrou um modelo teórico de diferenciação das CTMs no qual as células indiferenciadas passariam por duas fases antes de adquirir um fenótipo específico. Na primeira, a CTM originaria por divisão assimétrica uma população de células menos indiferenciadas e outra, de células precursoras com potencial de autorrenovação e diferenciação mais restritas (73).

A transição do compartimento de células-tronco para o das comprometidas ocorreria com a divisão simétrica das células progenitoras tri ou bipotentes, o que originaria os progenitores unipotentes. Este processo é bem controlado e envolve uma alteração no perfil de secreção de citocinas e de fatores de crescimento, assim como uma alteração na estrutura tridimensional da matriz extracelular, além da ativação e inativação de fatores transcricionais e a consequente expressão de genes relacionados a esta via de diferenciação (73).

Existem alguns sinais químicos e/ou biológicos que atuam como indutores da diferenciação de MSCs. Fatores como TGF- β (Transforming Growth Factor β)- o mais potente deles, IGF-1 (Insulin-like Growth Factor 1), BFGF (Basic Fibroblast Growth Factor), EGF (Epidermal Growth Factor), PDGF (platelet-derived growth factor), Wnt e ascorbato estimulam o potencial de diferenciação das MSCs em condrócitos. 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, agrecan, requeridos para a formação de cartilagem (23).

O BFGF ou o sinalizador Wnt podem estimular o potencial de diferenciação osteogênico ou neural. O meio suplementado com 1,25-diidroxivitamina D3, 2-fosfato-ascorbato e β -glicerofosfato pode induzir a diferenciação osteogênica. VEGF, por sua vez, estimula o potencial de diferenciação endotelial (23).

Dexametasona, juntamente com isobutil-metilxantina, insulina e indometacina, estimulam o potencial adipogênico; vacúolos ricos em lípidos, detectáveis por coloração com oil red O, acumulam-se no interior das células, que passam a expressar PPAR- γ 2 (23).

A diferenciação em adipócitos é iniciada por fatores agonistas que incluem a insulina, a isometilbutilxantina, a indometacina e os glicocorticoides. A diferenciação é acompanhada não só por alterações na morfologia celular, mas também pela ativação transcripcional de muitos genes como o LPL e o PPAR γ 2 (peroxisome proliferator activated receptor γ 2). Este último é membro da superfamília de receptores de ligantes de fatores transcripcionais ativados e é reconhecido como um receptor nuclear hormonal específico do adipócito. Ele tem um papel-chave na regulação do aumento das células gordurosas e a sua expressão é estimulada pela dexametasona (53).

A diferenciação em condrócitos ocorre quando as CTMs são cultivadas em condições específicas, que incluem o cultivo em formato tridimensional, meio nutritivo sem SBF e a adição de um dos membros da família do TGF- β (transforming growth factor - β), sendo que o TGF- β 2 e o TGF- β 3 são os mais efetivos na promoção da condrogênese. Quando cultivadas nestas condições, as células rapidamente perdem a sua morfologia fibroblastóide e começam a expressar os componentes da matriz extracelular, específicos da cartilagem como os glicosaminoglicanos (74).

O ácido ascórbico, a dexametasona, o β -glicerofosfato e o SBF são necessários para a ativação da diferenciação em osteócitos. Esta via requer a expressão de genes como o Cbfa-1 (core binding factor alpha1), fosfatase alcalina, osteopontina (OST), osteocalcina e colágeno I (75). Quando cultivadas em monocamadas na presença de meio indutor específico, as células adquirem morfologia de osteoblastos, após 14 a 21 dias (76), com aumento da atividade da fosfatase alcalina e deposição de uma matriz extracelular rica em cálcio mineralizado (74).

PRODUÇÃO DE FATORES DE CRESCIMENTO, INTERLEUCINAS E CITOCINAS

As CTMs produzem um grande número de citocinas, dentre elas, podemos citar o LIF (leukemia inhibitory factor), o SCF

(stem cell factor), SDF-1 (stromal derived factor), a oncostatina M (OSM), a BMP-4 (bone morphogenetic protein-4), o ligante Flt-3 da tirosina kinase (Flt-3 lig) e o TGF β .

