

CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS ADULTAS: CARACTERÍSTICAS E APLICAÇÕES EXPERIMENTAIS EM ANIMAIS

Saulo Tadeu Lemos Pinto Filho^{1*}
Tiago Luis Eilers Treichel¹
Jaime Sardá Aramburú Junior¹
Mauricio Borges da Rosa¹
Fabíola Dalmolin¹
Maurício Veloso Brun²
Alexandre Krause²
Ney Luis Pippi³

RESUMO

As células-tronco mesenquimais (CTMs) adultas são células-tronco somáticas presentes em pequenas quantidades em regiões perivasculares de todos os tecidos adultos, incluindo a medula óssea (MO), o tecido adiposo, o periósteo, o tecido muscular e os órgãos parenquimatosos. Por ser o tecido mais utilizado e caracterizado para o estudo das propriedades das células-tronco e por ter sido o primeiro empregado em terapia celular, a medula óssea é um dos principais tecidos para a obtenção de CTMs. Estudos contemporâneos vêm sendo realizados, descrevendo a utilização alógena e autógena das CTMs para a reparação de diversos tecidos. Além da terapia celular em animais domésticos, sua importância em Medicina Veterinária deve-se também à geração de modelos experimentais aplicáveis a paciente humanos. A presente revisão objetivou trazer as características e os usos atuais das CTMs adultas derivadas da MO, do tecido adiposo e polpa dentária, bem como os protocolos laboratoriais e experimentos *in vivo* desenvolvidos em um laboratório de cirurgia experimental visando a aplicação destas células em pacientes veterinários e a pesquisa translacional.

Palavras-chave: células multipotentes, cães, humanos, terapia celular.

ADULT MESENCHYMAL STEM CELLS: CHARACTERISTICS AND EXPERIMENTAL USE IN ANIMALS

ABSTRACT

The MSCs are defined as a subpopulation of somatic stem cells which are present in small amounts in perivascular regions of virtually all adult tissues, including bone marrow (BM), adipose tissue, periosteum, muscle and parenchymatous organs. Because BM is the most used and characterized tissue to define stem cells properties and for being the first in cell therapy, BM is one of the main sources for MSCs. Contemporary studies have been performed, describing the use of autologous and allogeneic MSC for tissue repair in different organs. In addition to cell therapy in domestic animals its application in veterinary medicine also provides the generation of experimental models for human diseases. This review aims to bring the features and current uses of MSCs derived from adult bones tissue, adipose tissue and dental pulp, as well as laboratory protocols and *in vivo* experiments developed in a laboratory

¹ Médico Veterinário, aluno do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária (PPGMV) da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). Rua João Batista da Cruz Jobim, 115/203, Bairro Medianeira, 97060-330, Santa Maria, RS, Brasil. Fone: 5599954161 saulovet2011@hotmail.com. *Autor para correspondência.

² Médico Veterinário, Doutor, Professor do Departamento de Clínica de Pequenos Animais (DCPA) e PPGMV da UFSM.

³ Médico Veterinário, PhD, Professor do DCPA e PPGMV da UFSM.

of experimental surgery aiming the application of these cells in veterinary patients and translational research.

Keywords: multipotent cells, dogs, human, cell therapy.

CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES ADULTAS: CARACTERÍSTICAS Y APLICACIONES EN ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

RESUMEN

Las células madre mesenquimales (CMM) son células madre somáticas adultas presentes en pequeñas cantidades en las regiones perivasculares de todos los tejidos adultos, incluyendo la médula ósea (MO), el tejido adiposo, el periostio, tejido muscular y los órganos parenquimatosos. Por su alta utilización y caracterización en el estudio de las propiedades de las células madre, así como por haber sido utilizada por primera vez para la terapia celular, la médula ósea es uno de los principales tejidos para la obtención de CMMs. Actualmente han sido realizados estudios, que describen el uso de CMM alogénicas y autólogas para la reparación de diversos tejidos. Además de la terapia celular en los animales domésticos, su importancia en medicina veterinaria se debe también a la generación de modelos experimentales. Esta revisión tiene como objetivo revisar las características y usos actuales de las CMM derivadas de la masa ósea de adultos, tejido adiposo y pulpa dental, así como los protocolos de laboratorio y experimentos in vivo desarrollados en un laboratorio de cirugía experimental. Estos protocolos están destinados al uso de CMMs en pacientes veterinarios y en investigación translacional.

Palabras clave: células multipotenciales, perros, humanos, terapia celular.

