

Células tronco mesenquimais: definição, características e principais fontes de obtenção

Mesenchymal stem cells: definition, characteristics and main obtaining sources

Autor: Felipe de Lara Janz

Pós-doutorando na Faculdade de Filosofia, Letras e Ciências Humanas da Universidade de São Paulo (FFLCH-USP). Professor nas Faculdades Metropolitanas Unidas (FMU-NEAD).

Resumo: as células tronco despertam interesse por suas características biológicas peculiares que as tornam possíveis ferramentas clínicas em diversas áreas biomédicas. As células tronco mesenquimais, por sua vez, são consideradas células multipotentes adultas não hematopoiéticas com propriedade de autorrenovação e capacidade de diferenciação em tecidos mesenquimais. Estas células podem ser obtidas de diferentes fontes no organismo adulto. Este artigo de revisão tem como objetivo descrever os tipos de células tronco, sobretudo as mesenquimais, bem como as principais fontes de onde as mesmas podem ser obtidas.

Palavras-chave: células tronco; células tronco mesenquimais; fontes de isolamento; cultura celular; biologia celular

Abstract: stem cells cause interest for its peculiar biological characteristics that make them possible clinical tools in several biomedical areas. Mesenchymal stem cells, in turn, are considered multipotent adult non-hematopoietic cells with self-renewal property and ability to differentiate into mesenchymal tissues. These cells may be obtained from different sources in the adult organism. This review article aims to describe the types of stem cells, particularly mesenchymal as well as the main sources from which they can be obtained.

Key-words: stem cells; mesenchymal stem cells; obtaining sources; cell culture; cell biology.

INTRODUÇÃO

Terapias celulares baseadas na utilização de células-tronco com o intuito de regenerar ou substituir outros tipos celulares demonstram um grande potencial terapêutico. As células-tronco adultas (CTAs), sobretudo pelas discussões em torno das pesquisas com células embrionárias, representam atualmente a fonte mais acessível para engenharia de tecidos. Além da falta de entraves ético-religiosos as CTAs podem ser obtidas a partir de procedimentos minimamente invasivos. Dentre estas células adultas, destacam-se as células-tronco mesenquimais (CTMs), que são as mais utilizadas atualmente em estudos básicos, pré-clínicos e clínicos ao redor do mundo.

Células-tronco, por definição, são aquelas capazes de autorrenovação prolongada através de sucessivas divisões mitóticas do tipo assimétrica e passíveis de originar pelo menos um tipo celular em estágio mais avançado de diferenciação (Morrisson *et al.*, 1997). Ainda como característica, as células-tronco são células não-especializadas, ou seja, não possuem ainda comprometimento morfológico e funcional com nenhum tipo celular (Del Carlo, 2005).

As células-tronco são divididas em dois grandes grupos que dizem respeito ao seu local de origem: podem ser embrionárias (CTEs), quando são derivadas da massa celular interna do blastocisto embrionário; e adultas (CTAs) que são aquelas localizadas em estado mais diferenciado na maioria dos tecidos do organismo adulto (Vogel, 2000). Levando em consideração o grau de plasticidade da célula-tronco, ou seja, o seu potencial de diferenciação em tecidos variados, podemos classificá-las em três tipos: totipotentes, pluripotentes e multipotentes.

As células-tronco totipotentes podem originar tanto um organismo totalmente funcional, como qualquer tipo celular do corpo, inclusive todo o sistema nervoso central e periférico (Gage, 2000). Correspondem às células do embrião recém-formado (zigoto) e têm potencial para originarem até mesmo as células dos folhetos extra-embrião,

que formarão a placenta e os demais anexos responsáveis pelo suporte ao embrião. Entretanto, estas células possuem um tempo de vida curto e desaparecem poucos dias após a fertilização (Robey, 2000).