Também produzem uma grande variedade de interleucinas (IL), como: IL-1, IL-6, IL-7, IL-8, IL-11, IL-12, IL-14 e IL-15. Quando cultivadas na presença da IL-1, as CTMs produzem citocinas que agem nos progenitores hematopoéticos mais maduros, como a TPO (thrombopoietin), o GM-CSF (granulocyte macrophage colony-stimulating factor), o G-CSF (granulocyte colony-stimulating factor), o M-CSF (macrophage colony-stimulating factor) (17,62,77).

Além disso, as CTMs expressam receptores (R) para diversas citocinas e fatores de crescimento, como: IL-1R, IL-3R, IL-4R, IL-6R, IL-7R, LIF-R, SCF-R, G-CSF-R, INF γ -R (interferon γ receptor), TNF1-R e TNF2-R (tumor necrosis factor receptor), TGF β 2-R, TGF β 3-R, bFGF-R (basic fibroblast growth factor receptor), PDGF-R (platelet-derived growth factor receptor) e o EGF-R (epidermal growth factor receptor) (17,77).

Estes dados em conjunto sugerem que as CTMs contribuem para a formação e o funcionamento do microambiente estromal, o qual produz sinais indutores regulatórios não só para as CTMs, mas também para o desenvolvimento dos progenitores hematopoéticos e outras células estromais presentes na medula óssea (13,17,62,77).

PROPRIEDADES IMUNOLÓGICAS DA CTM

Outro motivo, além do seu fácil isolamento e cultivo, potencial de diferenciação e produção de fatores de crescimento e citocinas, para as CTMs se tornarem foco de atenção terapêutica é devido ao seu potencial imunomodulatório (78-80), embora os mecanismos de imunossupressão sobre a resposta inflamatória e sobre os mecanismos de rejeição ao transplante não estejam totalmente esclarecidos.

Mediante um contato direto das CTMs com um tecido (alógeno ou autógeno) ou mediante a interação parácrina com o interferon-gama (INF- γ), produzido por células imunes do organismo, as CTMs desencadeiam a liberação de diversos fatores solúveis que atuarão sobre as células do sistema imunológico (linfócitos e células dendríticas apresentadoras de antígeno - APC) (81,82). Dentre esses fatores, estão as prostaglandinas (PGE2), interleucinas (IL-4, IL-6, IL-10), fator de crescimento transformador beta (TGF β), o fator de crescimento hepatoide (HGF) e a enzima indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) (82).

Como consequência, a liberação de TGF- β e HGF suprime a proliferação dos linfócitos T e B (83), enquanto que a liberação de PGE2 inibe, especificamente, a

produção dos linfócitos T citotóxicos e as demais citocinas pró-inflamatórias. A enzima IDO induz a apoptose dos linfócitos T por transformar o triptofano, que é um aminoácido essencial para a ativação dessas células em produtos tóxicos no seu citoplasma (84). De forma análoga aos mecanismos anteriormente descritos, *in vitro*, a IDO, PGE2 e TGF- β induzem a perda do potencial citotóxico das células natural killer (NK), por suprimirem a produção de IL-2, IL-15 e INF- γ (85). Em relação às APC, evidenciou-se que as CTMs interferem na diferenciação, maturação e ativação dessas células por meio da produção de IL-6 e de fator de crescimento estimulador de macrófago (M-CSF). Além disso, a liberação de PGE2 pelas CTMs inibe a produção e secreção de fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e de INF- γ e estimula a produção de citocina anti-inflamatória IL-10 (82,84).

Além dos efeitos imunossupressores, as CTMs expressam pequenas quantidades de complexo de histocompatibilidade principal (MHC-I) e níveis negligenciáveis de MHC-II (86) e/ou não expressão MHC-II em sua superfície (87). Durante o processo de seleção clonal positiva e negativa realizada pelas células de defesa do organismo (reconhecimento do próprio e do não próprio), essas células utilizam o MHC para realizar tal seleção. Logo, na ausência de MHC, como verificado nas CTMs, o processo de seleção de não próprio não ocorre, impedindo que o organismo que recebeu essas células indiferenciadas as reconheça como não próprias e realize a rejeição dessas (78).

