



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA E FISIOLOGIA ANIMAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL TROPICAL**

ALVARO DEANGELLES PEREIRA FLORENTINO

**AVALIAÇÃO DA CICATRIZAÇÃO DA CARTILAGEM TROCLEAR POR MEIO
DE MICROSCOPIA DE LUZ EM RATOS (WISTAR) UTILIZANDO ENXERTOS
AUTÓLOGOS DO APÊNDICE XIFÓIDE, CARTILAGEM E OSSO SUBCONDRA**

**RECIFE
2018**

ALVARO DEANGELLES PEREIRA FLORENTINO

AVALIAÇÃO DA CICATRIZAÇÃO DA CARTILAGEM TROCLEAR POR MEIO DE
MICROSCOPIA DE LUZ EM RATOS (WISTAR) UTILIZANDO ENXERTOS
AUTÓLOGOS DO APÊNDICE XIFÓIDE, CARTILAGEM E OSSO SUBCONDRA

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós- Graduação em Ciência Animal Tropical, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal Tropical.

Orientador: Prof. Dr. Anísio Francisco Soares
Co-orientador: Prof. Dr. Marcelo Weinstein Teixeira

RECIFE
2018

ALVARO DEANGELLES PEREIRA FLORENTINO

AVALIAÇÃO DA CICATRIZAÇÃO DA CARTILAGEM TROCLEAR POR MEIO DE
MICROSCOPIA DE LUZ EM RATOS (WISTAR) UTILIZANDO ENXERTOS
AUTÓLOGOS DO APÊNDICE XIFÓIDE, CARTILAGEM E OSSO SUBCONDRAI

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós
- Graduação em Ciência Animal Tropical, como parte
dos requisitos para obtenção do título de Mestre em
Ciência Animal Tropical.

Aprovado em 8 de junho de 2018.

BANCA EXAMINADORA

Profº Drº Anísio Francisco Soares
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Profº Drº Fábio Naro
Università di Roma Sapienza/Itália

Profº Drº Marcelo Jorge Cavalcante de Sá
Universidade Federal de Campina Grande

Profº Drº Valdemiro Amaro da Silva Junior
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Por vezes, sentimos que aquilo que fazemos não é, senão, uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota.

Madre Teresa de Calcutá

AGRADECIMENTOS

A Deus pela sabedoria e por proporcionar tamanha experiência. Em especial, agradeço ao Prof. Anísio Soares, meu orientador, pelo acolhimento e confiança que sempre demonstrou ter por mim. Obrigado por tornar a minha primeira experiência em pesquisa tão agradável e rica em aprendizado. Ao Prof. Marcelo Teixeira, meu coorientador, pelas oportunidades, experiências e desafios.

Agradeço a família pela paciência, companheirismo e muito incentivo nos momentos difíceis à Marlene Pereira (mãe), Alvaro Ronaldo (pai), Marcos Fiorentino (irmão), Luiza Pereira (avó) e Maria Pereira (tia). Amigos: Antonia Lima, Lívia Brasileiro, Renata Alves, Pedro Henrique, Ricardo Alves, Erivan Martins, Lindoncharles Tenório, Adriano Vieira, Fabiana Souto, Manuela Torres, José Maria, Paulo Jorge, Alda Barra Nova, Anne Danielle, Herlan Tenório e Fábio Brandão pelo apoio nas horas de dificuldades e pelas palavras de incentivo durante todo o processo. Amigo de pós-graduação Efraim Naftali, pelo companheirismo e descontração.

Aos Professores, Alvaro Aguiar, Joaquim Evêncio, pelo apoio e parceria com os seus respectivos laboratórios de Histologia, em especial, ao carinho, dedicação, todos os ensinamentos de técnicas laboratoriais e imenso apoio da Técnica de Laboratório, Maria Edna.

Ao Prof. Valdemiro Junior, pela disponibilidade em ajudar na avaliação histopatológica e por ter contribuído muito com a pesquisa.

A toda equipe do Biotério do departamento de Morfologia e Fisiologia Animal/DMFA, Renata Carneiro e Marcos André pelos conselhos e disponibilidade de ajuda quando precisei. Ao Veterinário Thaygo Marçal, pelo apoio, disponibilidade em ajudar durante todo o procedimento cirúrgico e contribuição com a pesquisa.

Ao Antonio Graziano e Fabio Naro, representantes da Human Brain Wave, pela colaboração técnica e relevante contribuição com o desenvolvimento da pesquisa.

Bolsistas de Iniciação Científica, Priscila Paula, Diego Nascimento, Caroline Leite e Luiza Almeida, pelos trabalhos desenvolvidos e pela assistência nos experimentos.

A Universidade Federal Rural de Pernambuco, pelas oportunidades, espaços de convivência e locais de estudo a que me foram cedidos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal Tropical por todo suporte fornecido e a Comissão de Aperfeiçoamento de Pessoal do Nível Superior – CAPES, por financiar o projeto e o andamento dos experimentos.

RESUMO

Este estudo objetivou avaliar a eficácia da utilização de células-tronco mesenquimais autólogas em joelho de ratos *Wistar albinus*, obtidas por meio do sistema RIGENERA® (um desagregador de tecido biológico, que em combinação exclusiva com dispositivos RIGENERACONS®, constituídos por um recipiente de plástico, hélice de desagregação e grelha de 30µ e 50µ para a filtração do composto desintegrado obtido). Foram padronizados defeitos de 2,5 e/ou 3mm³ no joelho direito e esquerdo de ratos machos, divididos em dois grupos. Cada animal recebeu tratamento com células-tronco no joelho esquerdo, sendo o joelho direito mantido sem tratamento, sendo o controle exercido pelo membro contralateral. Os grupos foram divididos pela origem das CTMs implantadas no joelho esquerdo de todos os animais. As CTMs do Grupo 1, foram extraídas do tecido ósseo da lesão provocada no membro controle do animal. Para os animais do Grupo 2, as CTMs foram extraídas de uma parte do apêndice xifóide do próprio animal. Os animais foram eutanasiados de acordo com o período de acompanhamento pós-cirúrgico pré-estipulado (60 dias), em continuidade as peças ósseas foram descalcificadas e coradas para análise histológica. Para a avaliação histológica, resultados demonstram que em lesões agudas de cicatrização rápida o emprego de CTMs favoreceu a formação de um tecido cartilaginoso interposto entre tecido ósseo esponjoso e compacto, bem como, tecido cartilaginoso neoformado em área de tecido ósseo compacto. A cartilagem hialina se manteve presente nos dois grupos. Sendo esta uma característica bastante relevante para o trabalho, já que, é um comportamento atípico em ratos velhos, porém, serão necessários outros estudos, inclusive comparando o potencial dessas células extraídas pelo Sistema Rigenera® para que se possa num futuro próximo, utilizar esses protocolos em bioengenharia de tecido ósseo e cartilaginoso em outras espécies animais.

Palavras-chave: Células-tronco mesenquimais. Terapia celular. RIGENERA®. Transplante autólogo.