INTRODUÇÃO

As recentes descobertas sobre a biologia das células-tronco embrionárias (CTE) e somáticas (CTS), a descrição de novas fontes de células e a possibilidade de sua futura aplicação clínica tornam essas células uma promissora opção terapêutica para diversas enfermidades. O reconhecimento dessa importância culminou com a nomeação de dois pesquisadores, cujas descobertas revolucionaram a pesquisa em células-tronco, o prêmio Nobel em fisiologia e medicina de 2012 a Sir John B. Gurdon e Shinya Yamanaka. O Brasil possui legislação específica para a pesquisa e utilização terapêutica de células-tronco viabilizando estudos nesta área pelo financiamento de projetos em institutos de terapia celular e centros de excelência (1).

O conceito de células-tronco surgiu a partir de experimentos pioneiros realizados no início dos anos 1960 por Ernest A. McCulloch e James E. Till que observaram a presença de colônias hematopoiéticas no baço de camundongos irradiados e que haviam recebido transplante de medula. Essas colônias eram derivadas de uma única célula, a célula-tronco (2). Outros estudos, realizados nas décadas de 1970 e 1980 pelo grupo de pesquisa de Alexander Friedenstein ampliaram o potencial de uso das MSCs, demonstrando sua capacidade de auto-renovação e diferenciação (3). Na época, devido à semelhança morfológica com fibroblastos em cultura, foram denominadas unidades formadoras de colônia fibroblástica (UFC-F) (4). Nas décadas seguintes, extensas pesquisas foram desenvolvidas para desvendar o potencial terapêutico das MSCs (3).

As MSCs são definidas como uma população de células-tronco somáticas presentes em regiões perivasculares de todos os tecidos adultos, em pequenas quantidades, incluindo a MO, o tecido adiposo, o periosteio, o tecido muscular e órgãos parenquimatosos. A MO constitui

um dos principais sítios para a obtenção dessas células, assim como de células-tronco hematopoiéticas e endoteliais (5). Embora as células-tronco embrionárias e as de pluripotência induzida sejam as de maior potencial de diferenciação, existem várias limitações à sua utilização devido a seu comportamento biológico, considerações éticas e manipulação genética (6).

A capacidade de dar origem a diferentes tecidos, entretanto, não está restrita apenas às células-tronco embrionárias. Células isoladas de tecidos adultos (mesenquimal, hematopoiético e nervoso) podem dar origem a vários tipos de tecidos, como o pancreático, o hepático, o cardíaco e o nervoso. Acredita-se que essas células desempenhem um importante papel na regeneração após injúria (1,7). Assim, o transplante de células-tronco adultas representa uma promissora terapia para doenças como cirrose hepática, o *diabetes mellitus*, a doença de Alzheimer, a insuficiência cardíaca e o infarto agudo do miocárdio (8). Nesse contexto, se tornaram foco de numerosas pesquisas em todo o mundo por fornecer perspectivas clínicas promissoras (5).

A presente revisão objetivou trazer as características e os usos atuais das MSCs adultas derivadas da MO, do tecido adiposo e polpa dentária, bem como os protocolos laboratoriais e experimentos *in vivo* desenvolvidos em um laboratório de cirurgia experimental visando a aplicação destas células em pacientes veterinários.

Características das MSCs

Em cultura e condições adequadas de cultivo, as MSC exibem morfologia fibroblastoide (Figura 1) e são capazes de se diferenciar e dar origem a osteoblastos, condroblastos, hepatócitos, neurônios, células epiteliais, renais e cardíacas, dentre outras (5, 9). De acordo com resultados obtidos por diferentes grupos de pesquisa em CTMs, essas células devem apresentar o seguinte padrão fenotípico CD73+, CD90+, CD105+, CD45-, CD34-, CD14 ou CD11b-, CD79- ou CD19-, HLA-DR (10, 11).

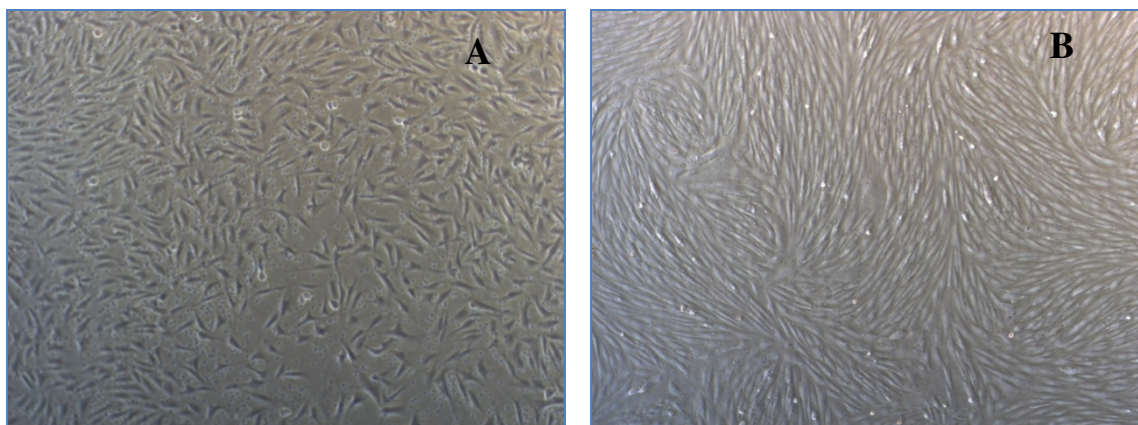


Figura 1. Cultura de MSCs adultas derivadas do tecido adiposo de coelhos. (A) células ao 5º dia de cultura e (B) células no 12º dia de cultura. Observar a característica fibroblastoide das MSCs. (Aumento de 50X)