As pluripotentes são células capazes de originar qualquer tipo de tecido sem, no entanto, originar um organismo completo, visto que não podem gerar a placenta e outros tecidos embrionários de apoio ao feto. Formam a massa celular interna do blastocisto depois do quarto dia de fecundação e participam da formação de todos os tecidos do organismo (Robey, 2000).

As células-tronco multipotentes são um pouco mais diferenciadas, presentes no indivíduo adulto, com capacidade de originar apenas um limitado número de tipos teciduais. Estas células são designadas de acordo com o órgão do qual derivam e podem originar apenas células deste órgão, possibilitando a regeneração tecidual local (Gage, 2000).

1. CÉLULAS-TRONCO EMBRIONÁRIAS

Em cada embrião no estágio de blastocisto, as células-tronco da massa celular interna diferenciam-se para formar o ectoderma primitivo, o qual, durante a gastrulação, diferencia-se nos três folhetos embrionários (ectoderma, mesoderma e endoderma). Quando removidas do seu ambiente embrionário normal e cultivadas em condições apropriadas, estas células dão origem a células que se proliferam e renovam-se indefinidamente (Weissman, 2000). As células-tronco embrionárias (CTEs) são células pluripotentes dotadas de grande plasticidade, que apresentam características particulares, como uma ilimitada capacidade de proliferação *in vitro* sob estímulos, além da possibilidade de formar células derivadas dos três folhetos embrionários em cultura (Odorico *et al.*, 2001; Deb, 2008).

As CTEs humanas expressam muitos marcadores que são comuns às células pluripotentes, como: CD9, CD24, Oct-4, Nanog, fosfatase alcalina, Rex-1, Cripto/TDGF1, DNMT3B, SOX-2, EBAF e Thy-1, bem como, os antígenos específicos de estágio embrionário, SSEA-3 e SSEA-4 (Trounson, 2006; Richards *et al.*, 2004; Chambers, 2004). Também exibem, em geral, altos níveis e uma alta atividade da enzima telomerase quando em cultura por longos períodos. Esta enzima é responsável pelo reagrupamento dos telômeros cromossômicos após as divisões impedindo, desta forma, a senescência celular. Outra característica típica destas células é a formação de teratomas (neoplasias benignas que contém células derivadas dos três folhetos germinativos) quando injetadas em camundongos imunodeprimidos (Yao *et al.*, 2006).

2. CÉLULAS-TRONCO ADULTAS

Além do embrião, as células-tronco também são encontradas em vários órgãos e tecidos no indivíduo adulto, onde participam da homeostase tecidual, gerando novas células em resposta ao repovoamento celular fisiológico ou a algum tipo de injúria. Tais populações celulares indiferenciadas mantidas no organismo adulto são denominadas células-tronco adultas ou adulto-específicas (Odorico *et al.*, 2001; Chiu, 1996; Watt *et al.*, 2000).

As células-tronco adultas (CTAs) estão em estado quiescente ou de baixa proliferação, predominantemente nas fases G0 e G1 do ciclo celular, localizando-se em regiões específicas essenciais para o seu desenvolvimento e a manutenção de seus atributos, particularmente a capacidade de autorrenovação (Gritti *et al.*, 2002). Estas regiões são denominadas de nichos celulares e dentre os principais sítios estão: medula óssea (Heissig, 2005), coração (Leri *et al.*, 2005), rins (Li, 2005), pele (Tumbar *et al.*, 2004), fígado (Guettier, 2005), pâncreas, ovários, cordão umbilical, placenta, líquido

amniótico, âmnio, entre outros (Slack, 2000; Brittan, 2002; Modlin, 2003; Lavker *et al* 2004; Watts, 2005; Woodward, 2005; Kim *et al.*, 2005).

As primeiras CTAs estudadas e, conseqüentemente, as mais bem caracterizadas são as células hematopoiéticas provenientes da medula óssea (Hirao, 2004). Mais tarde foi isolado outro tipo de célula-tronco adulta também constituinte da medula óssea, porém com características diferentes das hematopoiéticas, tratava-se das células-tronco mesenquimais (CTMs).