ABSTRACT

This study aimed to evaluate the efficacy of autologous mesenchymal stem cells in the knee of Wistar albinus rats obtained through the RIGENERA® system (a biological tissue disintegrator, which in combination with RIGENERACONS® devices, consisting of a plastic container, disintegration propeller and grid of 30µ and 50µ for the filtration of the obtained disintegrated compound). Defects of 2.5 and / or 3mm³ were standardized in the right and left knee of male rats, divided into two groups. Each animal was treated with stem cells in the left knee, the right knee being maintained untreated, and control was exerted by the contralateral limb. The groups were divided by the origin of MTCs implanted in the left knee of all animals. Group 1 CTMs were extracted to bone tissue from the lesion caused in the control limb of the animal. For the Group 2 animals, the MSCs were extracted from a part of the animal's own appendix xyloid. The animals were euthanized according to the pre-stipulated post-surgical follow-up period (60 days), in continuity the bone pieces were decalcified and stained for histological analysis. For the histological evaluation, results demonstrate that in chronic lesions the use of CTMs favored the formation of a cartilaginous tissue interposed between spongy and compact bone tissue, as well as, new cartilaginous tissue in an area of compact bone tissue. Hyaline cartilage remained in both groups. being this a very relevant feature for the work, since it is an atypical behavior in old rats, however, it will be necessary other studies, including comparing the potential of these cells extracted by the Rigenera® System so that in the near future, to use these protocols in bioengineering of bone tissue in other animal species.

Keywords: Mesenchymal Stem Cells. Cell Therapy. RIGENERA®. Autologous transplantation.

LISTA DE ILUSTRÇÕES

Figura 1	Desagregador de tecido biológico Rigenera.....	34
Figura 2	RIGENERACONS [®] , constituídos por um recipiente de plástico, hélice de desagregação e grelha de 30 μ e 50 μ	34
Figura 3	Procedimentos pré-cirúrgicos.....	36
Figura 4	Extração de fragmento do apêndice xifóide e Exposição do apêndice xifóide.....	37
Figura 5	Defeito ósseo de 2,5 mm ³ no joelho esquerdo.....	38
Figura 6	Animal em recuperação após transplante de células-tronco.....	38
Figura 7	Rigeneracon [®] com tecido cartilaginoso presente no interior do dispositivo.....	40
Figura 8	Técnica de Extração Celular.....	40
Figura 8	Aspiração da suspensão celular.....	43
Figura 9	Momento do transplante autólogo de CTMs no joelho esquerdo do animal.....	41
Figura 10	Fêmur do animal 7.....	42
Figura 11	Joelho do animal 6.....	43
Figura 12	Fêmur de Rato Wistar G1, desmineralizado. Hematoxilina-eosina (HE).....	46
Figura 13	Fêmur de Rato Wistar G2. Hematoxilina-eosina (HE).....	48
Quadro 1	Tratamento com CTM.....	33

LISTA DE ABREVIATURAS

A5MD	Animal cinco, membro direito
A5ME	Animal cinco, membro esquerdo
ADSC	Adipose derived stem cell
A10MD	Animal dez, membro direito
A10ME	Animal dez, membro esquerdo
A2MD	Animal dois, membro direito
A2ME	Animal dois, membro esquerdo
A12MD	Animal doze, membro direito
A12ME	Animal doze, membro esquerdo
A9MD	Animal nove, membro direito
A9ME	Animal nove, membro esquerdo
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
A8MD	Animal oito, membro direito
A8ME	Animal oito, membro esquerdo
A11MD	Animal onze, membro direito
A11ME	Animal onze, membro esquerdo
AOS	Atividade osteoblástica
A4MD	Animal quatro, membro direito
A4ME	Animal quatro, membro esquerdo
A6MD	Animal seis, membro direito
A6ME	Animal seis, membro esquerdo
A7MD	Animal sete, membro direito
A7ME	Animal sete, membro esquerdo
A3MD	Animal três, membro direito
A3ME	Animal três, membro esquerdo
A1MD	Animal um, membro direito
A1ME	Animal um, membro esquerdo
BMSC	Bone marrow stromal cells
BR-1	Primeira linhagem de célula-tronco embrionárias humana no Brasil
CAT	Câmara Técnica de Terapia Celular
CD	Cluster of differentiation;

CEUA/UFRPE	Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal Rural de Pernambuco
CFU-F	Unidade formadora de colônia de fibroblastos
CO ₂	Dioxido de carbono
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
CT	Célula-tronco
CTE	Célula-tronco embrionária
CTH	Célula-tronco hematopoiética
CTM	Célula-tronco mesenquimal
DAD	Doença articular degenerativa
G2	Grupo 2 (dois)
GETO	Gerência de Tecidos, Células e Órgãos
G1	Grupo 1 (um)
HE	Hematoxilina de Harris/ Eosina Alcoolica
HIAE	Hospital Israelita Albert Einstein
HV/UFRPE	Hospital Veterinário da Universidade Federal Rural de Pernambuco
IGF	Fator de crescimento derivado de insulina
IL	Interleucina
INCA	Instituto Nacional do Câncer
INF	Infiltrado
iPS	Induced pluripotent stem cells
ISCT	International Society for Cellular Therapy
J/J	Transplante autólogo de joelho/joelho
MSC	Mesenchymal Stem Cell
NEO	Neoformação óssea
(SC)/BID	(Subcutaneous)/ bis in die
(SC)/SID	(Subcutaneous)/ semel in die
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
pH	Potencial hidrogeniônico
RCE	Reação do tipo corpo estranho
REDE BRASILCORD	Rede Nacional de Bancos de Sangue de Cordão
REDOME	Registro Nacional de Doadores de Medula Óssea
RO	Reconstituição óssea
SITC	Sociedade International de Terapia Celular

SUS	Sistema Único de Saúde
TCF	Tecido conjuntivo fibroso;
UFRPE	Universidade Federal Rural de Pernambuco
UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas
VAS	Vascularização
X/J	Transplante autólogo de apêndice xifóide/joelho

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1	TERAPIA CELULAR.....	17
2.2	TERAPIA CELULAR NA MEDICINA VETERINÁRIA CELULAR.....	17
2.3	TERAPIA CELULAR: NOVAS PERSPECTIVAS NA BIOTECNOLOGIA.....	19
2.4	O BRASIL E A TERAPIA CELULAR VETERINÁRIA.....	19
2.5	LIMITAÇÕES ÉTICA.....	21
2.6	SISTEMA RIGENERA®.....	22
2.7	DIFERENCIAÇÃO CELULAR.....	23
2.8	CÉLULAS-TRONCO: DEFINIÇÃO E CLASSIFICAÇÃO.....	23
2.9	CÉLULAS-TRONCO ADULTAS: PLASTICIDADE CELULAR.....	24
2.10	CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS: CARACERÍSTICAS E POTENCIAL DE DIFERENCIAÇÃO.....	25
2.11	CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS: DIFERENCIAÇÃO EM OSTEOBLASTOS.....	26
2.12	REGENERAÇÃO ÓSSEA.....	27
2.13	CARACTERÍSTICAS DE REPARAÇÃO ARTICULAR.....	27
2.14	CÉLULAS-TRONCO PARA REPARO DE LESÕES ARTICULARES.....	29
3	OBJETIVOS	31
3.1	OBJETIVO GERAL.....	31
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	31
4	MATERIAL E MÉTODO	32
4.1	RESPALDO ÉTICO DA PESQUISA.....	32
4.2	MODELO ANIMAL.....	32
4.3	ORGANIZAÇÃO DOS GRUPOS.....	33
4.4	EQUIPAMENTOS.....	33
4.5	MATERIAL DE CONSUMO.....	35
4.6	ESPAÇO FÍSICO.....	35
4.7	PROCEDIMENTO CIRÚRGICO.....	35
4.8	PROCEDIMENTO RIGENERA.....	39
4.9	EUTANÁSIA E OBTENÇÃO DA AMOSTRA TECIDUAL.....	41
4.10	PROCEDIMENTO LABORATORIAL.....	41

