

Sangue periférico como fonte de células para terapia celular

Peripheral blood as a source of stem cells

Alfredo Mendrone Junior

O sangue periférico tem sido utilizado como fonte de células progenitoras hematopoéticas para o transplante de medula óssea, única aplicação clínica bem estabelecida até o momento para as células-tronco. Mais recentemente, além das células progenitoras hematopoéticas, estudos têm identificado também no sangue periférico a presença de células-tronco mesenquimais. Estas células apresentam as mesmas características e marcadores de superfície que as células-tronco mesenquimais da medula óssea e são capazes de diferenciação em células do tecido conjuntivo como osteócitos, condrócitos, adipócitos e miócitos. Embora sua origem e destino ainda sejam desconhecidos, a presença destas células no sangue periférico de indivíduos adultos representa um importante instrumento na área de medicina regenerativa e terapia celular. O conhecimento de marcadores imunofenotípicos que possam caracterizar as CTM de forma mais prática e objetiva e de possíveis estratégias capazes de aumentar o número destas células na circulação são fundamentais para o avanço de pesquisas clínicas baseadas na sua utilização. Rev. Bras. Hematol. Hemoter. 2009; 31 (Supl. 1):19-24.

Palavras-chave: Célula-tronco mesenquimal; célula progenitora hematopoética; unidades formadoras de colônias de fibroblastos (CFU-Fs); sangue periférico; mobilização.

Sangue periférico como fonte de células-tronco hematopoéticas

As células progenitoras hematopoéticas (CPH) da medula óssea são responsáveis pela formação de todas as células maduras presentes no sangue. Embora recentemente tenham surgido evidências de que as CPH também têm a capacidade de se diferenciarem em outras linhagens celulares não hematopoéticas, a única aplicação clínica bem estabelecida para as CPH até o momento é a recomposição do tecido hematopoético medular após terapia mieloablativa no transplante de medula óssea.

Desde o início dos anos 80, após descrições de que CPH também se encontram na circulação, o sangue periférico tem sido utilizado como fonte de CPH para a realização de transplante de medula óssea (TMO) autogênico e alogênico. Em 1981, Körbling¹ descreveu o que pode ter sido o primeiro

caso de recuperação hematopoética em um paciente com leucemia mielóide crônica submetido a transplante autólogo de medula óssea, utilizando células mononucleares normais de sangue periférico. Estas células foram obtidas do sangue por leucaférese e criopreservadas para serem infundidas posteriormente, após regime de condicionamento. Em 1986, Kessinger² relatou pela primeira vez, em humanos, reconstituição hematopoética completa após transplante autólogo, utilizando células progenitoras mobilizadas de sangue periférico. No mesmo ano, Reiffers³ reportou um caso de leucemia aguda não linfocítica em primeira recaída tratada com transplante autólogo utilizando células progenitoras de sangue periférico coletadas previamente por leucaférese, e Körbling⁴ publica um artigo relatando um caso de linfoma de Burkitt em remissão completa, também tratado com transplante autólogo utilizando células periféricas coletadas. Nos dois relatos, os pacientes apresentaram rápida reconstituição hematopoética.

¹Médico do Laboratório de Biologia Molecular da Divisão de Sorologia da FPS/HSP – São Paulo-SP.

Fundação Pró-Sangue/Hemocentro de São Paulo – São Paulo-SP.

Correspondência: Alfredo Mendrone Junior
Av. Dr. Enéas Carvalho de Aguiar, 155 – 1º andar – Cerqueira César
05403000 – São Paulo-SP – Brasil
E-mail: alfredo.mendrone@prosangue.sp.gov.br
Doi: 10.1590/S1516-84842009005000026

Em 1989, um caso ocasional de transplante alogênico foi realizado utilizando células progenitoras de sangue periférico depletadas de linfócitos T. Enxertia das três linhagens hematopoéticas foi observada 27 dias após o transplante. Estudos citogenéticos revelaram que a medula óssea e o sangue periférico do receptor foram repovoados exclusivamente por células do doador.⁵