As primeiras evidências do papel das MSCs sobre o sistema imune mostraram que a administração intravenosa delas em babuínos foi capaz de prolongar a sobrevivência de enxertos alogênicos de pele, de forma similar a potentes drogas imunossupressoras utilizadas rotineiramente na clínica (12). Além dos efeitos imunomoduladores, as MSCs expressam pequenas quantidades de complexo de histocompatibilidade principal (MHC-I) e níveis negligenciáveis de MHC-II e/ou não expressão MHC-II em sua superfície. Durante o processo

de seleção clonal positiva e negativa realizado pelas células de defesa do organismo (reconhecimento do próprio e do não-próprio) utiliza-se o MHC. Dessa forma, essas células seriam toleradas pelo organismo receptor. Também, o contato célula-célula faz com que as MSCs produzam diferentes tipos de fatores de crescimento solúveis, incluindo fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF), fator estimulador de colônias de macrófagos e granulócitos (GM-CSF), fator estimulador de crescimento de macrófago (M-CSF) e diversas interleucinas (IL-1,6,7,8,11,12,14,15), que influenciam fibroblastos e células granulocíticas envolvidas no processo de inflamação (5).

Foi observada ação imunomodulatória das CTMs *in vitro*, onde essas células alteraram o padrão de citocinas pelas células T *helper* e diminuição na liberação de mediadores como o fator de necrose tumoral (TNF) e interferon. Além disso, as MSCs inibem a proliferação de células T após estímulo por aloantígenos e agentes mitogênicos e impedem o desenvolvimento de linfócitos T citotóxicos. Essas ações poderiam interferir na modulação da inflamação, indução de tolerância, redução de complicações como a rejeição de alo-transplantes e a doença do enxerto versus hospedeiro (GVHD) em humanos (13). *In vivo*, as MSCs prolongaram a sobrevida de enxertos de pele e apresentaram vários efeitos imunomoduladores (14).

1. Células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea (BMSCs)

Nas três últimas décadas as BMSCs têm sido alvo de importantes pesquisas científicas em função das suas relevantes propriedades para o uso na terapia celular. Por exemplo, a sua grande habilidade de diferenciação em osteoblastos, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, levou a sua utilização clínica em estudos pilotos para distúrbios ósseos hereditários e deficiências osteogênicas. Já a habilidade dessas células em promover revascularização após injúria isquêmica levou à realização de estudos pré-clínicos em modelos animais de grande e pequeno porte com isquemia miocárdica (15).

Técnicas estudadas atualmente na engenharia de tecidos para a regeneração de bexiga constituem-se em promessa para a substituição parcial ou total do órgão em pacientes com bexiga neuropática, câncer, cistite intersticial, e outras doenças inflamatórias vesicais (16). Neste órgão, o interesse inicial centrou-se na regeneração dos tecidos, na esperança de permitir que a ampliação vesical autóloga contornasse os múltiplos problemas associados com a enterocistoplastia. No entanto, com maiores informações sobre a potencial diferenciação celular, a terapia genética bem sucedida e a progressão da imunomodulação, as possíveis aplicações das BSCs para enfermidades da bexiga podem ser ampliadas. Estudos demonstram que estas células poderão provir o desenvolvimento de enxertos vesicais, podendo diferenciar-se em urotélio e músculo liso (3).

O potencial das BMSCs semeadas em arcabouço biodegradável foi avaliado na regeneração da bexiga em modelo canino, comparando com o músculo liso em relação à capacidade de crescimento e contratilidade vesicais. Os pesquisadores concluíram que o arcabouço semeado demonstrou aparência celular histologicamente semelhante à do órgão original, bem como a contratilidade do músculo liso, afirmando que as BSCs podem servir como alternativa de fonte celular para a engenharia de tecidos urológica (17).

Na odontologia, o uso destas células também é bastante promissor. Cientistas afirmaram que os fatores de crescimento e outras proteínas secretadas pelas BSCs podem promover a regeneração do dente. O estudo combinou a utilização das BSCs com as células do germe dentário (DBC) do segundo molar não erupcionado semeadas em arcabouço e autotransplantadas em suínos. Os autores demonstraram que as DBCs combinadas com as da medula óssea em arcabouço adequado podem regenerar dentes nesse modelo. Além disso, o mesmo estudo também indicou que o fluido da medula óssea, pode promover a regeneração dentária. No entanto, questões que envolvem a determinação de forma, controle de tamanho e

erupção do dente precisam ser resolvidas. Conforme os autores, outros estudos deverão ser realizados para aperfeiçoar a erupção dental, podendo fornecer um novo tratamento para perda de dentes no futuro (18).