4.11 ANÁLISE HISTOLÓGICA.....	43
4.12 CAPTAÇÃO DE IMAGENS.....	43
4.13 TRATAMENTO ESTATÍSTICO.....	43
5 RESULTADOS.....	45
5.1 ASPECTOS GERAIS – GRUPO I: TRANSPLANTE AUTÓLOGO DE CTMS JOELHO/JOELHO.....	45
5.1.1 Membro direito (controle)	45
5.1.2 Membro esquerdo (transplante de CTMS)	45
5.2 ASPECTOS GERAIS – GRUPO 2: TRANSPLANTE AUTÓLOGO DE CTMS APÊNDICE XIFÓIDE/JOELHO.....	47
5.2.1 Membro direito (controle)	47
5.2.2 Membro esquerdo (transplante de CTMS)	47
6 DISCUSSÃO.....	49
7 CONCLUSÃO.....	52
REFERÊNCIAS.....	53

1 INTRODUÇÃO

As células-tronco (CTs) também conhecidas como células primordiais, células-mãe ou “stem cells” são indiferenciadas e com características multipotentes (DALMONI et al., 2013).

Atualmente, as CTs estão sendo alvo de grande interesse na terapia celular, com perspectivas inovadoras, por possuírem capacidade de autorenovação, autoproliferação, diferenciação em linhagens celulares especializadas e regeneração tecidual (OLIVEIRA et al., 2010). Estas características tornam essas células uma promissora opção terapêutica para diversas enfermidades, tal como perda tecidual por causas diversas (tumores, traumas, etc.) (VISCONDI et al., 2013). Neste aspecto, espera-se que elas ocupem um importante papel na terapia de doenças consideradas, atualmente, incuráveis.

As células adultas são conhecidas como mesenquimais ou células estromais e são frequentemente isoladas de aspirados de medula óssea. A sua grande habilidade de diferenciação em osteoblastos, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, levou à utilização clínica destas células em estudos pilotos para desordens ósseas hereditárias e deficiências osteogênicas (MONTEIRO et al., 2012).

A perda tecidual decorrente de traumas ou lesões de naturezas diversas, sempre foi um desafio para os cirurgiões. Desde épocas remotas, a procura por técnicas que possam incrementar o processo fisiológico de recuperação do tecido ósseo e articular tem sido uma constante entre pesquisadores e cirurgiões. A busca do entendimento dos fenômenos relativos ao padrão de formação tecidual tem sido perseguida por décadas, sendo fonte de avanços significativos ou grandes frustrações. (RIPAMONTI et al., 2009).

As CTs têm sido utilizadas amplamente na reparação de tecidos e órgãos isoladamente ou associadas à biomateriais (GIACCONE et al., 2014). Um dos fatores limitantes para a sua utilização é a necessidade de se expandir o número de células, por meio de cultivo celular, antes de se utilizar nos pacientes, o que pode demandar semanas, dependendo da quantidade de células pretendida. Isto ocorre devido à quantidade de células-tronco encontradas nas amostras de tecidos colhidos serem insuficientes para a recuperação morfológica e funcional dos tecidos e órgãos afetados (GIACCONE et al., 2014). Tal situação tem levado à necessidade de realização de dois procedimentos no mesmo paciente, o primeiro para colheita de tecido e o segundo para a transposição das células-tronco para o leito receptor.

Pesquisas utilizando-se de células-tronco mesenquimais (CTM) adultas vêm se tornando cada vez mais populares em função da facilidade de acesso e abundância de tais células, e por não envolverem questões éticas tal qual como os ensaios com células-tronco

embrionárias (CTE). Experimentos recentes têm demonstrado resultados promissores de regeneração do tecido cartilaginoso, ensejando a perspectiva de que terapias celulares em doenças ósseas e articulares poderão se beneficiar com o progresso dos ensaios in vivo e in vitro com CTMs dotadas de potencial para diferenciação em cartilagem (BURASTERO et al., 2010).

Apesar das evidências preliminarmente encontradas de que o sistema Rigenera[®] é capaz de separar células mesenquimais a partir de pequenas amostras de tecido humano (GRAZIANO et al., 2013), nada ainda foi feito para avaliar a sua eficácia em animais. Considerando, ser o rato uma espécie alvo de inúmeras pesquisas, quer seja para uso espécie-específico ou translacional como modelo experimental para humanos (CHU et al., 2010), se faz conveniente que se realizem estudos in vitro e in vivo nesta espécie.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 TERAPIA CELULAR

As primeiras observações acerca das células-tronco datam de meados do século XIX. Em 1968 foi realizado, nos Estados Unidos, o primeiro transplante de medula óssea com sucesso (GATTI et al., 1968).

Na década de 1970, após experimentos, as células de carcinoma embrionário passaram a ser exploradas como modelos de desenvolvimento de embriões de camundongos (RODRIGUES, 2006). Destaca-se, contudo, que somente em 1998 James Thomson da University of Wisconsin–Madison conseguiu isolar as primeiras CT pluripotentes do interior da massa celular de blastocistos humanos, com posterior cultivo e estabelecimento de linhagens (THOMSON et al., 1998).

No ano 2000, pesquisadores do Karolinska Institutet (Suécia), liderado por Jonas Frisen, concluíram que células-tronco neurais de camundongos adultos possuíam capacidade generalizada de diferenciação. Com isto, poderiam gerar, quando injetadas em embriões de galinha e camundongo, qualquer tipo celular, de um músculo cardíaco até células do tecido estomacal, intestino, fígado e rim (CLARKE et al., 2000). Toda esta evolução a cerca da terapia celular faz com que, desde o século XX, os genes estejam situados entre os atores biotecnológicos privilegiados no que concerne à produção de valor do homem, por ser considerados repositórios de potencialidades humanas (ZORZANELLI et al., 2017).

2.2 TERAPIA CELULAR NA MEDICINA VETERINÁRIA

Atualmente, com o avanço do conhecimento e das técnicas moleculares, a ciência conseguiu gerar informações importantes para o diagnóstico e tratamento de algumas doenças, causadas em animais, sem tratamento. Dentre essas temos a osteoartrite, lesão renal, lesões tendíneas, aplasia de medula e lesões ligamentares (GRECO, 2007). Vale ressaltar que essa é uma das tecnologias na área da medicina veterinária e tem como objetivo substituir células, tecidos lesados ou perdidos para restaurar sua função (FUCHS; SEGRE, 2000).

Inicialmente, os trabalhos envolvendo animais como ratos e camundongos foram realizados, principalmente, com objetivo de utilizar um modelo animal para pesquisas com humanos, como os trabalhos de BARROS et al. (2001) que utilizaram células-tronco na reparação de falhas experimentais em rádio de coelhos, e de ARGÔLO NETO (2009) e

MONTEIRO (2009) que utilizaram culturas de CTMs marcadas pela proteína fluorescente verde (GFP) em aplicações autógenas *in situ*, no tratamento de lesões epiteliais de pacientes diabéticos e de lesões ósseas na calota craniana, demonstrando cicatrização das feridas cutâneas em camundongos diabéticos e reparação de defeitos ósseos críticos, respectivamente.