O sucesso desses relatos iniciais, associado à facilidade para obtenção de CPH de sangue periférico através de equipamentos automatizados de aférese utilizados na coleta, ao menor tempo para reconstituição hematopoética observada com CPH circulantes do que com células coletadas diretamente da medula óssea⁶⁻⁸ e às publicações demonstrando que as CPH do sangue periférico são capazes de reconstituir a hematopoese em curto prazo e em longo prazo,^{9,10} fizeram com que o sangue periférico progressivamente substituísse a medula óssea como fonte de CPH tanto em transplantes autólogos quanto em alogênicos. Em 1994, 65% dos transplantes autólogos e 5% dos transplantes alogênicos registrados pelo European Group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT) foram realizados com CPH de sangue periférico.¹¹ Em 2005, 98% dos transplantes autólogos e 74% dos transplantes alogênicos realizados na Europa utilizaram o sangue periférico como fonte de CPH.^{7,12,13}

As CPH têm sido caracterizadas através da sua expressão do antígeno CD34. Em transplantes autogênicos, o tempo para enxertia hematopoética após terapia mieloablativa está diretamente relacionado com o número de células CD 34+ infundidas.⁶ Na maioria desses transplantes, a infusão de um número igual ou superior a $2,0 \times 10^6$ células CD34+/kg peso é suficiente para que a enxertia hematológica ocorra em 10-12 dias.¹⁴ A administração de doses superiores a $5,0 \times 10^6$ células CD34+/kg peso proporciona um incremento ainda maior na velocidade de recuperação hematológica, especialmente de plaquetas.¹⁵ Inversamente, doses inferiores a $1,0 \times 10^6$ células CD34+/kg de peso geralmente levam a um retardo na recuperação de neutrófilos, sendo que, em alguns pacientes, a recuperação hematopoética completa poderá nunca ocorrer.¹⁶ Por esta razão, o número de CPHs coletadas tem importância fundamental no resultado do transplante autólogo.

Em condições basais, a quase totalidade das CPH se encontra na medula óssea. Apenas duas em cada 100 mil células mononucleares do sangue periférico são CPH.¹⁷ Para se coletar um número suficiente de células progenitoras hematopoéticas do sangue periférico que garanta enxertia medular em um transplante autogênico ou alogênico, as CPH devem ser recrutadas da medula óssea para a circulação. Este processo, habitualmente denominado mobilização, pode ser clinicamente induzido em humanos através da administração de agentes quimioterápicos mielossuppressores, como a ciclofosfamida e o etoposide, da administração de fatores de crescimento hematopoéticos, como o G-CSF e o GM-CSF, ou com a administração combinada de ambos.^{2,18,19} Em trans-

plantes autogênicos, a administração conjunta de quimioterapia mielossupressora e fatores de crescimento hematopoéticos tem sido a abordagem mais comumente utilizada para mobilização de CPH.²⁰ Esta abordagem é capaz de promover um maior incremento de CPH no sangue periférico do que a administração isolada de ambos²¹ e ainda reduzir o risco de contaminação do produto coletado por células tumorais. Em transplantes alogênicos, a administração isolada de fatores de crescimento ao doador é suficiente para produzir uma mobilização adequada de CPH para o sangue periférico e consequentemente um rendimento desejado na coleta.

O reconhecimento de estratégias capazes de promover a mobilização das CPH da medula óssea para o sangue periférico também contribuiu para o aumento da utilização de CPH circulante no TMO.

Sangue periférico como fonte de células-tronco mesenquimais

O conceito de célula-tronco mesenquimal (CTM) foi proposto por Maureen Owen²² e popularizado por Arnold Caplan no final dos anos 80 e início dos anos 90. Caplan caracterizou as CTM como sendo células com morfologia fibroblastóide que se aderem à superfície de crescimento e com expressão de antígenos reativos com os anticorpos monoclonais SH2, SH3 e SH4.²³ Por esta razão, estas células foram inicialmente denominadas de células formadoras de colônias de fibroblastos (CFU-Fs = *colony stimulating unit - fibroblastic*). Mais recentemente, receberam a denominação de células-tronco mesenquimais.