2.1. CÉLULAS-TRONCO HEMATOPOIÉTICAS (CTHS)

A célula-tronco hematopoiética é definida como uma célula adulta com grande capacidade de autorrenovação e potencial proliferativo, o que possibilita a sua diferenciação em células progenitoras de todas as linhagens hematológicas e a reconstituição da população sanguínea a partir de uma única célula. Constituem de 0,05% a 0,1% da população da medula óssea humana e das células hematopoiéticas circulantes. A CTHs tem origem mesenquimal e, durante o período de vida intra-uterino, está presente no saco vitelino embrionário e, posteriormente, desloca-se por via hematogênica para o fígado, baço, linfonodos e timo fetal. (Jain, 1986). Além da medula óssea podemos encontrá-las também no sangue periférico no sangue proveniente do cordão umbilical e no sistema hematopoiético fetal (Negrin *et al.*, 2000; Laughlin, 2001; Humeau *et al.*, 1996).

O fenótipo da célula-tronco hematopoiética inclui a expressão dos antígenos de superfície CD34 e CD90 (Thy-1) e ausência do CD38. O antígeno CD34 funciona como molécula de adesão enquanto o CD90 parece estar envolvido na sinalização da transdução gênica (Humeau *et al.*, 1996). Um subgrupo primitivo das CTHs, chamado de “side population (SP)” que corresponde aos precursores das células CD34+, não expressa ou expressa quantidades muito baixas de CD34 (Ding, 2010).

2.2 CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS (CTMS)

São consideradas células multipotentes não hematopoiéticas com propriedade de autorrenovação e capacidade de diferenciação em tecidos mesenquimais (Reiser *et al.*, 2005). O primeiro relato das CTMs foi realizado pelo pesquisador russo Friedenstein e seus colaboradores, na década de 70, que as descreveu como sendo células aderentes, morfológicamente semelhantes aos fibroblastos e com alta capacidade de adesão à superfície plástica. Vários estudos posteriores relataram a multipotência destas células, ou seja, a capacidade de diferenciarem-se em linhagens derivadas da mesoderme embrionária: osteogênica, condrogênica e adipogênica (Prockcop, 1997).

Segundo a Sociedade Internacional de Terapia Celular uma determinada população de células será classificada como célula-tronco mesenquimal quando apresentar três características chaves. 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 que as expressões dos antígenos de membrana CD105 (endogлина ou SH2), CD73 (SH3 ou SH4) e CD90 (Thy-1) tenham uma positividade maior de 95% e que CD34, CD45, CD14, ou CD11b, CD79, ou CD19 e HLA-DR sejam expressos em menos de 2% das células em cultura. Por fim, que as células possam ser diferenciadas em tecido ósseo, gorduroso e cartilaginoso após estímulo (Horwitz, 2005).

De toda forma, ainda não há um marcador específico para a caracterização das CTMs. A expressão variável de muitos dos marcadores superficiais pode ser explicada não somente pelos diferentes protocolos utilizados para o isolamento celular e caracterização do cultivo, mas também à variação na fonte ou tipo de tecido de onde são obtidas as células, bem como, a idade e o sexo do paciente.

3. PRINCIPAIS FONTES DE OBTENÇÃO DAS CTMs

3.1. MEDULA ÓSSEA

A medula óssea adulta é um compartimento onde ocorrem interações entre sistemas celulares diferentes que formam um microambiente essencial (estroma) para a hematopoese (Prockop, 1997). As CTMs são encontradas primariamente imersas no estroma medular e em íntimo contato com diversos outros tipos celulares, como: adipócitos, fibroblastos, osteoblastos, células reticulares, entre outras. Sua frequência é muito baixa sendo estimada em 0,005% de todas as células mononucleadas de uma MO. Muitos fatores podem influenciar no número de células, tal como a presença de patologias, uso de medicamentos e a idade do doador. A quantidade de CTMs encontradas na medula óssea fetal, por exemplo, é cerca de 25 vezes maior do que na medula de uma pessoa adulta (Balduino, 2002).