Estudos envolvendo diferentes doenças vêm sendo realizados por diferentes instituições em diversos países. Os dados têm comprovado a segurança e eficácia terapêutica da utilização das CTMs em animais (ratos, coelhos e cães) acometidos por lesões tendíneas (GEBUREK, 2017), osteoartrites (HARMAN, 2016; KRISTON-PÁI, 2017), lesões medulares (KIM, 2015, 2016), seqüela neurológica de cinomose (BRITO, 2010), 4 lesões na córnea (MORIYAMA, 2014), aplasia medular (GATTI, 2014; SANTOS, 2017), asma (TRZIL et al., 2015), lesões cutâneas (KIM, 2013), e complexo gengivite estomatite felina (ARZI, 2016, 2017; ASSIS, 2017) e úlceras (ALAMOUDI, 2014; ALY, 2014).

No contexto dos estudos científicos, a terapia celular tem apresentando resultados extremamente relevantes no âmbito na medicina veterinária. No que tange ao tratamento de doenças, resultados promissores vêm sendo obtidos como no caso da hemofilia (DU, 2013), retinite pigmentosa (MOWAT, 2017), distrofia muscular (KODIPPILI, 2017), câncer (FINOCCHIARO, 2017) e diabetes (JAÉN, 2017).

As pesquisas em Medicina Veterinária têm utilizado felinos, caninos, equinos, ovinos e caprinos. Em gatos, MARTIN et al. (2002) realizaram o isolamento e caracterização de CTMs provenientes de amostras da medula óssea. Estudos realizados com cães isolaram estas células da medula óssea (CSAKI et al., 2007), tecido adiposo e medula óssea (Silveira et al., 2009) e do cordão umbilical (LEE et al., 2013). Em equinos já foi comprovado o isolamento deste tipo celular em tecido adiposo (CARVALHO et al., 2009), cordão umbilical (REED & JONHSON, 2012), e medula óssea (Seo et al., 2012), sendo realizadas diversas pesquisas voltadas para o uso de células-tronco na reparação de lesões como de tendões, articulações e ligamentos (PACINI et al., 2007; GODWIN et al., 2012; SOLE et al., 2012; FERRIS et al., 2013). Isolamento de células-tronco também foram realizados em ratos (KADIYALA et al., 1997^a; LENNON & CAPLAN, 2006), camundongos (BITTENCOURT et al., 2006; YAMAMOTO et al., 2007; SUNG et al., 2008), ovinos, sendo utilizadas amostra de tecido adiposo e em tecido adiposo e fluido amniótico de caprinos (REN et al., 2012; PRATHEESH et al., 2013).

O sucesso da terapia celular alcançado por meio de testes realizados em cães, gatos, coelhos e principalmente ratos, tem comprovando sua segurança e eficácia terapêutica. Tal fato propicia uma contribuição relevante para esta nova abordagem terapêutica em humanos,

uma vez que dados obtidos em cães e gatos podem ser utilizados como estudos pré-clínicos para diversos distúrbios genéticos que acometem os humanos (GURDA, 2017).

2.3 TERAPIA CELULAR: NOVAS PERSPECTIVAS NA BIOTECNOLOGIA

A manipulação das células e tecidos (bioengenharia tecidual) se insere na base do setor de Medicina Regenerativa. Neste setor já figuram os dispositivos médicos, as próteses, as moléculas de baixa e alta complexidade, os biomateriais ou matrizes de proliferação celular e a terapia celular. (CRUZ et al., 2012, p. 185).

A terapia celular é uma “Nova Indústria”, inserida no macro-setor da Biotecnologia. Sua origem se deve ao sucesso obtido em ensaios clínicos e ao avanço na compreensão dos mecanismos pelos quais as células e os tecidos podem ser manipulados no laboratório, formulados, diferenciados, associados e, enfim aplicados em pacientes de modo a exercerem efeitos regenerativos para patologias com pouca ou nenhuma opção terapêutica viável. (QUEVEDO et al., 2009).

Há mais de 20 anos, as pesquisas relativas à “terapia baseada em células” têm curado pacientes e resultado em produtos (KEMP, 2006). Os resultados animadores tratam também da associação de células expandidas em laboratório às matrizes especiais, de modo, a melhorar a enxertia. (WEY et al., 2009). Entretanto, assim como em outras inovações tecnológicas, alguns estudos demonstram o limite de técnicas de terapia celular (MORETTI et al., 2010). As agências reguladoras têm se preocupado em garantir que os produtos oriundos de células e tecidos sejam adequadamente testados quanto a segurança e eficácia (KESSLER et al., 1993).

O grande desafio hoje é desenvolver um produto inovador, como os de terapia celular. Em escala e em caráter comercial dentro de uma indústria altamente regulada (fármacos e saúde) e que movimenta bilhões de dólares anualmente. Outro desafio também é conceituar esse novo segmento. O público em geral tende a acreditar que as células-tronco podem curar tudo, e a imprensa, raramente desmente esta ideia. Ainda mais grave, o turismo médico de células-tronco não regulamentado, corre o risco de atrapalhar negócios legítimos (LINDOVALL et al., 2009).

2.4 O BRASIL E A TERAPIA CELULAR

O Brasil faz parte da rede de pesquisas de forma ativa ao longo dos anos. Na América

Latina sendo pioneiro, tendo realizado em 1979 o primeiro transplante de medula óssea no país (DÓRO; PASQUINI, 2000).

Em 2001 foi inaugurado o Primeiro Banco Privado de Células de Sangue de Cordão Umbilical e Placentário do Brasil, para uso autólogo. Para Aragão e Bezerra (2012, p. 13), “esta data é marcante nas pesquisas com células-tronco no Brasil, por meio da criação dos Institutos do Milênio”. Enfatizam também “a importância desta data que é refletida pela implementação dos recursos direcionados às pesquisas”. Fomentando o “início às investigações de bioengenharia tecidual, com a finalidade de desenvolver pesquisas a nível pré-clínico (com animais) no tratamento de doenças degenerativas do sistema cardiovascular, do sistema nervoso, dos ossos e das cartilagens”.

No Brasil, o Instituto Nacional do Câncer (INCA) foi pioneiro na criação de um banco público de sangue de cordão em 2001. Segundo o site do INCA, hoje a capacidade deste banco é de três mil unidades de sangue de cordão, que deve ser expandida até dez mil amostras. (PEREIRA, 2008).

Em 2003 foram realizados estudos clínicos utilizando CT em cardiologia, nos quais 21 pacientes foram tratados por esta metodologia, que se baseava na injeção de células-tronco oriundas da medula óssea (CARVALHO, 2005).

Em 2004, foi criada pelo Ministério da Saúde uma rede nacional de bancos de sangue de cordão (Rede BrasilCord), composta inicialmente pelo INCA, Hospital Israelita Albert Einstein (HIAE), Hemocentro de Ribeirão Preto e UNICAMP (PEREIRA, 2008). Seu objetivo era facilitar as chances de localização de doadores para os pacientes que necessitassem de transplante de medula óssea (SILVA et al., 2009).