As CTM têm a capacidade de diferenciação *in vivo* e *ex vivo* em células do tecido conjuntivo, incluindo adipócitos, osteócitos, condrócitos e miócitos. Estudos recentes têm demonstrado que as CTM também contribuem favoravelmente no tempo de enxertia da célula-tronco hematopoética, na prevenção da doença do enxerto contra hospedeiro (DECH) e ainda podem se diferenciar em células de outras linhagens celulares incluindo neuroectodérmica e endodérmica.⁴⁵ Em decorrência da possibilidade do seu uso em medicina regenerativa e em engenharia de tecidos, essas células têm gerado grande interesse por parte dos pesquisadores.

A principal fonte de CTM é a medula óssea. No entanto, estas células representam apenas uma pequena porcentagem do número total de células da medula. Pittenger e colaboradores²⁴ mostraram que somente 0,01% - 0,001% das células mononucleares isoladas por gradiente de densidade dão origem a colônias de células aderentes ao plástico da superfície de crescimento. Além da medula óssea, as CTM também estão localizadas em outros tecidos incluindo tecido adiposo, placenta, sangue de cordão umbilical, líquido amniótico, fígado fetal e sangue periférico.²⁵

As observações feitas no início do século passado sobre a transformação de leucócitos circulantes em células

fibroblásticas, com posterior diferenciação em tecido conjuntivo,^{26,27} provavelmente representam as primeiras evidências da presença de CFU-Fs no sangue periférico. Posteriormente, outros pesquisadores confirmaram a existência de CFU-Fs no sangue com característica clonogênica e com elevada capacidade replicativa.²⁸⁻³¹ No entanto, foi sugerido inicialmente que essas células fibroblásticas encontradas em amostras de sangue periférico poderiam ser resultado de contaminação de fragmentos de tecido conjuntivo. Esta suspeita de contaminação da amostra por células endoteliais ou por tecido conjuntivo durante a coleta da amostra foi logo eliminada por resultados obtidos em experimentos que compararam o número de colônias fibroblásticas no sangue após cultura de amostra obtida com múltiplas punções e com punção única.³²

Desde então, inúmeros relatos têm surgido na literatura demonstrando a presença, no sangue periférico, de células com capacidade de se diferenciarem em outras células no tecido conjuntivo.³³⁻³⁸

Tondreau e col.³⁴ testaram o potencial do sangue periférico mobilizado com fator de crescimento como fonte de células-tronco mesenquimais. Os autores demonstraram que CTM podem ser facilmente isoladas a partir da fração de células CD133+ do sangue periférico mobilizado. Os autores observaram também que as CTM circulantes apresentam grande potencial proliferativo e capacidade de diferenciação em adipócitos, osteócitos, condrócitos, neurônios e células da glia, igualmente às CTM da medula óssea. Os autores relataram também que as CTM do sangue periférico expressam Oct4, marcador presente em células indiferenciadas com alta capacidade proliferativa.

Khosla e Eghbali-Fatourechí³⁸ referiram a presença no sangue periférico de células com potencial osteogênico. Estas células se encontram em número aumentado no sangue de adolescentes do sexo masculino e provavelmente aumentam também após fraturas ósseas. Estas células expressam proteínas relacionadas com o tecido ósseo e podem mineralizar *in vitro*. Os autores concluem que a identificação destas células no sangue periférico abre novas questões a respeito da reparação de fraturas e remodelação óssea.