2. Células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo (ADSCs)

Em 2001 foi produzido um trabalho pioneiro, o qual afirmava conter MSC no lipoaspirado humano e que este poderia se tornar uma fonte alternativa às BSCs (19). Foi relatado que, a partir daí, deu-se início a uma série de pesquisas, em que inúmeros autores conseguiram desenvolver várias linhagens celulares a partir de ADSCs humanas e de modelos experimentais animais. Segundo o autor, a grande vantagem era que a captação do tecido doador de CT não acarretaria morbidade relevante (4).

Atualmente, o interesse pelas ADSCs tem aumentado muito na medicina, principalmente em função da facilidade de obter grandes quantidades destas células pelo processo de lipoaspiração, utilizando apenas anestesia local (11). Quando comparadas com as BSCs, as ADSCs são igualmente capazes de se diferenciar em células e tecidos de origem mesodérmica. Como o tecido adiposo humano está presente em muitas regiões, é de fácil obtenção em grandes quantidades sob anestesia local com pouco desconforto para o paciente, podendo se configurar como fonte alternativa de células-tronco para a regeneração dos tecidos mesenquimais e engenharia de tecidos (6).

Foram citados usos das ADSCs em humanos para reconstrução de maxila, em fístulas associadas ou não à doença de Crohn, em escaras de decúbito e na esclerose múltipla, entre outras. Os autores afirmaram que os diversos ensaios clínicos demonstraram que este tipo de terapia está se tornando realidade. Surpreendentemente, resultados sugerem que a eficiência das ADSCs na medicina regenerativa pode estar relacionada mais a sua capacidade de modular a imunidade e/ou inflamação do que para seus potenciais de diferenciação. A relevância fisiológica deste fenômeno precisa ser melhor documentada, condição que poderia trazer ganhos de eficiência e, talvez, novas possibilidades terapêuticas para estas células (11).

Relacionado ao uso em pele, afirmou-se que a administração tópica de ADSCs pode acelerar o processo de cicatrização da ferida cutânea. No estudo do autor, úlceras cutâneas crônicas quimicamente induzidas foram cobertas com esponja de colágeno tipo I associada à ADSCs, o que aumentou a granulação tecidual e densidade capilar quando comparado com a utilização da esponja de colágeno isolada (6).

Também foi testado o uso das ADSCs para reconstrução de bexiga, induzindo estas a diferenciação *in vitro* em músculo liso vesical e semeando-as em arcabouço tridimensional com o objetivo de verificar se as células iriam continuar a diferenciação e crescimento formando nova estrutura muscular vesical. Após a semeadura de 14 dias, o arcabouço cultivado foi implantado em fêmeas de ratos adultas atímicas, as quais haviam sofrido cistectomia com remoção de aproximadamente 50% da bexiga. O estudo concluiu que as ADSCs podem ser diferenciadas em músculo liso e semeadas em arcabouço vesical tridimensional, mantendo a expressão de marcadores moleculares de músculo liso. As ADSCs foram capazes de manter sua diferenciação em músculo liso e viabilidade *in vitro* e *in vivo* dentro da bexiga artificial. Os pesquisadores concluíram que a grande disponibilidade de ADSCs, combinado com a sua facilidade de obtenção e capacidade de se diferenciarem em músculo liso contrátil, faz da ADSC uma alternativa não-embriônica competitiva para a regeneração da bexiga e de outros tecidos que possuam músculo liso (20).

3. Células-tronco mesenquimais derivadas da polpa dentária (DPSCs)

Atualmente, as DPSCs estão sendo muito utilizadas na odontologia humana em função da facilidade de coleta, a qual está associada à baixa morbidade. A extração das células-tronco

do tecido pulpar é altamente eficiente, já que as mesmas possuem alta capacidade de diferenciação e boa interatividade com biomateriais, tornando-as ideais para reconstrução tecidual. Quando comparadas às BSCs, as DPSCs demonstraram melhor habilidade para diferenciação em tecidos calcificados, embora em diferentes linhagens. Verificou-se que após serem semeadas em arcabouço de hidroxiapatita, apresentaram diferenciação odontoblástica em vez de osteoblástica como as BSCs (21).

Após estudos aprofundados de cultura, histoquímica, microscopia eletrônica, RT-PCR, imunistoquímica e citometria de fluxo com DPSCs humanas, verificou-se que estas células possuem potencial proliferativo elevado, capacidade de auto-renovação e diferenciação em várias linhagens. Os autores afirmaram que estas células podem servir como modelo para o estudo da diferenciação de células-tronco adultas *in vitro* e regeneração de tecidos *in vivo* (22).