Também o contato célula-célula faz com que haja a produção de diferentes tipos de fatores de crescimento solúveis pelas CTMs, incluindo fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF), fator estimulador de colônias de macrófagos e granulócitos (GM-CSF) e diversas interleucinas (IL-1,6,7,8,11,12,14,15), que influenciam fibroblastos e células granulocíticas envolvidas no processo de inflamação (16).

Entretanto, em um estudo feito por Spaggiari et al. demonstrou que as células NK, previamente ativadas pela IL-2, lisam de maneira eficiente as CTMs autólogas ou alogênicas. Tal ativação pode ser inibida pela exposição das CTMs ao INF- γ , que resulta em uma maior expressão das moléculas de HLA classe I na superfície das CTMs. Em contrapartida, as CTMs podem, por mecanismos ainda não elucidados, inibir a indução de proliferação das células NK latentes e não ativadas. Todavia, este efeito

é apenas parcial nas células NK no estágio proliferativo (88).

Em um outro estudo, Corcione et al. avaliaram o efeito das CTMs sobre as células B e demonstraram que, pela secreção de fatores solúveis inibitórios após sinalização parácrina, as CTMs inibem, *in vitro*, a proliferação, a quimiotaxia e a diferenciação das células B em células secretoras de anticorpos (81).

Como antes exposto, as CTMs parecem ser efetivas na indução da tolerância. Entretanto, a maioria das análises foi realizada com CTMs cultivadas e não *in vivo* (24).

APLICAÇÕES CLÍNICAS DA CTM

A habilidade de purificar, cultivar e manipular CT somáticas multipotentes fornece aos pesquisadores células de valor inestimável, que podem servir para o estudo e o desenvolvimento do reparo tissular com o objetivo de corrigir lesões provocadas por doenças congênitas ou degenerativas. Esse processo conhecido por terapia celular, visa principalmente substituir as células doentes ou disfuncionais por células saudáveis. Como exemplo disso a terapia com células-tronco que é considerada um ramo da terapia celular.

As células-tronco mesenquimais, devido ao seu fácil isolamento e cultivo, potencial de diferenciação e produção de fatores de crescimento e citocinas, têm se tornado as candidatas ideais para os protocolos da medicina regenerativa (66).

Como prova disso, alguns estudos utilizando CTMs em ensaios clínicos mostram que, bilhões de CTMs isoladas ou ligadas a biomateriais, são necessárias. Para isso, a produção de CTMs necessita da observação e aderência às boas práticas de manufatura, para assegurar a liberação deste “medicamento celular” de modo seguro, reprodutível e eficiente (89).

Portanto, são várias as áreas da medicina em que as células-tronco têm sido empregadas, entre elas: cardiologia (90); ortopedia (91); neurologia (92); endocrinologia (93).

A CTM tem ganhado considerável atenção também como ferramenta de tratamento da DECHA (Doença do Enxerto Contra o Hospedeiro aguda) após transplante alogênico de células tronco hematopoéticas (89,94,95). Esta ferramenta de tratamento é estudada no Hospital de Clínicas de Porto Alegre pelo grupo do Centro de Tecnologia Celular do RS localizado do Centro de Pesquisas Experimental.