Zwaifler e col.³⁹ demonstraram a presença de CTM no sangue periférico de pessoas normais e observaram que, da mesma maneira que as CTM da medula óssea, as CTM do sangue periférico, quando colocadas em cultura, se aderem ao plástico ou vidro da superfície de crescimento, sofrem proliferação logarítmica na presença de soro fetal bovino e formam células com morfologia fibroblástica. A obtenção das células não foi afetada com a seleção negativa de células CD34, CD3 e CD14 positivas.

Mansilla e cols.⁴⁰ compararam a presença de células com imunofenótipo de CTM no sangue periférico de indivíduos normais e de grandes queimados com o objetivo de testar a hipótese de que, durante situações de grande lesão tecidual, o número destas células aumenta na circulação. Os

autores encontraram CTM na circulação de ambos os grupos. No entanto, quando comparado com amostras obtidas de indivíduos normais, o sangue de pacientes com queimaduras mostrou uma porcentagem significativamente maior de CTM ($P < 0.001$). A porcentagem de CTM no sangue periférico apresentou correlação direta com a extensão e a gravidade da queimadura. Os autores concluíram que as CTM encontradas no sangue periférico provavelmente desempenham um importante papel no processo de regeneração de tecidos humanos.

Experimentos realizados *in vivo* e *in vitro* têm demonstrado que as CFU-Fs de sangue periférico mantêm a mesma capacidade de diferenciação mesenquimal das CFU-Fs provenientes da medula óssea, incluindo diferenciação em osteoblastos, adipócitos, condrócitos e fibroblastos. A sua habilidade de multidiferenciação faz das CTM de sangue periférico uma candidata potencial para aplicação em terapia celular e engenharia de tecidos. Como o sangue é mais facilmente acessível do que a medula óssea, as vantagens de se utilizar o sangue periférico como fonte de CTM são óbvias. No entanto, o número de CTM no sangue periférico é inferior ao da medula óssea, o que pode representar um obstáculo para sua utilização clínica no futuro.^{34,41}

Embora a presença de CTM no sangue periférico seja fortemente sugerida, ainda não está esclarecido como estas células chegam à circulação.⁴² A hipótese mais aceita é de que as CTM migram da medula óssea e/ou de outros órgãos para a periferia. Em um trabalho experimental, CTM autogênicas da medula óssea foram injetadas no fêmur de camundongos com osteogênese imperfeita. Posteriormente, elas foram detectadas no fêmur contralateral, pulmões e fígado, além da cavidade óssea local.⁴³

Em outro estudo também experimental, Shirley e colaboradores⁴⁴ testaram a hipótese de que, após uma fratura óssea, existe um recrutamento sistêmico de células formadoras de osso para o local da fratura, usando um modelo de osteotomia ulnar em coelhos. Neste estudo, CTM da medula óssea marcadas foram implantadas na cavidade óssea da tíbia do animal 48 horas após a osteotomia ulnar. Após três semanas, as CTM marcadas foram encontradas no calo da fratura ulnar. Os autores concluíram que alguns osteoblastos envolvidos na reparação da fratura ulnar produzida nos animais foram mobilizados de sítios medulares remotos e recrutados para o local da fratura.

G-CSF é capaz de aumentar o número de CFU-Fs no sangue periférico?

Kassis e colaboradores³⁷ avaliaram a presença de CTM de diferentes fontes, com ênfase no sangue periférico mobilizado com G-CSF de indivíduos normais. Utilizando microesferas recobertas com fibrina, os autores isolaram um número significativo de CTM de sangue periférico mobilizado. Estas células apresentaram pluripotencialidade com capaci-

dade de diferenciação em vários fenótipos da linhagem mesodérmica.

Lund e colaboradores⁴⁶ analisaram as células mononucleares de sangue periférico mobilizado com fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF) de doadores voluntários. Os autores observaram que, embora em pequeno número, o sangue mobilizado com G-CSF contém uma população de células com marcadores fenotípicos de CTM que eles chamaram de CFU-Fs mobilizadas. Estas células se diferenciaram nas linhagens osteogênicas e adipogênicas. No entanto, diferente de relatos anteriores, as CFU-Fs mobilizadas apresentaram capacidade limitada de expansão *in vitro* e se tornaram senescentes 20-25 dias após o isolamento, muito provavelmente devido à diminuição da atividade telomerase. Os autores concluem que este achado poderá limitar seu uso potencial em transplantes ou terapia gênica.

