

LÍQUIDO AMNIÓTICO COMO FONTE DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS

AMNIOTIC FLUID: MESENCHYMAL STEM CELLS SOURCE

Felipe de Lara Janz *; Carolina Martinez Romão **; Sérgio Paulo Bydlowski ***

* Pós-Graduando da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

E-mail: fljanz@usp.br

** Pós-Graduanda da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. E-mail:

klolroma@usp.br

*** Chefe do Laboratório de Genética e Hematologia Molecular (LIM-31)

da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. E-mail: sbydlow@usp.br

Recebido para publicação em 12/12/2008

Aceito para publicação em 07/03/2009

RESUMO

Células-tronco são caracterizadas por seu estado indiferenciado e seu alto poder de autorrenovação através de divisões assimétricas. Sob a influência de determinados sinais biológicos, elas podem se diferenciar em células fenotipicamente distintas de seus precursores. São divididas em dois grandes grupos de acordo com o local de seu isolamento: embrionárias, que são as células retiradas da camada celular interna do blastocisto; e adultas, que são aquelas encontradas em diversos locais de tecidos pós-natais. As células-tronco mesenquimais, por sua vez, formam um grupo heterogêneo de células adultas multipotentes, capazes de originar tecidos mesenquimais: ósseo, adiposo e cartilaginoso, sendo encontradas tanto em tecidos fetais quanto em adultos. O líquido amniótico humano, um fluido complexo e dinâmico que envolve o feto durante a gestação, contém uma variedade de células esfoliadas do embrião em sua composição. Procedimentos bem estabelecidos de isolamento, crescimento e expansão das células do líquido amniótico podem proporcionar uma fonte alternativa de células-tronco mesenquimais com diversas aplicações biomédicas.

Palavras-Chaves: Células-tronco mesenquimais. Líquido amniótico. Terapia celular.

ABSTRACT

Stem cells are characterized by their undifferentiated state and their high capacity of self renewal through asymmetric divisions. Under the influence of certain biological signals they can differentiate into specialized cells phenotypically different from their precursors. They are divided into to their place of origin: embryonic

isolated from the inner cell layer of blastocyst and adult when obtained from postnatal tissues. Mesenchymal stem cells, on the other hand, forms a heterogeneous group of multipotent adult stem cells capable of originating mesenchymal tissues: bone, fat, cartilage and were found in several fetal and postnatal tissues. Human amniotic fluid, a dynamic and complex liquid that surrounds the fetus, contains progenitors cells exfoliated from embryo that could be obtained by amniocentesis and isolated in culture. Mesenchymal stem cells from amniotic fluid present a high proliferation rate, multipotential plasticity and can be used in many biomedical applications.

Keywords: Mesenchymal stem cells. Amniotic fluid. Cell therapy. two major

Introdução

Células-tronco, por definição, são aquelas células capazes de autorrenovação ilimitada ou prolongada através de divisões mitóticas assimétricas e passíveis de originar pelo menos um tipo celular em estágio mais avançado de diferenciação (Figura 01). Ainda como característica, as células-tronco são células não especializadas, isto é, não têm comprometimento morfológico e funcional com nenhum tipo celular. (MORRISON, et al., 1997).

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

As células-tronco mesenquimais (CTM), por sua vez, são aquelas consideradas adultas, multipotentes não hematopoiéticas, com propriedade de autorrenovação e capacidade de diferenciação em tecidos mesenquimais e não mesenquimais. (REISER, et al., 2005). O primeiro relato das CTM foi realizado pelo pesquisador russo Friedenstein e seus colaboradores no ano de 1970, que as descreveu como sendo células aderentes, morfológicamente semelhantes aos fibroblastos e com alta capacidade de adesão à superfície de cultivo. Vários estudos posteriores relataram a multipotência dessas células, ou seja, a capacidade de diferenciarem-se em osteoblastos, condroblastos e adipócitos. (ABDALLAH, et al., 2008).

Segundo a Sociedade Internacional de Terapia Celular (SITC), 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 em cultura. (HORWITZ, et al., 2005). De toda forma, ainda não há marcadores específicos para a caracterização das CTM, e as propriedades exigidas pela SITC tampouco são contundentes, visto que também estão presentes em outros tipos celulares que não nas células-tronco.