Com o objetivo de caracterizar as células-tronco isoladas da polpa dentária de dentes de cães (cDPSCs), a fim de definir ainda mais o cão como modelo animal para a endodontia regenerativa, pesquisadores isolaram CTMs de dentes pré-molares recém extraídos de Beagles de 10 meses de idade. As células isoladas foram investigadas para suas propriedades por meio de análise de suas características clonogênica e de seus crescimentos, pela expressão de marcadores de superfície e pela avaliação do seu potencial osteo/odontogênico, adipogênico e neurogênico. Os resultados deste estudo mostraram que as cDPSCs foram capazes de se diferenciar em linhagem odontoblástica funcional, com potencial de mineralização ativa *in vitro*. No entanto, a diferenciação morfológica em odontoblastos, condição que é importante para a secreção de matriz dentinal uniforme, não foi evidente *in vitro*. Foi demonstrado que a dentina existente é necessária para guiar as células-tronco no espaço do canal e proporcionar a diferenciação em células odontoblásticas *in vivo*. Além disso, cDPSCs apresentaram superioridade na taxa de proliferação e diferenciação sobre as células-tronco mesenquimais derivadas da MO humana (hBMMSCs). No entanto, os potenciais de diferenciação neurogênica e adipogênica foram inferiores quando comparadas com as células-tronco da polpa dentária de dentes humanos (hDPSCs). Em geral, os dados apresentados neste estudo apoiam a utilização das cDPSCs na engenharia de tecidos dentários e, ainda, estabelecem o cão como modelo adequado na pesquisa odontológica (23).

Outros autores também afirmaram que a criopreservação destas células pode ser alternativa para a manutenção em laboratório. Foi observado que após longo prazo de preservação em temperaturas de -80°C , osteoblastos diferenciados de DPSCs ainda são capazes de rapidamente reiniciar proliferação e produção de matriz mineralizada, de maneira semelhante a já demonstrada para células frescas. Além disso, a proliferação foi comparada à das células frescas, sem que ocorresse morte celular por apoptose (21).

Resultados de bancada

Extensos protocolos já foram descritos para cultivo de células-tronco em vários animais, incluindo seres humanos (3).

A coleta de gordura para processamento das MSCs derivadas do tecido adiposo (ADSCs) em coelhos, pode ser realizada pela ressecção da bolsa adiposa interescapular ou por lipoaspiração. Em nosso laboratório é utilizada a técnica de ressecção da bolsa adiposa interescapular, sendo esta bastante eficiente para a obtenção de material suficiente para processamento e cultivo. São coletadas 10 gramas de tecido adiposo que, após processado, gera, em média, 5×10^6 células, sendo estas após a quarta passagem (30 dias) aplicadas nos diferentes ensaios experimentais em animais. Em humanos, as pesquisas com isolamento das MSCs do tecido adiposo são mais comumente feitas com amostras obtidas de cirurgias de lipoaspiração. Nesse caso, esta é realizada de maneira seca, utilizando cânula reta de 20cm de comprimento, 3,5mm de diâmetro com três orifícios em linha e ponta romba (4).

A partir da obtenção da amostra, a individualização das células é obtida a partir de digestão enzimática com Colagenase tipo I, em agitação constante, a 37°C por 30 minutos. A solução é centrifugada para lavagem das células, que são colocadas em garrafas de cultivo celular, na concentração de 10^5 células/cm². Em uma variação de protocolo, a digestão é feita em placa de petri com uma solução de PBS e Colagenase tipo I a 0,075%. A amostra passa por repetidas centrifugações no processo de lavagem das células, que são colocadas nas garrafas de cultivo celular na concentração de 500mg de tecido adiposo/cm² (24). A lavagem das células é geralmente realizada com PBS (4, 24, 25). Em nosso laboratório utilizamos rotineiramente a solução de Hank's, sendo que não observamos diferença de eficiência quando utilizamos o PBS.