Em um trabalho experimental com camundongos submetidos a transplante de medula óssea (TMO) alogênico, Tatsumi e colaboradores⁴⁷ observaram que o tratamento com G-CSF provocou aumento significativo no número de CTM do doador tanto na medula óssea quanto no sangue periférico do receptor. Os autores concluíram que o G-CSF promove enxertia das células-tronco mesenquimais do doador na medula óssea e sua mobilização para a circulação após TMO alogênico.

Ripa e colaboradores⁴⁸ estudaram 78 pacientes com infarto agudo do miocárdio submetidos a tratamento com G-CSF com o objetivo de descrever o potencial de mobilização de células-tronco do G-CSF com ênfase especial nas CTM. Os autores observaram que o número de células-tronco mesenquimais aumentou aproximadamente quatro vezes durante o tratamento com G-CSF, resultando em exposição do miocárdio de $5,0 \pm 3,7 \times 10^{11}$ CTM após o G-CSF quando comparado com $2,0 \pm 1,2 \times 10^{11}$ células no grupo placebo ($P < 0.001$).

Características histoquímicas e imunofenotípicas das CFU-Fs de sangue periférico

As CTM do sangue periférico apresentam características histoquímicas e imunofenotípicas muito semelhantes às CTM da medula óssea. As CTM circulantes sintetizam uma série de proteínas da matriz extracelular, não possuem marcadores de células progenitoras hematopoéticas (CD 34), de macrófagos (CD 14) e antígeno comum leucocitário (CD 45). Apresentam baixa expressão de CD117, não apresentam HLA-DR na sua superfície e expressam CD44, CD105 (SH2), CD106 (VCAM-1), CD166, CD73 (SH3) e CD90 (Thy-1). As principais características imunofenotípicas da CTM de sangue periférico podem ser vistas na Tabela 1.

Tabela 1. Características imunofenotípicas das CFU-Fs de sangue periférico

Classe de Marcador	Marcador	Resultado
Progenitor Hematopoético	CD34	Negativo
	HLA-Dr	Negativo
	CD133	Positivo
	CD177	Negativo/Positivo
Monócito / Macrófago	CD14	Negativo
Leucócito	CD45	Negativo
	CD6	Negativo
Mesenquimal	CD105 (SH2)	Positivo
	CD73 (SH3)	Positivo
	CD90 (Thy-1)	Positivo
	CD54	Positivo
	CD166	Positivo
	CD106 (VCAM-1)	Positivo
	ICAM-1	Positivo
	Vimentina	Positivo
Fibroblasto	Colágeno Tipo I	Positivo
	Colágeno Tipo II	Positivo
	Colágeno Tipo III	Positivo
	Colágeno Tipo IV	Positivo
	Fibronectina	Positivo
	CD33	Positivo
	CD44	Positivo

Concluindo, o sangue periférico representa uma importante fonte de células progenitoras hematopoéticas. Recentes relatos sobre a presença de células-tronco mesenquimais na circulação e sua capacidade de multidiferenciação, associado à maior facilidade na coleta em relação à medula óssea, têm despertado o interesse de alguns pesquisadores sobre a utilização do sangue periférico como fonte de células-tronco mesenquimais com propostas de terapia celular. Embora até o presente momento a medula óssea ainda represente a principal fonte de CTM, a identificação de marcadores imunofenotípicos que possam caracterizar as CTM de forma mais prática e objetiva e o conhecimento sobre mecanismos envolvidos no aparecimento destas células na circulação com possíveis estratégias para sua mobilização, poderão fazer do sangue periférico uma importante fonte de CTM, assim como o ocorrido durante os anos 90 com relação às células progenitoras hematopoéticas circulantes.