Devido aos seus efeitos imunomoduladores *in vivo* e *in vitro*, as CTMs têm sido utilizadas principalmente para tratar ou prevenir GVHD (*Graft versus host disease*, doença exerto contra o hospedeiro) agudo após ou durante transplante de células-tronco progenitoras hematopoéticas (CTHs).

3.2. CORDÃO UMBILICAL

O cordão umbilical é um anexo placentário exclusivo dos mamíferos que permite a ligação entre o embrião e a placenta e é responsável, entre outras coisas, pela nutrição e respiração fetal. É formado por duas artérias e uma veia envoltas por um material gelatinoso denominado de geleia de Wharton (Erices, 2000). A geleia de Wharton é um tecido conectivo gelatinoso, composto por miofibroblastos como células do estroma, fibras colágenas e proteoglicanas.

Na última década, um número considerável de estudos comprovou que o sangue de cordão umbilical humano possui células-tronco hematopoéticas e um *pool* de células-

tronco mesenquimais. A população de células-tronco na matriz da geléia está localizada perto da vasculatura do cordão, estas são denominadas células perivasculares do cordão umbilical humano. As CTMs apresentam potencial de proliferação e diferenciação em múltiplas linhagens, semelhantemente ao observado nas células da medula óssea. No entanto, como estas células correspondem a apenas uma pequena parcela das células mononucleares presentes em cada amostra, é necessário isolá-las e multiplicá-las *in vitro* para se ter um alto rendimento celular (Goodwin, 2001; Panepucci, 2004).

Dentre as vantagens, a coleta do cordão não envolve riscos para a mãe ou para o bebê. Ainda em comparação com as células da medula óssea, no sangue de cordão existe frequentemente um número maior de células-tronco por volume coletado com alta taxa de proliferação e estas células, quando transplantadas, são menos suscetíveis ao desencadeamento de reatividade alogênica no receptor (McGuckin, 2004; Park, 2006).

3.3. TECIDO ADIPOSEO

Anatomicamente, o tecido adiposo branco (TAB) distribui-se no organismo como tecido adiposo subcutâneo e tecido adiposo visceral. Além dos adipócitos, o TAB contém uma matriz de tecido conjuntivo (fibras colágenas e reticulares), tecido nervoso, células do estroma vascular, nódulos linfáticos, células imunes (leucócitos, macrófagos), fibroblastos e células-tronco. Observou-se, nos últimos anos, que o tecido adiposo não é apenas um fornecedor e armazenador de energia, mas um órgão dinâmico, produtor de hormônios, que está envolvido em uma variedade de processos fisiológicos e fisiopatológicos, por ser capaz de secretar várias proteínas denominadas adipocinas.

Nos últimos anos o tecido adiposo adulto foi reconhecido como uma fonte alternativa, acessível e rica de CTMs. Assim como a medula óssea, tem origem no mesoderma embrionário e possui um estroma que pode ser facilmente isolado através de lipoaspiração, formado por células endoteliais, células de músculo liso e adipócitos.

Todas estas células estromais são enzimaticamente digeridas e as CTMs são isoladas depois de centrifugação para retirada do material gorduroso e restos celulares. A frequência de CTMs neste tecido é de aproximadamente 2×10^8 células para cada 100 ml de líquido lipoaspirado enquanto que a média fica entre 2% das células nucleadas totais.

3.4. LÍQUIDO AMNIÓTICO

O líquido amniótico é um fluido que provém do organismo materno e fetal em proporções variáveis de acordo com a idade gestacional. Entre as suas principais funções destacam-se o crescimento externo simétrico do embrião, barreira contra infecções, isolamento e não aderência entre embrião e âmnio, proteção contra traumatismos, controle da temperatura corporal e veículo para que o feto se mova livremente, contribuindo assim para o desenvolvimento muscular (Sadler, 2005).