Torres (4), utilizando tecido adiposo de coelhos o tempo de digestão na colagenase foi de 60 minutos, enquanto Patricio (24), empregando tecido adiposo de cães, e Maciel (25), utilizando de gatos, foi de 30 minutos. O autor que utilizou tecido adiposo de coelhos não divulgou a viabilidade celular no seu trabalho, já os outros dois obtiveram 98% e 93%, respectivamente. No LATECER, o tempo utilizado para digestão por colagenase tipo II em tecido adiposo de cães e coelhos é de 25 minutos (Figura 2), já que a mesma é citotóxica e pode diminuir a viabilidade celular. No caso de células derivadas da polpa dentária de cães, o tempo deixado é de 60 minutos e a colagenase utilizada é a do tipo I. No caso da colagenase tipo II no tecido adiposo, é utilizada a proporção 1:3 (volume:volume) de tecido e enzima, já a do tipo I na polpa dentária é utilizada a proporção 1:5 (volume:volume). Logo após este tempo a neutralização é feita pela adição de meio de cultivo completo, em um volume de 1:1, obtendo-se, em média, 97% de viabilidade celular. Fadel (26), processando células derivadas do tecido adiposo de ovinos, utilizou protocolo de digestão enzimática com tripsina. Segundo o autor, o protocolo revelou quantidade de células esféricas, refringentes aderidas ao plástico da garrafa de cultura e após a primeira passagem as mesmas tornaram-se inviáveis. Para o meio de cultivo, a maioria dos autores utiliza Meio Essencial Mínimo modificado por Dulbecco, com 10% de soro fetal bovino (SFB). No processamento de tecido adiposo de cão utilizou-se 15% de SFB na mistura (24). Em nosso laboratório também é utilizado o mesmo tipo de meio, com baixa glicose e 10% de SFB, porém, a fim de obter melhor adaptação das células ao cultivo utiliza-se meio contendo 20% de SFB para as primeiras passagens, sendo que, após a terceira passagem passa-se a utilizar 10% de SFB.

Resultados in vivo

O número de pesquisas visando terapias reparativas utilizando células-tronco tem aumentado consideravelmente nos últimos anos, no Brasil e no mundo. Os resultados já estabelecidos e as possibilidades de sucesso estão gerando grandes expectativas entre a comunidade científica e a população leiga (1, 5). Diferentes pesquisas descrevem a utilização alógena e autógena das MSCs para a reparação de diversos tecidos. Importante campo de aplicação na Medicina Veterinária deve-se também à geração de modelos experimentais aplicáveis em pacientes humanos (5). As MSCs caninas, particularmente, também demonstraram potencial para uso em terapia celular, tanto em tecido ósseo como nos tecidos moles nesta espécie (9).

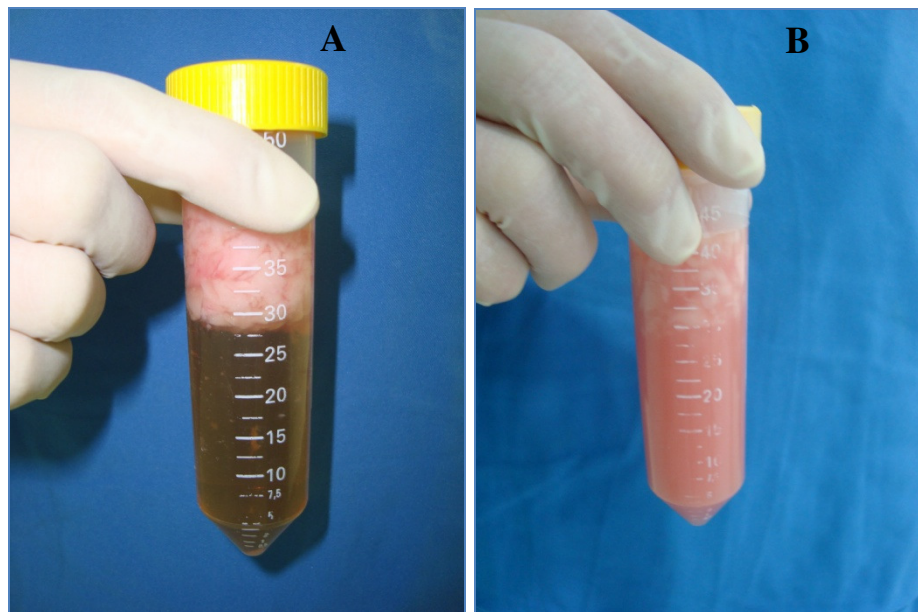


Figura 2. Digestão enzimática do tecido adiposo de coelhos. Tubo de polipropileno contendo fragmentos do tecido adiposo e collagenase tipo II antes (A) e após a digestão a 37°C pela collagenase tipo II apresentando aspecto leitoso (B).

Por muitos anos, a MO foi considerada a principal fonte de células-tronco para aplicações na engenharia de tecidos (27). Estas células possuem muitas propriedades, as quais promovem considerável potencial de utilização na terapia celular para várias doenças (15, 28). No entanto, um estudo em camundongos mostrou que as MSCs residem em praticamente todos os órgãos e tecidos, entre eles, cérebro, baço, fígado, rim, pulmão, medula óssea, músculo, timo, pâncreas (29). Devido à facilidade de colheita e da abundância, as ADSCs tornam-se atrativas, sendo prontamente disponíveis no indivíduo adulto e cada vez mais populares para uso nos diversos sistemas orgânicos (27).