Abstract

Peripheral blood has been routinely used as a source of hematopoietic progenitor cells for allogeneic and autologous bone marrow transplantation. Recent studies have demonstrated that a low number of mesenchymal stem cells are also present in the peripheral blood. They share the same surface markers as bone marrow-derived mesenchymal stem cells and are capable of

differentiating into mesenchymal lineage cells including osteocytes, adipocytes and chondrocytes. Although their origin and destination are unclear, their presence in the peripheral blood of adults seems to represent an important and powerful tool for regenerative medicine and cell therapy. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* 2009;31 (Supl. 1):19-24.

Key words: Mesenchymal stem cell; hematopoietic stem cell; colony-forming units- fibroblastic (CFU-Fs); peripheral blood; mobilization.

Referências Bibliográficas

- Körbling M, Burke P, Braine H, Eifenbein G, Santos G, Kaizer H. Successful engraftment of blood derived normal hemopoietic stem cells in chronic myelogenous leukemia. *Exp Hematol.* 1981; 9(6):684-90.
- Kessinger A, Armitage JO, Landmark JD, Weisenburger DD. Reconstitution of human hematopoietic function with autologous cryopreserved circulating stem cells. *Exp Hematol.* 1986;14(3): 192-6.
- Reiffers J, Bernard P, David B, Vezon G, Sarrat A, Marit G, *et al.* Successful autologous transplantation with peripheral blood hemopoietic cells in a patient with acute leukemia. *Exp Hematol.* 1986;14(4):312-5.
- Körbling M, Dörken B, Ho AD, Pezzutto A, Hunstein W, Fliedner TM. Autologous transplantation of blood-derived hemopoietic stem cells after myeloablative therapy in a patient with Burkitt's lymphoma. *Blood.* 1986;67(2):529-32.
- Kessinger A, Smith DM, Strandjord SE, Landmark JD, Dooley DC, Law P, *et al.* Allogeneic transplantation of blood-derived, T cell-depleted hemopoietic stem cells after myeloablative treatment in a patient with acute lymphoblastic leukemia. *Bone Marrow Transplant.* 1989;4(6):643-6.
- To LB, Haylock DN, Simmons PJ, Juttner CA. The biology and clinical uses of blood stem cells. *Blood.* 1997;89(7):2233-58.
- Gratwohl A, Baldomero H, Horisberger B, Schmid C, Passweg J, Urbano-Ispizua A, *et al.* Current trends in hematopoietic stem cell transplantation in Europe. *Blood.* 2002;100(7):2374-86.
- Arai S, Klingemann HG. Hematopoietic stem cell transplantation: bone marrow vs. mobilized peripheral blood. *Arch Med Res.* 2003;34(6):545-53.
- Haas R, Witt B, Möhle R, Goldschmidt H, Hohaus S, Fruehauf S, *et al.* Sustained long-term hematopoiesis after myeloablative therapy with peripheral blood progenitor cell support. *Blood.* 1995; 85 (12):3754-61.
- Schmitz N, Eapen M, Horowitz MM, Zhang MJ, Klein JP, Rizzo JD, *et al.* Long-term outcome of patients given transplants of mobilized blood or bone marrow: A report from the International Bone Marrow Transplant Registry and the European Group for Blood and Marrow Transplantation. *Blood.* 2006;108(13):4288-90.
- Gratwohl A, Hermans J, Baldomero H. Hematopoietic precursor cell transplants in Europe: activity in 1994. Report from the European Group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT). *Bone Marrow Transplant.* 1996;17(2):137-48.
- Gratwohl A; EBMT JACIE Accreditation Office. Overview of transplant activity in Europe. *Hematol J.* 2004;5 Suppl 3:S29-33.