A Rede BrasilCord realiza tanto pesquisas pré-clínicas quanto clínicas, sendo estas atividades: o transplante de células- -tronco hematopoiéticas (medula óssea e outros precursores hematopoiéticos) e estabelece os critérios técnicos de indicação desses transplantes, reguladas pela Portaria nº 931 de Maio de 2006 da ANVISA (BRASIL, 2006). Atualizada com a inclusão no Regulamento Técnico do Sistema Nacional de Transplantes e compatibiliza na Tabela de Procedimentos, Medicamentos, Órteses, Próteses, e Matérias Especiais do SUS a indicação de transplante mieloablativo alogênico aparentado e não aparentado de células-tronco hematopoiéticas, para tratamento da mucopolissacaridose dos tipos I e II e amplia a faixa etária para indicação de transplante meloablativo alogênico aparentado para tratamento de doença falciforme (BRASIL, 2018).

Ainda, em 2012, foi designada a Câmara Técnica de Terapias Celulares (CAT), instância vinculada à Gerência de Tecidos, Células e Órgãos (GETO) da Agência Nacional de

Vigilância Sanitária (ANVISA) – órgão federal de competência regulatória sobre as pesquisas com CTs – com a finalidade de assessorar a diretoria colegiada da ANVISA na elaboração de normas e medidas na área da terapia celular (BRASIL, 2012).

A instituição da CAT segue o modelo da União Europeia, que criou um comitê semelhante há cerca de cinco anos, com vistas à uniformização de práticas, informações e regulações. O foco está, portanto, no estabelecimento de determinações objetivas que possam contemplar a multiplicidade de visões e opiniões, em um campo atravessado por demandas individuais e coletivas, interesses públicos e privados. Trata-se, pois, de novas modalidades da biopolítica na contemporaneidade, permeadas pela intensificação das relações entre ciência, mercado e Estado (ROSE, 2013).

É fato o valor das pesquisas brasileiras e, podem-se destacar como marcos dos últimos anos dois avanços ocorridos em 2008: a produção da primeira linhagem de células- -tronco embrionárias humanas no Brasil (batizada de BR1) e a produção da primeira linhagem de CT obtidas sem o uso de embriões - CT pluripotentes induzidas (ou células iPS - do inglês Induced pluripotent stem cells) (LEITE, 2009).

BR-1: produzida a partir de embriões recolhidos de clínicas particulares de fertilização, tornou o Brasil independente da necessidade de importação de culturas primárias de CTE, facilitando o desenvolvimento de novas pesquisas no país. A BR-1 foi avaliada, comparando-se a amostras obtidas do Registro Nacional de Doadores de Medula Óssea (Redome), que possui um banco de dados com registros de mais de um milhão de pessoas oferecendo, assim, uma boa idéia da variabilidade genética no país (FRAGA et al., 2011).

2.5 LIMITAÇÕES ÉTICAS

Em 1978 foi aceita a Lei que autoriza a prática da reprodução assistida por meio da produção de embriões in vitro. Durante esses 30 anos, esta prática médica tem gerado embriões humanos que não são utilizados para fins reprodutivos e acabam sendo descartados ou, quando congelados, permanecem esquecidos e sem utilidade (PEREIRA, 2008). O prazo máximo de armazenamento desses pré-embriões nas clínicas de fertilização é de no máximo cinco anos após o início do congelamento, pois passado esse “prazo de validade”, estipulado pelo Relatório Warnock, admitiu-se que essas células não estariam mais adequadas para o implante intra-uterino. (PRANKE, 2004). Apesar disso, já houve casos como o de Vinícius que desafiou este tempo. Ele nasceu após oito anos de congelamento num tanque de nitrogênio líquido. Nos Estados Unidos, registra-se o nascimento de Laina Beasley em 2005,

depois de 13 anos de congelamento (ALVES, 2008).

Apesar da existência de muito material disponível, estes embriões congelados não podiam ser utilizados nas pesquisas em terapia celular. Depois de muito debate, em março de 2005, foi sancionada a Lei de Biossegurança, número 11.105/05 (BRASIL, 2005), que permite que embriões congelados há mais de três anos sejam utilizados, desde que os pais estejam cientes dessa doação e concordem com sua utilização.

Outro ponto discutido em torno do uso dessas células é a clonagem terapêutica (transferência nuclear), que consiste na fusão de uma célula somática de um indivíduo adulto com um óvulo sem núcleo, gerando assim um blastocisto com as características genéticas do doador da célula somática, do mesmo modo como é realizada a técnica de clonar um indivíduo (clonagem reprodutiva), porém sem a implantação do novo embrião ao útero (SOUZA; ELIAS, 2005).

Mais do que uma questão científica, religiosa ou política, essa é uma questão filosófica. É óbvio que os cientistas dos diversos países que realizam pesquisas com blastocistos não acreditam que estão destruindo vidas, pois seu objetivo é justamente salvar vidas. Ao lado dessa discussão filosófica, focando o aspecto científico, a possibilidade de pesquisa e uso clínico das CTE a partir de blastocistos, pode ser a única chance de salvar a vida de inúmeros pacientes que sofrem de doenças incuráveis e que vêm nessas pesquisas a única esperança de sobrevivida (PRANKE, 2004).

2.6 SISTEMA RIGENERA®

Alternativamente, o uso de células-tronco mesenquimais (MSCs) foram propostos, com base na sua diferenciação multi-linhagem e propriedades imunomoduladoras. Na verdade, essas células podem se diferenciar em células de tecido específico hepático para reparar uma área danificada ou exercer uma terapia efeito através de ações paracrinas (OTTO et al., 2011). Recentemente, foi desenvolvido um novo dispositivo médico chamado Rigeneracons (Human Brain Wave, Itália) que permite obter em alguns minutos, micro-enxertos autólogos de tamanho médio de 50 micrômetros em ordem, alegando maximizar sua atividade biológica minimizando a morte celular.

Este dispositivo descartável é apenas um desruptor de tecidos biológicos mecânico, capaz de desagregar pequenas amostras de tecidos conjuntivos humanos usando uma grade fornecida por lâminas hexagonais e células filtrantes e componentes da matriz extracelular. Este método deve permitir aumentar a presença de progenitor viável e células estéreis dentro

dos micro-enxertos, capazes de serem usadas para reparação de tecidos, como recentemente relatado em trabalhos anteriores (GIACCONE et al., 2014).

2.7 DIFERENCIAÇÃO CELULAR

Com o avanço dos métodos de diagnóstico em doenças crônicas e degenerativas, houve um consequente crescimento nos estudos que visam terapias e tratamentos inovadores. Dentro desse novo contexto, a utilização das células-tronco (CTs) tem sido alvo de grande interesse da comunidade científica e uma possível esperança para melhoria da qualidade de vida para as mais diversas afecções de diversas espécies (NARDI; MEIRELLES 2006).

Vários campos da pesquisa clínica têm oferecido à comunidade científica expectativas promissoras da indicação e correta aplicação da terapia com células-tronco. Na medicina regenerativa estes resultados têm abrangência em várias áreas ampliando consideravelmente a fronteira da terapia regenerativa convencional (HUANG et al. 2015).

Segundo Genser (2013), “pode-se definir a diferenciação celular como o processo pelo qual se originam as diferenças entre as células de um indivíduo, caracterizada pela especialização gradual das células em termos estruturais e funcionais”.

2.8 CÉLULAS-TRONCO: DEFINIÇÃO E CLASSIFICAÇÃO

Células-tronco são definidas como células indiferenciadas com grande capacidade de auto-renovação e de produzir pelo menos um tipo celular altamente especializado. Existem duas categorias de células-tronco: as células-tronco embrionárias pluripotentes e a linhagem de células unipotentes ou multipotentes, denominadas células-tronco adultas, que residem em tecidos diferenciados (ODORICO, 2001). A maior vantagem do uso de células-tronco embrionárias é a sua capacidade de proliferação e de diferenciação em diversos tipos celulares.