REFERÊNCIAS

1. Morrison SJ, Shah NM, Anderson DJ. Regulatory mechanisms in stem cell biology. *Cell*. 1997;88(3):287-98.
2. Lemischka IR. Stem cell biology: a view toward the future. *Ann N Y Acad Sci*. 2005;1044:132-8.
3. Vogel G. Can old cells learn new tricks? *Science*. 2000;287(5457):1418-9.
4. Deb KD, Sarda K. Human embryonic stem cells: preclinical perspectives. *J Transl Med*. 2008;6:7.
5. Odorico JS, Kaufman DS, Thomson JA. Multilineage differentiation from human embryonic stem cell lines. *Stem Cells*. 2001;19(3):193-204.
6. Chiu CP, Dragowska W, Kim NW, Vaziri H, Yui J, Thomas TE, et al. Differential expression of telomerase activity in hematopoietic progenitors from adult human bone marrow. *Stem Cells*. 1996;14(2):239-48.
7. Watt FM, Hogan BL. Out of Eden: stem cells and their niches. *Science*. 2000;287(5457):1427-30.
8. Gritti A, Vescovi AL, Galli R. Adult neural stem cells: plasticity and developmental potential. *J Physiol Paris*. 2002;96(1-2):81-90.
9. Meirelles LS, Nardi NB. Methodology, biology and clinical applications of mesenchymal stem cells. *Frontiers in Bioscience*. 2009;14:4281-98.
10. Leri A, Kajstura J, Anversa P. Cardiac stem cells and mechanisms of myocardial regeneration. *Physiol Rev*. 2005;85(4):1373-416.
11. Slack JM. Stem cells in epithelial tissues. *Science*. 2000;287(5457):1431-3.
12. Hirao A, Arai F, Suda T. Regulation of cell cycle in hematopoietic stem cells by the niche. *Cell Cycle*. 2004;3(12):1481-3.
13. Singer NG, Caplan AI. Mesenchymal stem cells: mechanisms of inflammation. *Annu Rev Pathol*. 2011;6:457-78.
14. Aldahmash A, Zaher W, Al-Nbaheen M, Kassem M. Human stromal (mesenchymal) stem cells: basic biology and current clinical use for tissue regeneration. *Ann Saudi Med*. 2012;32(1):68-77.
15. Prockop DJ. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science*. 1997;276(5309):71-4.
16. Deans RJ, Moseley AB. Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses. *Exp Hematol*. 2000;28(8):875-84.
17. Minguell JJ, Erices A, Conget P. Mesenchymal stem cells. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2001;226(6):507-20.
18. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 1999;284(5411):143-7.
19. Basciano L, Nemos C, Foliguet B, de Isla N, de Carvalho M, Tran N, et al. Long term culture of mesenchymal stem cells in hypoxia promotes a genetic program maintaining their undifferentiated and multipotent status. *BMC Cell Biol*. 2011;12:12.
20. Owen M, Friedenstein AJ. Stromal stem cells: marrow-derived osteogenic precursors. *Ciba Found Symp*. 1988;136:42-60.
21. Caplan AI. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res*. 1991;9(5):641-50.
22. 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.
23. Bydlowski SP. Características biológicas das células-tronco mesenquimais. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*. 2009;31:25-35.
24. Javazon EH, Beggs KJ, Flake AW. Mesenchymal stem cells: paradoxes of passaging. *Exp Hematol*. 2004;32(5):414-25.
25. Young HE, Steele TA, Bray RA, Hudson J, Floyd JA, Hawkins K, et al. Human reserve pluripotent mesenchymal stem cells are present in the connective tissues of skeletal muscle and dermis derived from fetal, adult, and geriatric donors. *Anat Rec*. 2001;264(1):51-62.
26. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng*. 2001;7(2):211-28.
27. De Bari C, Dell'Accio F, Tylzanowski P, Luyten FP. Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. *Arthritis Rheum*. 2001;44(8):1928-42.
28. Covas DT, Siufi JL, Silva AR, Orellana MD. Isolation and culture of umbilical vein mesenchymal stem cells. *Braz J Med Biol Res*. 2003;36(9):1179-83.
29. Covas DT, Piccinato CE, Orellana MD, Siufi JL, Silva WA, Jr., Proto-Siqueira R, et al. Mesenchymal stem cells can be obtained from the human saphena vein. *Exp Cell Res*. 2005;309(2):340-4.
30. Almeida-Porada G, El Shabrawy D, Porada C, Zanjani ED. Differentiative potential of human metanephric mesenchymal cells. *Exp Hematol*. 2002;30(12):1454-62.
31. Lee MW, Choi J, Yang MS, Moon YJ, Park JS, Kim HC, et al. Mesenchymal stem cells from cryopreserved human umbilical cord blood. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004;320(1):273-8.
32. Lee OK, Kuo TK, Chen WM, Lee KD, Hsieh SL, Chen TH. Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Blood*. 2004;103(5):1669-75.
33. Ahrens N, Tormin A, Paulus M, Roosterman D, Salama A, Krenn V, et al. Mesenchymal stem cell content of human vertebral bone marrow. *Transplantation*. 2004;78(6):925-9.
34. Alsalamah S, Amin R, Gemba T, Lotz M. Identification of mesenchymal