- Gratwohl A, Baldomero H, Frauendorfer K, Urbano-Ispizua A, Niederwieser D, *et al.* Results of the EBMT activity survey 2005 on haematopoietic stem cell transplantation: focus on increasing use of unrelated donors. *Bone Marrow Transplant.* 2007; 39 (2):71-87.
- Siena S, Schiavo R, Pedrazzoli P, Carlo-Stella C. Therapeutic relevance of CD34 cell dose in blood cell transplantation for cancer therapy. *J Clin Oncol.* 2000;18(6):1360-77.
- Solá C, Maroto P, Salazar R, Mesía R, Mendoza L, Brunet J, *et al.* Bone marrow transplantation: Prognostic factors of peripheral blood stem cell mobilization with cyclophosphamide and filgrastim (r-metHuG-CSF): The CD34⁺ cell dose positively affects the time to hematopoietic recovery and supportive requirements after high-dose chemotherapy. *Hematology.* 1999; 4(3):195-209.
- Weaver CH, Potz J, Redmond J, Tauer K, Schwartzberg LS, Kaywin P, *et al.* Engraftment and outcomes of patients receiving myeloablative therapy followed by autologous peripheral blood stem cells with a low CD34⁺ cell content. *Bone Marrow Transplant.* 1997;19(11):1103-10.
- Kanz L and Brugger W. Mobilization and *ex vivo* manipulation of peripheral blood progenitor cells for support of high-dose cancer therapy. In: Thomas ED, Blume KG, Forman SJ, eds. *Hematopoietic Cell Transplantation.* Blackwell Science, Malden, MA, USA. pp: 455-468, 1999.
- To LB, Shepperd KM, Haylock DN, Dyson PG, Charles P, Thorp DL, *et al.* Single high doses of cyclophosphamide enable the collection of high numbers of hemopoietic stem cells from the peripheral blood. *Exp Hematol.* 1990;18(5):442-7.
- Reddy RL. Mobilization and collection of peripheral blood progenitor cells for transplantation. *Transfus Apher Sci.* 2005; 32 (1):63-72.
- Fruehauf S, Seggewiss R. It's moving day: factors affecting peripheral blood stem cell mobilization and strategies for improvement [corrected]. *Br J Haematol.* 2003;122(3):360-75.
- Lane TA, Law P, Maruyama M, Young D, Burgess J, Mullen M, *et al.* Harvesting and enrichment of hematopoietic progenitor cells mobilized into the peripheral blood of normal donors by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) or G-CSF: potential role in allogeneic marrow transplantation. *Blood.* 1995;85(1):275-82.
- Owen M. Lineage of osteogenic cells and their relationship to the stromal system. Peck WA (ed), editor. *Bone and Mineral Research* 3, 1-15. 1985 New York, Elsevier.
- Caplan AL. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res.* 1991; 9(5): 641-50.
- Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science.* 1999;284(5411):143-7.
- Bobis S, Jarocha D, Majka M. Mesenchymal stem cells: characteristics and clinical applications. *Folia Histochem Cytobiol.* 2006; 44 (4):215-30.
- Maximow A. Der lymphozyt als gemeinsame Stammzelle der verschiedenen Blutelemente in der embryonalen Entwicklung und im postfetalen Leben der Säugetiere. *Folia Haematol (Leipzig)* 1909;8:125-141
- Maximow A. Culture of blood leucocytes: from lymphocyte and monocyte to connective tissues. *Arch Exp Zellforsch* 1928;5: 169-268.
- Paul J. Establishment of permanent cell strains from human adult peripheral blood. *Nature.* 1958;182(4638):808.
- Allgöwer M, Hulliger L, Basel Md. Origin of fibroblasts from mononuclear blood cells: A study on *in vitro* formation of the collagen precursor, hydroxyproline, in buffy coat cultures. *Surgery* 1960;47:603-610.
- Stirling GA, Kakkar VV. Cells in the circulating blood capable of producing connective tissue. *Br J Exp Pathol.* 1969;50(1):51-5.