As células-tronco são distintas no tocante à origem e ao potencial de diferenciação. O embrião humano, até a fase de mórula (terceiro dia de desenvolvimento), é composto de células totipotentes, isto é, cada uma pode gerar um novo embrião. Retiradas da massa celular interna de blastocistos (quinto dia de desenvolvimento), as células-tronco embrionárias não geram novo embrião, mas formam qualquer tipo de tecido, isto é, são pluripotentes (CARVALHO, 2001).

As células-tronco adultas são consideradas multi ou pluripotentes, isto é, são capazes

de se diferenciar em mais de um tipo celular, mas não em todos. Hoje, sabe-se que as células-tronco adultas estão presentes nos mais diversos sítios do organismo, tais como medula óssea, sangue, cordão umbilical, córnea, retina, fígado, pele, trato gastrointestinal, pâncreas e dentes (SLACK, 2000). Essas células apresentam a vantagem de ser autogênicas, assim como são responsivas aos fatores de crescimento inerentes ao hospedeiro, o que permite sua proliferação e diferenciação em determinado tipo celular. (SLACK, 2000).

As células-tronco adultas ainda podem ser classificadas em células-tronco hematopoiéticas (CTH) ou mesenquimais (CTM) (NADIG, 2009). As CTH podem ser obtidas da medula óssea, do cordão umbilical e do sangue periférico, sendo responsáveis pela renovação de todo sistema sanguíneo e imunológico (MEIRELLES, 2006).

As células multipotentes podem se diferenciar em alguns tipos celulares dentro de um determinado órgão. Células-tronco oligopotentes podem originar poucos tipos celulares especializados (ZHANG et al., 2006).

2.9 CÉLULAS-TRONCO ADULTAS: PLASTICIDADE CELULAR

As MSC caracterizam-se por ser uma população de células multipotentes capazes de se diferenciar e produzir qualquer tipo celular necessário num processo de reparação, como osteoblastos, condroblastos, hepatócitos, neurônios, células epiteliais, renais, cardíacas, dentre outras (PITTENGER et al., 1999). Tais características de plasticidade sugerem que esse tipo celular é o responsável pelo turnover e pela manutenção de todos os tecidos do organismo (CAPLAN, 2009). Elas tornaram-se foco de inúmeras pesquisas em todo o mundo por fornecer perspectivas clínicas promissoras para a terapia celular.

Outro mecanismo de diferenciação celular proposto é a fusão. Acredita-se que as MSC podem fusionar-se a uma célula adulta-alvo, assumindo o padrão de expressão gênica da célula adulta a qual se uniu. A fusão celular é um fenômeno biológico amplamente conhecido, ocorrendo principalmente nas células cuja poliploidia (dois ou mais conjuntos de cromossomos) é comumente vista, como em hepatócitos e células musculares esqueléticas (HERZOG et al., 2003; MEIRELLES et al., 2006).

Além disso, as MSC secretam uma grande variedade de quimiocinas, além de expressar receptores para citocinas e fatores de crescimento. Dessa forma, as MSC interagem com as células residentes (nicho) e podem induzi-las, por mecanismo parácrino, a se diferenciar em linhagens celulares distintas, de acordo com essa sinalização (TAKAHASHI et al., 2007).

2.10 CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS: CARACERÍSTICAS E POTENCIAL DE DIFERENCIAÇÃO

Dentre os diversos tipos de células-tronco adultas, as células-tronco mesenquimais (CTM) compõem um grupo que vem despertando particular interesse.

Segundo Minguell, Erices e Conget (2001): “A multipotencialidade, bem como a facilidade de isolamento e sua expansão *in vitro* tornam as células-tronco mesenquimais uma alternativa terapêutica atrativa com um amplo espectro de aplicações clínicas no contexto de terapia celular.”

As CTMs são consideradas células multipotentes não hematopóéticas com propriedades de autorrenovação e capacidade de diferenciação em tecidos mesenquimais e, talvez, não mesenquimais (ALDAHMAH et al., 2012).

Há mais de 30 anos, Friedenstein et al. (1968) fizeram o primeiro relato de evidências de células parecidas com fibroblastos que podiam ser isoladas da medula óssea por meio de aderência ao plástico em culturas. Descreveram uma população de células precursoras estromais multipotentes, fusiformes e clonogênicas em condições de cultura, e a definiram como uma unidade formadora de colônia de fibroblastos (CFU-F). Mais recentemente, o Comitê de Células-Tronco Mesenquimais e de Tecidos da International Society for Cellular Therapy [Sociedade Internacional para Terapia Celular] propôs critérios mínimos para caracterizar as CTMs humanas (DOMICINI, 2006).

Em 2005, a sociedade internacional para terapia celular (ISCT – International Society for Cellular Therapy) propôs uma nova nomenclatura para designar a população de células fibroblastoides que crescem aderentes ao plástico, isoladas dos mais diversos tecidos e com capacidade de diferenciação multipotencial *in vitro*: células mesenquimais estromais multipotentes. A sigla CTM (MSC – do inglês, Mesenchymal Stem Cell) pode ser utilizada para estas situações, mas deve ser corretamente identificada (HORWITZ et al., 2005).

As CTM foram denominadas células estromais mesenquimatosas multipotentes de acordo com a Sociedade Internacional de Terapia Celular (SITC) (HORWITZ et al., 2005). A SITC também propôs critérios mínimos para a definição de CTM em seres humanos: (1) devem ser aderentes ao plástico quando mantidos em condições padrão de cultura; (2) devem expressar (CD – Cluster of differentiation) CD105, CD73 e CD90 e não devem expressar as moléculas de superfície CD34, CD45, CD14 ou CD11b, CD79a ou CD19 α e HLA-DR; (3) devem diferenciar *in vitro* em osteoblastos, condroblastos e adipócitos (DOMINICI et al.,

2006).

Ainda de acordo com a ISCT, uma determinada população de células será classificada como célula-tronco mesenquimal quando apresentar três características-chave. A primeira é que as mesmas sejam isoladas com base nas suas propriedades de adesão seletiva à superfície do material onde são cultivadas (geralmente plástica); a segunda é a expressão de determinados antígenos de membrana e, por fim, que as células possam ser diferenciadas em tecido ósseo, gorduroso e cartilaginoso após estímulo (HORWITZ et al., 2005). Contudo, a real identidade desta célula e a sua correlação com as CTMs expandidas in vitro ainda necessitam ser definidas. No ser humano, a medula óssea é a fonte mais conhecida de CTM, mas também já foram isoladas de outros órgãos e tecidos, tais como tecido muscular esquelético e derme (YOUNG et al., 2001), tecido adiposo (ZUK et al., 2001), membrana sinovial (DE BARI et al., 2001), endotélio da veia umbilical (COVAS et al., 2003) e da veia safena (COVAS et al., 2005), rim (ALMEIDA et al., 2002), sangue de cordão umbilical e placentário (LEE et al., 2004), medula óssea (AHRENS et al., 2004), cartilagem articular (ALSALAMEH et al., 2004), ligamento periodontal (SEO et al., 2004) e pulmão (SABATINI et al., 2005).