Nosso grupo objetivou avaliar a capacidade de regeneração do nervo tibial de coelhos Nova Zelândia, mediante a associação da terapia celular com técnica de tubulização por prótese de silicone. A partir dos resultados obtidos, observou-se a diminuição significativa da presença de degeneração walleriana nos animais tratados, sendo possível concluir que o tratamento com células-tronco mononucleares (CM) autólogas de medula óssea apresenta vantagens no processo de regeneração do nervo periférico sob a técnica de tubulização com 30 dias de pós-operatório (30). A associação de células mesenquimais provenientes da medula óssea de cães, associada à hidroxiapatita sintética (HA) favoreceu a regeneração óssea em defeitos realizados no osso alveolar da mandíbula de cães. Quando comparada ao uso somente da HA, esse processo de regeneração ocorreu de forma mais rápida em defeitos preenchidos com o biomaterial associado às CM (31). Oliveira et al. (32) avaliaram a utilização de CM da MO, associadas ou não com proteína morfogenética (rhBMP-2) na cicatrização de defeito ósseo experimental como alternativa aos métodos convencionais, analisando-se o tempo de evolução cicatricial e a presença dessas células no tecido neoformado. O estudo concluiu que a terapia celular utilizada, isoladamente ou associada à rhBMP-2, induz à cicatrização óssea mais rápida da tíbia em defeitos experimentais de cães. Treichel et al. (33) avaliaram o efeito do transplante de fração total de CM da MO ou FVE do tecido adiposo associado à membrana celulósica em ferida cutânea experimental de coelhos. Ao final do período de avaliação, os grupos tratados apresentaram diferença estatística significativa da área da ferida em relação ao grupo controle e o grupo que recebeu a FVE do tecido adiposo apresentou o menor tempo de cicatrização da ferida. Pelo estabelecimento do

cultivo as células mesenquimais obtidas são congeladas em meio de congelamento constituído de DMSO a 10% em SFB e armazenadas a -80°C ou em nitrogênio líquido, possibilitando a formação de banco de células para posterior utilização. A viabilidade observada após o descongelamento pela exclusão do azul de trypan foi acima de 90%.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

As MSCs encontram-se atualmente como a nova promessa na terapia contra diversos tipos de doenças, sejam elas congênicas/hereditárias ou adquiridas, em animais e seres humanos. Os resultados obtidos de pesquisas realizadas, utilizando as frações totais de células da MO e TA, demonstram a possibilidade de utilização de células de diferentes tecidos, uma vez que essas células são passíveis de adaptação ao cultivo, expansão e armazenagem. A padronização de técnicas para o processamento, identificação e caracterização dessas células permitirá o desenvolvimento de ensaios clínicos de forma que seja possível definir com segurança suas indicações e eficácia em pacientes.

REFERÊNCIAS

1. Del Carlo RJ, Monteiro BS, Argolo Neto NM. Avanços no estudo de células-tronco no Brasil e suas implicações. *Rev Ceres*. 2009;56(4):446-50.
2. Till JE, McCulloch EA, Siminovitch L. A stochastic model of stem cell proliferation, based on the growth of spleen colony-forming cells. *Proc Natl Acad Sci*. 1964;51(1): 29-36.
3. Drzewiecki BA, Thomas JC, Tanaka ST. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells: current and future applications in the urinary bladder. *Stem Cells Int*. 2010 Jan 3;2010:765167. doi:10.4061/2010/765167.
4. Torres FC. Panículo adiposo interescapular de coelho da espécie *Oryctolagus cuniculus* como fonte de células-tronco [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2009.
5. Monteiro BS, Argolo Neto NM, Del Carlo RJ. Células-tronco mesenquimais. *Cienc Rural*. 2010;40(1):238-45.
6. Mizuno H. Adipose-derived stem cells for tissue repair and regeneration: ten years of research and a literature review. *J Nippon Med Sch*. 2009;76(2):56-66.
7. Bydlowski SP, Debes AA, Maselli LMF, Janz FL. Características biológicas das células-tronco mesenquimais. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2009;31(1):25-35.
8. Teixeira MW, Rezende CMF. Imunossupressão e transplantes: perspectivas atuais e futuras. *Medvep: Rev Cient Med Vet Pequenos Anim Anim Estim*. 2004;2(7):205-10.
9. Tharasanit T, Phutikanit N, Wangdee C, Soontornvipart K, Tantrajak S, Kaewamatawong T, et al. Differentiation potentials of canine bone marrow mesenchymal stem cells. *Thai J Vet Med*. 2011;41(1):79-86.
10. Smedo P, Costa MC, Cenedeze MA, Malheiros DMAC, Shimizu MHM, Seguro AC, et al. Papel imunossupressor e remodelador das células-tronco mesenquimais em um modelo experimental de doença renal crônica. *Einstein*. 2009;7(4):469-79.