31. Friedenstein AJ, Piatetzky-Shapiro II, Petrakova KV. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *J Embryol Exp Morphol.* 1966 Dec;16(3):381-90.
 32. Luria EA, Panasyuk AF, Friedenstein AY. Fibroblast colony formation from monolayer cultures of blood cells. *Transfusion.* 1971;11(6):345-9.
 33. Fernández 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.
 34. Tondreau T, Meuleman N, Delforge A, Dejeneffe M, Leroy R, Massy M, *et al.* Mesenchymal stem cells derived from CD133-positive cells in mobilized peripheral blood and cord blood: proliferation, Oct4 expression, and plasticity. *Stem Cells.* 2005; 23(8):1105-12.
 35. Moosmann S, Hutter J, Moser C, Krombach F, Huss R. Milieu-adopted *in vitro* and *in vivo* differentiation of mesenchymal tissues derived from different adult human CD34-negative progenitor cell clones. *Cells Tissues Organs.* 2005;179(3):91-101.
 36. Wang Y, Johnsen HE, Mortensen S, Bindslev L, Ripa RS, Haack-Sørensen M, *et al.* Changes in circulating mesenchymal stem cells, stem cell homing factor, and vascular growth factors in patients with acute ST elevation myocardial infarction treated with primary percutaneous coronary intervention. *Heart.* 2006;92(6):768-74.
 37. 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.
 38. Khosla S, Eghbali-Fatourehchi GZ. Circulating cells with osteogenic potential. *Ann N Y Acad Sci.* 2006;1068:489-97.
 39. 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.
 40. Mansilla E, Marín GH, Drago H, Sturla F, Salas E, Gardiner C, *et al.* Bloodstream cells phenotypically identical to human mesenchymal bone marrow stem cells circulate in large amounts under the influence of acute large skin damage: new evidence for their use in regenerative medicine. *Transplant Proc.* 2006;38(3):967-9.
 41. Kuznetsov SA, Mankani MH, Gronthos S, Satomura K, Bianco P, Robey PG. Circulating skeletal stem cells. *J Cell Biol.* 2001;153 (5):1133-40.
 42. He Q, Wan C, Li G. Concise review: multipotent mesenchymal stromal cells in blood. *Stem Cells.* 2007;25(1):69-77.
 43. Oyama M, Tatlock A, Fukuta S, Kavalkovich K, Nishimura K, Johnstone B, *et al.* Retrovirally transduced bone marrow stromal cells isolated from a mouse model of human osteogenesis imperfecta (oim) persist in bone and retain the ability to form cartilage and bone after extended passaging. *Gene Ther.* 1999; 6(3):321-9.
 44. Shirley D, Marsh D, Jordan G, McQuaid S, Li G. Systemic recruitment of osteoblastic cells in fracture healing. *J Orthop Res.* 2005;23 (5):1013-21.
 45. Gregory CA, Prockop DJ, Spees JL. Non-hematopoietic bone marrow stem cells: molecular control of expansion and differentiation. *Exp Cell Res.* 2005;306(2):330-5.
 46. Lund TC, Tolar J, Orchard PJ. Granulocyte colony-stimulating factor mobilized CFU-F can be found in the peripheral blood but have limited expansion potential. *Haematologica.* 2008;93(6): 908-12.
 47. Tatsumi K, Otani H, Sato D, Enoki C, Iwasaka T, Imamura H, *et al.* Granulocyte-colony stimulating factor increases donor mesenchymal stem cells in bone marrow and their mobilization into peripheral circulation but does not repair dystrophic heart after bone marrow transplantation. *Circ J.* 2008;72(8):1351-8.
 48. Ripa RS, Haack-Sørensen M, Wang Y, Jørgensen E, Mortensen S, Bindslev L, *et al.* Bone marrow derived mesenchymal cell mobilization by granulocyte-colony stimulating factor after acute myocardial infarction: results from the Stem Cells in Myocardial Infarction (STEMMI) trial. *Circulation.* 2007.11;116(11 Suppl): 124-30.
- 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: 28/8/2008
Aceito: 26/9/2008