2.11 CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS: DIFERENCIAÇÃO EM OSTEOLASTOS

A formação óssea dá-se através da ossificação intra-membranosa e ossificação endocondral. A ossificação intra-membranosa produz osteoblastos diretamente da condensação mesenquimal e ocorre em todos os ossos craniofaciais e na parte lateral das clavículas. Já na ossificação endocondral, as células mesenquimais diferenciam-se, primeiro, em condrócitos, formando um molde de cartilagem ocorrendo nos ossos longos dos membros superiores e inferiores, da região basal do esqueleto, das vértebras, costelas e parte medial das clavículas.

O osso possui uma estrutura de proteínas fortalecida por fosfato de cálcio, além de uma grande capacidade regenerativa, na qual todo o processo de formação ocorre a partir de uma integração biológica de processos bioquímicos, celulares e hormonais continuamente facilitados por um estado de deposição, reabsorção e remodelação óssea. Existem três parâmetros fundamentais na engenharia tecidual óssea que vão determinar à capacidade de osteoindução, presença de sinais osteoindutores solúveis, a viabilidade das células-tronco mesenquimais indiferenciadas em responder, ter a capacidade de se diferenciarem em células formadoras de osso além da produção de matriz extracelular adequada.

Quatro estágios na maturação destas células são definidos de acordo com critérios morfológicos e histoquímicos: pré-osteoblasto, osteoblasto, osteócito e células de revestimento ósseo (AUBIN, 1998).

2.12 REGENERAÇÃO ÓSSEA

O sistema ósseo-articular (sistema esquelético) é composto por ossos e articulações. Apresenta funções de proteção para órgãos vitais e para o canal raquidiano, proporciona a sustentação e ancoragem de músculos, além de alta atividade metabólica servindo de reserva de diversos íons, principalmente o cálcio e fosfato, liberando-os de maneira controlada na corrente sanguínea para manter a homeostase (TORTORA et al., 2010)

O tecido ósseo é um tecido dinâmico que está em constante remodelamento através de um processo de reabsorção e síntese mediada por osteoclastos e osteoblastos; respectivamente (BAR-SHAVIT, 2008).

Os procedimentos clínicos para o tratamento das fraturas ósseas devem se basear não só na localização da lesão, mas também na necessidade e idade de cada paciente (HOLZAPFEL et al., 2013). Atualmente, o padrão ou regeneração óssea para a reconstrução óssea são os transplantes autólogos, os quais utilizam sítios doadores do próprio paciente como, por exemplo, a crista ilíaca, costelas, calvária, tibia, entre outros. Este método fornece três elementos essenciais: um substrato osteocondutor, fatores osteoindutores e células osteogênicas (ABUKAWA et al., 2006).

A escolha da melhor abordagem ainda é muito controversa. Enquanto as técnicas baseadas em fatores de crescimento podem disponibilizar imediatamente estes fatores no sítio a ser regenerado, sua eficiência é altamente dependente do pool de células osteogênicas endógenas, as quais podem estar comprometidas devido a uma variedade de doenças ou pela idade do paciente. Além disto, são necessárias várias aplicações de fatores de crescimento em concentrações otimizadas de acordo com cada etapa da vida de regeneração (ROUWKEMA et al., 2008)

2.13 CARACTERÍSTICAS DE REPARAÇÃO ARTICULAR

A cartilagem articular é um tecido conjuntivo responsivo a cargas, e sua função mecânica envolve não somente a transmissão da carga compressiva da articulação para o osso subcondral, mas também fornece uma interface de baixo atrito entre as superfícies articulares

(WALDMAN et al., 2003). A matriz apresenta baixa celularidade e elevada concentração de água que se liga às moléculas de proteoglicanos sintetizadas pelos condrócitos, e juntamente com o colágeno tipo II mantêm a rigidez e elasticidade do tecido (GRODZINSKY, 2000; REZENDE, 2000). Como não possui vascularização, a nutrição do tecido cartilaginoso da superfície articular é feita por difusão de substâncias encontradas no líquido sinovial como glicose, aminoácidos, colágeno tipo IV e hialuronato (LOMBELLO et al, 2003; TODHUNTER; JOHNSTON, 2003).

Situações adversas ao ambiente articular como infecção, inflamação, imobilização articular prolongada e trauma podem causar lesões que evoluem para a doença articular degenerativa (DAD). As lesões limitadas à superfície cartilaginosa não atingem o osso subcondral e iniciam-se com a condromalácia, caracterizada pela depleção dos proteoglicanos que conduz ao colapso da estrutura de sustentação de colágeno, seguida da fibrilação cartilaginosa vista como separação da cartilagem articular ao longo das fibras colágenas (TRIPPEL; MANKIN, 1994).

Devido à perda de resistência do tecido, o quadro evolui para a formação de erosões, que surgem nas áreas de maior pressão, e expõem o osso subcondral. Esse, por sua vez, responde à lesão por elevação de sua densidade e estimula a formação de osteófitos a partir do perióstio periarticular. Na tentativa de reduzir o atrito gerado com as lesões, a membrana sinovial responde de forma a elevar a produção de líquido. A elevação do derrame articular gera um grau de instabilidade que é compensada pela hipertrofia da cápsula articular e formação de calcificações ao longo das inserções dos tecidos moles periarticulares denominadas entesófitos (TRIPPEL; MANKIN, 1994).

Nas lesões superficiais da cartilagem articular o processo de reparação não segue uma resposta inflamatória padrão, já que os vasos sanguíneos e as células inflamatórias não atingem a área lesionada (HULSE; JOHNSON, 2007). Dessa forma, condrócitos próximos a lesão multiplicam-se e sintetizam nova matriz para preencher a falha com tecido semelhante à cartilagem hialina. Entretanto, essa resposta é cessada a partir de uma semana após a lesão porque os condrócitos que margeiam a área lesionada entram em apoptose e o tecido neoformado se desprende do tecido sadio (TRIPPEL; MANKIN, 1994).

Por outro lado, as lesões que atingem o osso subcondral formam um hematoma que lança na superfície articular diversos leucócitos, células mesenquimais e constituintes do plasma ricos em fatores condrogênicos como o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e o fator de crescimento semelhante à insulina (IGF) (SCHMIDT et al., 2006). Após a formação do hematoma, segue-se o modelamento da malha de fibrina que constitui um

arcabouço para fibroblastos que ocupam a área lesionada. Cerca de 15 dias após a lesão, o tecido fibroso sofre hialinização devido a diferenciação das células mesenquimais em condroblastos, e assim o tecido passa a apresentar aspecto fibrocartilaginoso (SOUSA; DEL CARLO, 2000).

A presença de glicosaminoglicanos carregados negativamente, fibras de colágeno tipo II e moléculas de elastina faz com que a matriz cartilaginosa aprisione grande quantidade de água (TODHUNTER, 2003). Devido a isso, a cartilagem hialina apresenta características biomecânicas que permitem a deformação do tecido após aplicação de carga e consequente restauração morfológica quando essa é suprimida. Tal característica, denominada resiliência, não é observada no tecido fibrocartilaginoso porque ocorrem alterações na composição da matriz que modificam o arranjo estrutural e consequentemente reduzem a capacidade de absorção de energia cinética que é transferida diretamente ao osso subcondral (GRODZINSKY, 2000; REZENDE, 2000).