A descoberta de células progenitoras no fluido amniótico foi inicialmente relatada em 1993, quando células pequenas, nucleadas e arredondadas, identificadas como células progenitoras hematopoéticas, foram encontradas antes da 12ª semana de gestação; estas células eram, possivelmente, provenientes da vesícula vitelina (Torriceli, 1993). Em 1996, sugere-se a presença de células de linhagem não hematopoética, com potencial multilinhagem, no líquido amniótico, e demonstra-se a conversão miogênica destas células (Streubel, 1996).

As células do líquido amniótico são provenientes, em sua maior parte, do epitélio e dos tratos digestivo e urinário do feto e podem ser classificadas em: tipo E (epitelioides), derivadas da pele e urina fetais; tipo AF (amniotic fluid), específicas do líquido amniótico, que produzem estrógeno, progesterona e gonadotrofina coriônica humana, sendo derivadas do âmnion e do trofoblasto; tipo F (fibroblásticas), derivadas do tecido conjuntivo fetal. As células tipo AF e E aparecem no início da cultura celular

enquanto as células tipo F aparecem posteriormente; porém, somente as células do tipo AF e F persistem com o tempo, enquanto as do tipo E desaparecem (Milunsky, 1979; Laundon, 1981; Prusa, 2002).

3.5. POLPA DENTÁRIA

Inúmeros estudos têm isolado células altamente proliferativas, derivadas da polpa dentária. Constatou-se que tais células são multipotentes e possuem a capacidade de autorrenovação e de diferenciação em diversos tipos celulares. Ademais, as células-tronco da polpa dentária expressaram nestina e proteína glial fibrilar ácida (GFAP, sigla do inglês *glial fibrillar acid protein*), que são marcadores de precursores neurais e células gliais, respectivamente.

Existem evidências de que células-tronco de dentes decíduos são similares às aquelas encontradas no cordão umbilical. Quando comparadas às células-tronco provenientes da medula óssea e da polpa de dentes permanentes, notou-se que as SHED (*stem cells from human exfoliated deciduous teeth*) apresentam uma maior taxa de proliferação. Além disso, os dados desse estudo indicam que as SHED possuem habilidade de se diferenciarem em células odontoblásticas funcionais.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

As células-tronco são células progenitoras indiferenciadas que apresentam características peculiares, dentre elas, podemos destacar a alta taxa de proliferação em cultura, capacidade de autorrenovação e potencial de diferenciação em inúmeros tecidos. As células-tronco mesenquimais, por sua vez, compõem um grupo particular de células-tronco adultas encontradas em várias partes do organismo com capacidade de diferenciação em tecidos mesenquimais. Com o avanço no entendimento das características apresentadas pelas CTMs e a padronização das técnicas de isolamento,

cultivo, diferenciação e congelamento fica cada vez mais possível a aplicação clínica destas células.

REFERÊNCIAS

BALDUINO A. 2006. Análise Celular e Molecular do Componente Estromal da Região Subendosteal da Medula Óssea: o Nicho das Células-Tronco Hematopoéticas. Tese Universidade Federal do Rio de Janeiro.

CHIU C. 1996. Differential expression of telomerase activity in hematopoietic progenitors from adult human marrow. *Stem Cells*; 14:239-248.

DEL CARLO RJ. 2005. Células-tronco. *Revista do Conselho Federal de medicina Veterinaria Suplemento Técnico*. 60-68.

ERICES A, CONGET P, MINGUELL JJ. 2000. Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. *Br J Haematol*. 109(1): 235-42.

FRIEDENSTEIN AJ, DERIGLASOVA UF, KULAGINA NN, PANASUK AF, RUDAKOWA SF, LURIA EA, RUADKOW IA. 1974. Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay method. *Exp Hematol*. 2(2):83-92.