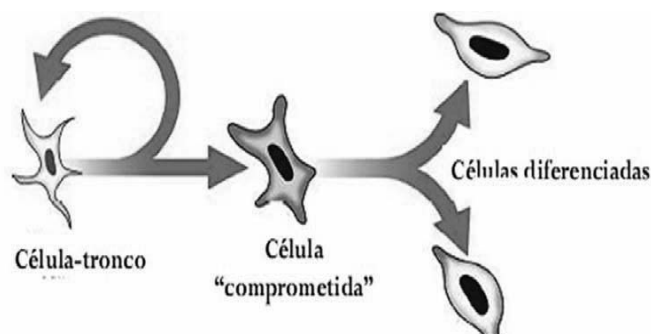


Figura 01- Célula-tronco e suas características de autorrenovação e diferenciação.

O líquido amniótico humano é um fluido complexo e dinâmico que provém dos organismos

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. Os principais componentes deste líquido apresentam-se em suspensão e em dissolução na água, que é seu principal constituinte. Entre os elementos em suspensão encontram-se células esfoliadas do âmnio e, principalmente, do feto. (BELFORT, 1993).

Duas técnicas são utilizadas no estudo e obtenção do líquido amniótico durante a gravidez: amniocentese e amnioscopia. A amniocentese consiste na introdução de uma agulha longa através da parede abdominal da mãe para a retirada do fluido, sendo que o volume do líquido retirado depende da idade do feto e do motivo do exame. A amnioscopia é um método endoscópico de visualização da câmara amniótica, que permite observá-la pelo canal cervical e através das membranas do polo inferior do embrião. (REZENDE, et al., 1998).

A amniocentese (Figura 02), realizada a partir da décima quarta semana, é o método mais difundido para a obtenção de material fetal com finalidade de diagnóstico pré-natal de alterações genéticas, defeitos de tubo neural, idade gestacional, maturidade fetal pulmonar e, mais recentemente, para o cultivo de células progenitoras. A amniocentese é um procedimento seguro, com risco de perda fetal geralmente menor do que 1%. (BISHOP, et al., 1996).

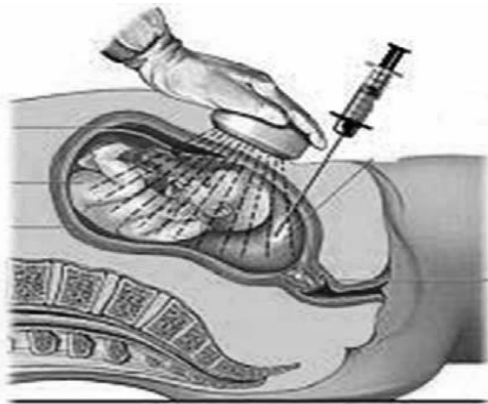


Figura 02- Figura da técnica de amniocentese para coleta de líquido amniótico.

A descoberta de células progenitoras no fluido amniótico (Figura 03) foi inicialmente relatada em 1993, quando células pequenas, nucleadas e arredondadas, identificadas como células progenitoras hematopoéticas, foram encontradas antes da 12ª semana de gestação; essas células eram, possivelmente, provenientes da vesícula vitelínica. (TORRICELLI, et al., 1993). Em 1996, sugere-se a presença de células de linhagem não hematopoética com potencial multilinhagem e demonstra-se a diferenciação miogênica das mesmas. (STREUBEL, et al., 1996). Também se confirmou a origem fetal das células mesenquimais coletadas do líquido amniótico e cultivadas *in vitro* por meio da tipagem molecular dos antígenos leucocitários humanos. (ERLICH, et al., 1991). Trabalhos atuais, como o de Prusa et al. em 2003, também corroboraram a presença de células-tronco progenitoras de origem mesenquimal, que expressaram altos níveis do gene ligado ao estado de indiferenciação Oct-4.

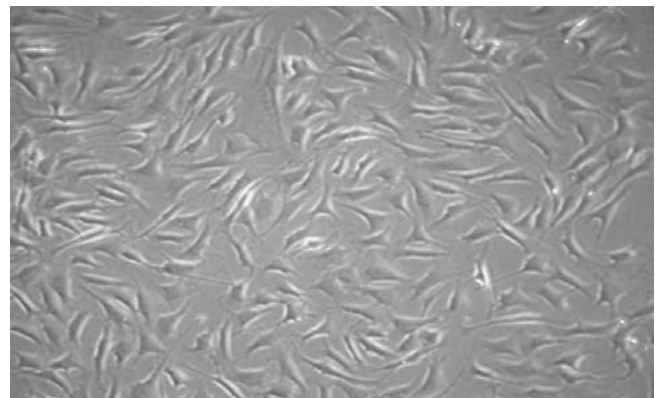


Figura 03- Foto das células-tronco mesenquimais do líquido amniótico em cultura.