11. Casteilla L, Benard VP, Laharrague P, Cousin B. Adipose-derived stromal cells: their identity and uses in clinical trials, an update. *World J Stem Cells*. 2011;3(4):25-33.
12. Silva CL. Estudos moleculares de células-tronco mesenquimais cultivadas in vitro [tese]. Rio de Janeiro: Instituto Nacional do Câncer; 2009.
13. Aggarwal S, Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell. *Blood*. 2005;105(4):1815-22.
14. Le Blanc K, Ringdén O. Immunomodulation by mesenchymal stem cells and clinical experience. *J Intern Med*. 2007;262(5):509-25.
15. Strem BM, Hicok KC, Zhu M, Wulur I, Alfonso Z, Schreiber RE, et al. Multipotential differentiation of adipose tissue-derived stem cells. *Keio J Med*. 2005;54(3):132-41.
16. Zhang Y, Kropp BP, Lin HK, Cowan R, Cheng EY. Bladder regeneration with cell-seeded small intestinal submucosa. *Tissue Eng*. 2004;10(1/2):181-7.
17. Zhang Y, Lin HK, Frimberger D, Epstein RB, Kropp BP. Growth of bone marrow stromal cells on small intestinal submucosa: an alternative cell source for tissue engineered bladder. *Bju Int*. 2005;96(7):1120-5.
18. Kuo T, Lin H, Yang K, Lin F, Chen M, Wu C, et al. Bone marrow combined with dental bud cells promotes tooth regeneration in miniature pig model. *Artif Organs*. 2010;35(2):113-21.
19. 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.
20. Jack GS, Zhang R, Lee M, Xu Y, Wu B, Rodríguez LV. Urinary bladder smooth muscle engineered from adipose stem cells and a three dimensional synthetic composite. *Biomaterials* 2009;30(19):3259-70.
21. D'aquino R, Papaccio G, Laino G, Graziano A. Dental pulp stem cells: a promising tool for bone regeneration. *Stem Cell Rev*. 2008;4(1):21-6.
22. Gronthos S, Brahim J, Li W, Fisher LW, Cherman N, Boyde A, et al. Stem cell properties of human dental pulp stem cells. *J Dent Res*. 2002;81(8):531-5.
23. Dissanayaka WL, Zhu X, Zhang C, Jin L. Characterization of dental pulp stem cells isolated from canine premolars. *J Endod*. 2011;37(8):1074-80.
24. Patricio LFL. Isolamento, cultivo e diferenciação de células-tronco mesenquimais de cães [dissertação]. Curitiba: Universidade Federal do Paraná; 2010.
25. Maciel BB. Isolamento, cultivo e caracterização de células-tronco mesenquimais da medula óssea e do tecido adiposo de gato [dissertação]. Curitiba: Universidade Federal do Paraná; 2010.

26. Fadel L. Caracterização morfológica das células-tronco mesenquimais de sangue umbilical e de tecido adiposo coletadas por via intra-abdominal e uterina em ovinos [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo; 2009.
27. Tapp H, Hanley Jr. EN, Patt JC, Gruber HE. Adipose-derived stem cells: characterization and current application in orthopaedic tissue repair. *Exp Biol Med.* 2009;234(1):1-9.
28. Seo MS, Jeong YH, Park JR, Park SB, Rho KH, Kim HS, et al. Isolation and characterization of canine umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells. *J Vet Sci.* 2009;10(3):181-7.
29. Meirelles LS, Chagastelles PC, Nardi NB. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J Cell Sci.* 2006;119:2204-13.
30. Colomé LM, Gomes C, Crosignani N, Paz AH, Lugo AA, Guimarães KM, et al. Utilização de células-tronco autólogas de medula óssea na regeneração do nervo tibial de coelhos mediante técnica de tubulização com prótese de silicone. *Cienc Rural.* 2008;38(9):2529-34.
31. Fontes EB. Hidroxiapatita sintética associada ou não à fração total de células mononucleares na regeneração de osso alveolar de cães [dissertação]. Santa Maria: Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria; 2009.
32. Oliveira GK, Raiser AG, Olsson D, Salbego FZ, Martins DB, Dezengrine R, et al. Células-tronco mononucleares autólogas e proteína óssea morfogenética na cicatrização de defeitos tibiais experimentalmente induzidos em cães. *Arq Bras Med Vet Zootec.* 2010;62(1):72-9.
33. Treichel TLE, Cunha MGMCM, Cunha JPCM, Santos Júnior EB, Leme Júnior PTO, Costa MM, et al. Transplante de fração total de células mononucleares ou fração vascular estromal associada à membrana celulósica em feridas cutâneas experimentais de coelhos. *Braz J Vet Res Anim Sci.* 2011;48(1):62-72.

Recebido em: 12/01/13

Aceito em: 13/02/13