GAGE FH. 2000. Mammalian neural stem cells. *Science Washington DC*. 287: 1433-1438.

GOODWIN HS, BICKNESE AR, CHIEN SN, BOGUCKI BD, QUINN CO, WALL DA. 2001. Multilineage differentiation activity by cells isolated from umbilical cord blood: expression of bone fat and neural markers. *Biol Blood Marrow Transplant.* 7(11): 581-8.

GRITTI A, VESCOVI AL, GALLI R. 2002. Adult neural stem cells plasticity and developmental potential. *J. Physiol. Paris.* 96 1/2: 81-89.

GUETTIER C. 2005. Which stem cells for adult liver? *Ann Pathol.* 25: 33–44.

HEISSIG B, OHKI Y, SATO Y. 2005. A role for niches in hematopoietic cell development. *Hematology.* 10: 247–253.

HIRAO A, ARAI F, SUDA T. 2004. Regulation of cell cycle in hematopoietic stem cells by the niche. *Cell Cycle.* 3: 1481–1483.

HORWITZ EM, LE BLANC K, DOMINICI M, MUELLER I, SLAPER-CORTENBACH I, MARINI FC. 2005. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 7(5):393-5.

MCGUCKIN CP, FORRAZ N, ALLOUARD Q, PETTENGELL R. 2004. Umbilical cord blood stem cells can expand hematopoietic and neuroglial progenitors in vitro. *Exp Cell Res.* 295(2): 350-9.

MILUNSKY A, Bender CS. 1979. Failure of amniotic-fluid cell growth with toxic tubes. *N Engl J Med.* 301(1): 47-8.

MILUNSKY A. 1979. Alpha-fetoprotein and the prenatal detection of neural tube defects. *Am J Public Health*. 69 (6): 552-3.

MORRISON SJ, SHAN NM, ANDERSON DJ. 1997. Regulatory mechanisms in stem cell biology. *Cell*. 88:287-298.

ODORICO JS, KAUFMANN DS, THOMSON JA. 2001. Multilineage differentiation from human embryonic stem cell lines. *Stem Cells Dayton*. 19:193-204.

ROBEY PG. 2000. Stem cells near the century mark. *J Clin Invest Thorofare*. 105(11): 1489-1491.

SADLER TW. 2005. *Langman Embriologia Médica*. 9^a ed. Editora Guanabara Koogan Rio de Janeiro: 131-137.

SLACK JMW. Stem cells in epithelial tissues. 2000. *Science Washington*. 287:1431-1433.

STREUBEL B, MARTUCCI-IVESSA G, FLECK T, BITTNER RE. 1996. In vitro transformation of amniotic cells to muscle cells--background and outlook. *Wien Med Wochenschr*. 146 (9-10): 216-7.

TORRICELLI F, BRIZZI L, BERNABEI PA, GHERI G, DI LOLLO S, NUTINI L. 1993. Identification of hematopoietic progenitor cells in human amniotic fluid before the 12th week of gestation. *Ital J Anat Embryol*. 98(2): 119-26.

TUMBAR T, GUASCH G, GRECO V. Defining the epithelial stem cell niche in skin. Science 2004. 303: 359–363.

VOGEL G. Can old cells learn new tricks? Science Washington. 2000. 287: 1418-1419.

WEISSMAN IL. 2000. Translating stem and progenitor cell biology to the clinic: barriers and opportunities. Science Washington DC. 287:1442-1446.

YAO S, CHEN S, CLARK J. 2006. Long-term self-renewal and directed differentiation of human embryonic stem cells in chemically defined conditions. Proc Natl Acad SciUSA. 103: 6907–6912.

YARAK, S AND OKAMOTO, OK. 2010. Human adipose-derived stem cells: current challenges and clinical perspectives. An Bras Dermatol.;85(5):647-56.