- progenitor cells in normal and osteoarthritic human articular cartilage. *Arthritis Rheum.* 2004;50(5):1522-32.
35. Seo BM, Miura M, Gronthos S, Bartold PM, Batouli S, Brahim J, et al. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet.* 2004;364(9429):149-55.
 36. Sabatini F, Petecchia L, Taviani M, Jodon de Villeroche V, Rossi GA, Brouty-Boye D. Human bronchial fibroblasts exhibit a mesenchymal stem cell phenotype and multilineage differentiating potentialities. *Lab Invest.* 2005;85(8):962-71.
 37. Fernandez M, Simon V, Herrera G, Cao C, Del Favero H, Minguell JJ. Detection of stromal cells in peripheral blood progenitor cell collections from breast cancer patients. *Bone Marrow Transplant.* 1997;20(4):265-71.
 38. Zvaifler NJ, Marinova-Mutafchieva L, Adams G, Edwards CJ, Moss J, Burger JA, et al. Mesenchymal precursor cells in the blood of normal individuals. *Arthritis Res.* 2000;2(6):477-88.
 39. Kuznetsov SA, Mankani MH, Gronthos S, Satomura K, Bianco P, Robey PG. Circulating skeletal stem cells. *J Cell Biol.* 2001;153(5):1133-40.
 40. Kassis I, Zangi L, Rivkin R, Levdansky L, Samuel S, Marx G, et al. Isolation of mesenchymal stem cells from G-CSF-mobilized human peripheral blood using fibrin microbeads. *Bone Marrow Transplant.* 2006;37(10):967-76.
 41. Friedenstein AJ, Gorskaja JF, Kulagina NN. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp Hematol.* 1976;4(5):267-74.
 42. Peterson KM, Aly A, Lerman A, Lerman LO, Rodriguez-Porcel M. Improved survival of mesenchymal stromal cell after hypoxia preconditioning: role of oxidative stress. *Life Sci.* 2011;88(1-2):65-73.
 43. Digirolamo CM, Stokes D, Colter D, Phinney DG, Class R, Prockop DJ. Propagation and senescence of human marrow stromal cells in culture: a simple colony-forming assay identifies samples with the greatest potential to propagate and differentiate. *Br J Haematol.* 1999;107(2):275-81.
 44. Tondreau T, Lagneaux L, Dejeneffe M, Delforge A, Massy M, Mortier C, et al. Isolation of BM mesenchymal stem cells by plastic adhesion or negative selection: phenotype, proliferation kinetics and differentiation potential. *Cytotherapy.* 2004;6(4):372-9.
 45. Lepperdinger G, Brunauer R, Jamnig A, Laschober G, Kassem M. Controversial issue: is it safe to employ mesenchymal stem cells in cell-based therapies? *Exp Gerontol.* 2008;43(11):1018-23.
 46. Tekkatte C, Gunasingh GP, Cherian KM, Sankaranarayanan K. "Humanized" stem cell culture techniques: the animal serum controversy. *Stem Cells Int.* 2011;504723.
 47. Doucet C, Ernou I, Zhang Y, Llense JR, Begot L, Holy X, et al. Platelet lysates promote mesenchymal stem cell expansion: a safety substitute for animal serum in cell-based therapy applications. *J Cell Physiol.* 2005;205(2):228-36.
 48. Horn P, Bokermann G, Cholewa D, Bork S, Walenda T, Koch C, et al. Impact of individual platelet lysates on isolation and growth of human mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy.* 2010 Nov;12(7):888-98.
 49. Salvade A, Della Mina P, Gaddi D, Gatto F, Villa A, Bigoni M, et al. Characterization of platelet lysate cultured mesenchymal stromal cells and their potential use in tissue-engineered osteogenic devices for the treatment of bone defects. *Tissue Eng Part C Methods.* 2010;16(2):201-14.
 50. Schallmoser K, Bartmann C, Rohde E, Reinisch A, Kashofer K, Stadelmeyer E, et al. Human platelet lysate can replace fetal bovine serum for clinical-scale expansion of functional mesenchymal stromal cells. *Transfusion.* 2007;47(8):1436-46.
 51. Xia W, Li H, Wang Z, Xu R, Fu Y, Zhang X, et al. Human platelet lysate supports ex vivo expansion and enhances osteogenic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Cell Biol Int.* 2011;35(6):639-43.
 52. Campioni D, Lanza F, Moretti S, Dominici M, Punturieri M, Pauli S, et al. Functional and immunophenotypic characteristics of isolated CD105(+) and fibroblast(+) stromal cells from AML: implications for their plasticity along endothelial lineage. *Cytotherapy.* 2003;5(1):66-79.
 53. Tagami M, Ichinose S, Yamagata K, Fujino H, Shoji S, Hiraoka M, et al. Genetic and ultrastructural demonstration of strong reversibility in human mesenchymal stem cell. *Cell Tissue Res.* 2003;312(1):31-40.
 54. Fehrer C, Lepperdinger G. Mesenchymal stem cell aging. *Exp Gerontol.* 2005;40(12):926-30.
 55. Alhadlaq A, Mao JJ. Mesenchymal stem cells: isolation and therapeutics. *Stem Cells Dev.* 2004;13(4):436-48.
 56. Bruder SP, Jaiswal N, Haynesworth SE. Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation. *J Cell Biochem.* 1997;64(2):278-94.
 57. Colter DC, Class R, DiGirolamo CM, Prockop DJ. Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000 Mar 28;97(7):3213-8.
 58. Stenderup K, Justesen J, Clausen C, Kassem M. Aging is associated with decreased maximal life span and accelerated senescence of bone marrow stromal cells. *Bone.* 2003;33(6):919-26.