A utilização das CTM no reparo tecidual é estudada há tempos (BRUDER, et al., 1993), porém, o potencial dessas células proporciona muitas outras aplicações experimentais. Seu potencial de diferenciação em diversos tecidos, suas propriedades imunossupressoras e a relativa facilidade de manuseio *in vitro* fazem das CTM uma ferramenta importante para, entre outras coisas, a engenharia tecidual, tratamento de doenças degenerativas e estudo de novos fármacos. Dentre as áreas da medicina com maior número de estudos envolvendo as CTM atualmente estão a Cardiologia

(VILAS-BOAS, et al., 2006; AROM, et al., 2008), a Neurologia (MAZZINI, et al., 2006) e a Endocrinologia (NOGUCHI, et al., 2007).

Conclusões

O isolamento e expansão de células-tronco mesenquimais provenientes do líquido amniótico humano, além de utilizar uma fonte menos invasiva e de apresentar um protocolo mais simples e rápido do que outras fontes de CTM, também se encontra livre dos entraves éticos, morais e religiosos que cercam, por exemplo, o uso de células-tronco embrionárias. As CTM do líquido amniótico possuem, ainda, um alto grau de indiferenciação, elevada taxa de proliferação *in vitro* e grande capacidade de diferenciação celular. Todas estas vantagens transformam o líquido amniótico em uma fonte de escolha atrativa para obtenção de células-tronco mesenquimais.

REFERÊNCIAS

- ABDALLAH, B. M., KASSEM, M. Human mesenchymal stem cells: from basic biology to clinical applications. **Gene Ther.**; v.15, n.2, p.109-16, 2008.
- AROM, K. V.; RUENGSAKULRACH, P.; JOTISAKULRATANANA, V. Intramyocardial angiogenic cell precursor injection for cardiomyopathy. **Asian Cardiovasc Thorac Ann.**, v.16, n.2, p.143-8, 2008.
- BELFORT, P.; ORLAND, O. **Medicina perinatal**. São Paulo: Manole, 1993. p. 39-45.
- BISHOP, M. L. et al. **Clinical chemistry**. Lippincott: Raven Publishers, 1996. p. 469-73.
- BRUDER, S. P.; FINK, D. J.; CAPLAN, A. I. Mesenchymal stem cells in bone development, bone repair, and skeletal regeneration therapy. **J Cell Biochem.**, v.56, n.3, p.283-94, Nov., 1994.
- ERLICH, H., et al. HLA-DR, DQ and DP typing using PCR amplification and immobilized probes. **Eur J Immunogenet.**, v.18, n.1-2, p.33-55, 1991.
- HORWITZ, E.M., et al. Clarification of the nomenclature for MSC: the international society for cellular therapy position statement. **Cytotherapy**, v.7, n.5 p.393-5, 2005.
- MAZZINI, L., et al. Autologous mesenchymal stem cells: clinical applications in amyotrophic lateral sclerosis. **Neurol Res.**, v.28, n.5, p.523-6, 2006.
- MORRISON, S. J.; SHAH, N.M., ANDERSON, D.J. Regulatory mechanisms in stem cell biology. **Cell.**, v.88, p.287-298, 1997.
- NOGUCHI, H. Stem cells for the treatment of diabetes. **Endocr. J.**,v.54, n.1, p.7-16, 2007.
- PRUSA, A. R., et al. Oct-4-expressing cells in human amniotic fluid: a new source for stem cell research? **Human Reproduction**, v.18, n.7, p.1489-1493, July, 2003.
- REISER, J. et al. Potential of mesenchymal stem cells in gene therapy approaches for inherited and acquired diseases. **Expert Opin Biol Therapy**, v.5, n.12, p.1571-84, Dec., 2005.
- REZENDE, J. et al. **Obstetrícia**. 8.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998. p. 204-9.
- STREUBEL, B., et al. In vitro transformation of amniotic cells to muscle cells--background and outlook. **Wien Med Wochenschr.**, v.146, n.9-10, p.216-7, 1996.
- TORRICELLI, F. et al. Identification of hematopoietic progenitor cells in human amniotic fluid before the 12th week of gestation. **Ital J Anat Embryol.**, v.98, n.2, p.119-26, 1993.
- VILAS-BOAS, F., et al. Early results of bone marrow cell transplantation to the myocardium of patients with heart failure due to Chagas disease. **Arq Bras Cardiol.**, v.87, n.2, p.159-66, 2006.