59. Conget PA, Minguell JJ. Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells. *J Cell Physiol*. 1999;181(1):67-73.
60. Stute N, Holtz K, Bubenheim M, Lange C, Blake F, Zander AR. Autologous serum for isolation and expansion of human mesenchymal stem cells for clinical use. *Exp Hematol*. 2004;32(12):1212-25.
61. Meirelles LS, Chagastelles PC, Nardi NB. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J Cell Science*. 2006;119:10.
62. Dazzi F, Ramasamy R, Glennie S, Jones SP, Roberts I. The role of mesenchymal stem cells in haemopoiesis. *Blood Rev*. 2006;20(3):161-71.
63. Gronthos S, Zannettino AC, Hay SJ, Shi S, Graves SE, Kortessidis A, et al. Molecular and cellular characterisation of highly purified stromal stem cells derived from human bone marrow. *J Cell Sci*. 2003;116(Pt 9):1827-35.
64. 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.
65. Phinney DG, Prockop DJ. Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair—current views. *Stem Cells*. 2007;25(11):2896-902.
66. Kassem M, Kristiansen M, Abdallah BM. Mesenchymal stem cells: cell biology and potential use in therapy. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2004;95(5):209-14.
67. Le Blanc K, Ringden O. Immunobiology of human mesenchymal stem cells and future use in hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2005;11(5):321-34.
68. Holzwarth C, Vaegler M, Gieseke F, Pfister SM, Handgretinger R, Kerst G, et al. Low physiologic oxygen tensions reduce proliferation and differentiation of human multipotent mesenchymal stromal cells. *BMC Cell Biol*. 2010;11:11.
69. Bernardo ME, Avanzini MA, Perotti C, Cometa AM, Moretta A, Lenta E, et al. Optimization of in vitro expansion of human multipotent mesenchymal stromal cells for cell-therapy approaches: further insights in the search for a fetal calf serum substitute. *J Cell Physiol*. 2007;211(1):121-30.
70. Grigorian AS, Kruglyakov PV, Taminkina UA, Efimova OA, Pendina AA, Voskresenskaya AV, et al. Alterations of cytological and karyological profile of human mesenchymal stem cells during in vitro culturing. *Bull Exp Biol Med*. 2010;150(1):125-30.
71. Miura M, Miura Y, Padilla-Nash HM, Molinolo AA, Fu B, Patel V, et al. Accumulated chromosomal instability in murine bone marrow mesenchymal stem cells leads to malignant transformation. *Stem Cells*. 2006;24(4):1095-103.
72. Rubio D, Garcia-Castro J, Martin MC, de la Fuente R, Cigudosa JC, Lloyd AC, et al. Spontaneous human adult stem cell transformation. *Cancer Res*. 2005;15;65(8):3035-9.
73. 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.
74. Barry FP, Murphy JM. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. *Int J Biochem Cell Biol*. 2004;36(4):568-84.
75. Minguell JJ, Conget P, Erices A. Biology and clinical utilization of mesenchymal progenitor cells. *Braz J Med Biol Res*. 2000;33(8):881-7.
76. Abdallah BM, Kassem M. Human mesenchymal stem cells: from basic biology to clinical applications. *Gene Ther*. 2008;15(2):109-16.
77. Devine SM, Hoffman R. Role of mesenchymal stem cells in hematopoietic stem cell transplantation. *Curr Opin Hematol*. 2000;7(6):358-63.
78. Wan CD, Cheng R, Wang HB, Liu T. Immunomodulatory effects of mesenchymal stem cells derived from adipose tissues in a rat orthotopic liver transplantation model. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*. 2008;7(1):29-33.
79. Shi M, Liu ZW, Wang FS. Immunomodulatory properties and therapeutic application of mesenchymal stem cells. *Clin Exp Immunol*. 2011;164(1):1-8.
80. Gaston J, Quinchia Rios B, Bartlett R, Berchtold C, Thibeault SL. The response of vocal fold fibroblasts and mesenchymal stromal cells to vibration. *PLoS One*. 2012;7(2):e30965.
81. Corcione A, Benvenuto F, Ferretti E, Giunti D, Cappiello V, Cazzanti F, et al. Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. *Blood*. 2006;107(1):367-72.
82. Nauta AJ, Fibbe WE. Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells. *Blood*. 2007 Nov 15;110(10):3499-506.
83. Di Nicola M, Carlo-Stella C, Magni M, Milanese M, Longoni PD, Matteucci P, et al. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood*. 2002;99(10):3838-43.
84. Aggarwal S, Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood*. 2005;105(4):1815-22.
85. Sotiropoulou PA, Perez SA, Gritzapis AD, Baxevanis CN, Papamichail M. Interactions between human mesenchymal stem cells and natural killer cells. *Stem Cells*. 2006;24(1):74-85.
86. Le Blanc K. Immunomodulatory effects of fetal and adult mesenchymal stem cells. *Cytotherapy*. 2003;5(6):485-9.
87. Caplan AI. Why are MSCs therapeutic? New data: new insight. *J Pathol*. 2009;217(2):318-24.

88. Spaggiari GM, Capobianco A, Becchetti S, Mingari MC, Moretta L. Mesenchymal stem cell-natural killer cell interactions: evidence that activated NK cells are capable of killing MSCs, whereas MSCs can inhibit IL-2-induced NK-cell proliferation. *Blood*. 2006;107(4):1484-90.
89. Le Blanc K, Fibbe W. A new cell therapy registry coordinated by the European Group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT). *Bone Marrow Transplant*. 2008;41(3):319.
90. Huttmann A, Gutersohn A, Noppeney R, Neumann T, Erbel R, Duhrsen 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.
91. 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.
92. 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.
93. Voltarelli JC, Couri CE. Stem cell transplantation for type 1 diabetes mellitus. *Diabetol Metab Syndr*. 2009;1(1):4.
94. von Bahr L, Sundberg B, Lonnie L, Sander B, Karbach H, Hagglund H, et al. Long-Term Complications, Immunologic Effects, and Role of Passage for Outcome in Mesenchymal Stromal Cell Therapy. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2011 Aug 4.
95. McGuirk JP, Weiss ML. Promising cellular therapeutics for prevention or management of graft-versus-host disease (a review). *Placenta*. 2011 Oct;32 Suppl 4:S304-10.

Recebido: 22/11/2011

Aceito: 08/03/2012