2.14 CÉLULAS-TRONCO PARA REPARO DE LESÕES ARTICULARES

Experimentos realizados com uso de condrócitos autólogos em artrite reumatoide demonstram que após 24 semanas ocorre perda das características morfológicas e biomecânicas do tecido formado. Acredita-se que a crônica presença de agentes inflamatórios e citocinas como IL-1 e IL-6 nessas articulações tenham papel importante para a falha do implante, fato não ocorrido quando se utilizam células-tronco mesenquimais (MSCs) (JORGENSEN et al., 2001). MSCs apresentam grande capacidade de diferenciação em osso, cartilagem, tecido adiposo e músculo. São comumente obtidas da medula óssea (BMSCs) ou do tecido adiposo (ADSCs). Entretanto, o uso das ADSCs apresenta maiores vantagens, já que essas possuem maior potencial angiogênico e proliferativo que as BMSCs. O tecido adiposo possui maior quantidade de MSCs que a medula óssea e os processos de colheita e separação celular são de simples execução. Após remoção de um fragmento de tecido adiposo do paciente, esse é levado ao laboratório para que as ADSCs sejam extraídas por digestão enzimática e incubadas em meio de cultura por 15-20 dias para que ocorra a expansão celular (PAES, 2008).

No âmbito das doenças e afecções articulares na medicina veterinária, são relatados trabalhos que destacam papel das CTM, principalmente relacionada a OA, em diversas espécies: cães (BLACK et al., 2007, 2008), equinos (SEO et al., 2013) caprinos (MURPHY et al., 2003), ovinos (KANDEL et al., 2006) coelho (DESANDO et al., 2013) porco da índia

(SATO et al., 2012) e camundongo (DIEKMAN et al., 2013).

Resultados preliminares demonstram que em lesões agudas de cicatrização rápida o emprego de MSCs favorece a formação de um tecido cartilaginoso sem fibrilação e com características biomecânicas semelhante à cartilagem hialina. Embora o emprego de condrócitos autólogos apresente resultados satisfatórios em lesões articulares de origem traumática, o uso das MSCs vem ditando novas perspectivas para o reparo de extensas lesões não-traumáticas de caráter crônico como a artrite reumatoide (JORGENSEN et al., 2001). Uma explicação para esses resultados reside na capacidade imunomoduladora das células tronco que inibem a ação de linfócitos na área lesionada (NARDI; MEIRELES, 2006).

Muitos estudos de revisões foram feitos objetivando organizar um levantamento de estudos de dados que comprovem e demonstrem a capacidade das CTMs como forma de terapia celular. Filardo et al. (2016) realizou revisões na base de dados do PubMed, no período de (2000 a 2015) e (2002 a 2016) respectivamente, onde foram selecionados estudos que usaram CTM para o tratamento de afecções na cartilagem. Dos 1639 trabalhos encontrados por Filardo et al. (2016), 60 foram relacionados. Desses, 20 usaram MO-CTM e 17 ADCTM.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a eficácia da utilização de células-tronco mesenquimais autólogas em joelho de ratos Wistar, obtidas por meio do sistema Rigenera[®].

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

-Estudar a colheita e processamento de células-tronco mesenquimais obtidas do joelho e apêndice xifóide de ratos da linhagem Wistar.

-Avaliar a eficácia do sistema Rigenera[®] para o isolamento de células-tronco mesenquimais, provenientes do joelho e do apêndice xifóide de ratos da linhagem Wistar.

-Avaliar histologicamente o processo de reparo de defeitos articulares, após a utilização de células-tronco mesenquimais autólogas em joelho de ratos Wistar, obtidas por meio do sistema Rigenera[®].

4 MATERIAL E MÉTODO

4.1 RESPALDO ÉTICO DA PESQUISA

O presente estudo foi realizado depois de ser submetido e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais, da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) e encontra-se, ainda, em conformidade com a Lei Federal 11.794, de 08 de outubro de 2008, que regulamenta procedimentos para o uso científico de animais.

4.2 MODELO ANIMAL

Foram selecionados 12 ratos machos albinos (*Rattus norvegicus*, variedade, *Wistar*), adultos, clinicamente saudáveis, com variação entre 300g e 350g. Todos os animais foram obtidos do Biotério da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) e alojados, durante o experimento, na sala de criação do mesmo biotério.

O tamanho da amostra configurada no presente estudo foi baseado na literatura científica correlata; o número de animais deve ser estritamente compatível com o respeito às questões bioéticas, bem como com a necessidade de resultados confiáveis do ponto de vista de significância estatística.

Clinicamente, uma vez apresentado deiscência de sutura, exposição da lesão ou indícios de processo infeccioso, o animal seria excluído e substituído. Histologicamente seriam excluídas as amostras nas quais houvesse perda durante o processo, do material testado.

Os animais foram acondicionados em gaiolas plásticas apropriadas com capacidade para 5 animais, forradas com maravalha no biotério da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), sob iluminação e temperatura controladas (ciclo claro-escuro de 12 horas e aproximadamente 24°C), ração e água *ad libitum*. Todas as gaiolas receberam marcação (etiqueta padrão do biotério) específica contendo identificação do grupo e subgrupo do animal, registrando-se ainda as datas de nascimento, cirurgia/sacrifício do mesmo. Após o procedimento cirúrgico os animais foram acompanhados diariamente e tiveram suas gaiolas substituídas a cada intervalo de 48 horas. O estudo seguiu as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e com devida aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal Rural de Pernambuco (CEUA/UFRPE).

4.3 ORGANIZAÇÃO DOS GRUPOS

Os ratos foram divididos em dois grupos, cada animal recebeu tratamento com células-tronco no joelho esquerdo, sendo o joelho direito mantido sem tratamento, sendo o controle exercido pelo membro contralateral. Os grupos foram divididos pela origem das CTMs implantadas no joelho esquerdo de todos os animais. As CTMs do Grupo 1, foram extraídas do tecido ósseo da lesão provocada no membro controle do animal. Para os animais do Grupo 2, as CTMs foram extraídas de uma parte do apêndice xifóide do próprio animal. .

Os ratos (n = 12) foram aleatoriamente divididos em dois grupos iguais, conforme quadro a seguir:

Quadro 1 – Tratamento com CTM.

GRUPOS	DESCRIÇÃO	POPULAÇÃO
Grupo – 1 J/J	Transplante autólogo com CTMs - Joelho/Joelho (eutanásia após 60 dias)	06
Grupo – 2 X/J	Transplante autólogo com CTMs – Apêndice xifóide/Joelho (eutanásia após 60 dias)	06

Fonte: Florentino (2018).

4.4 EQUIPAMENTOS

Para a confecção dos defeitos ósseos, foram utilizados o Punch descartável 3 e 2,5 mm, Paramount[®]. Dispositivo estéril de uso único constituído de cabo cilíndrico de Policarbonato com 17 cm, lâmina cilíndrica em Aço Inoxidável do tipo SUS 304 e tampa protetora da lâmina em Polietileno de Baixa Densidade; E o Punch dermatológico 3 e 2,5mm. Material confeccionado em Aço Inox. Material Autoclavável. Instrumento Cirúrgico Não Articulado Não Cortante - Rhosse[®].

Para a digitalização das imagens foi utilizado o sistema fotográfico, composto de microscópio e câmera acoplada, conjuntamente ao software. As fotomicrografias foram organizadas de modo a facilitar todo o processo de análise histológica.

Para a extração de células-tronco mesenquimais foi utilizado o desagregador de tecido biológico RIGENERA[®] (Figura 1), que foi utilizado em combinação exclusiva com

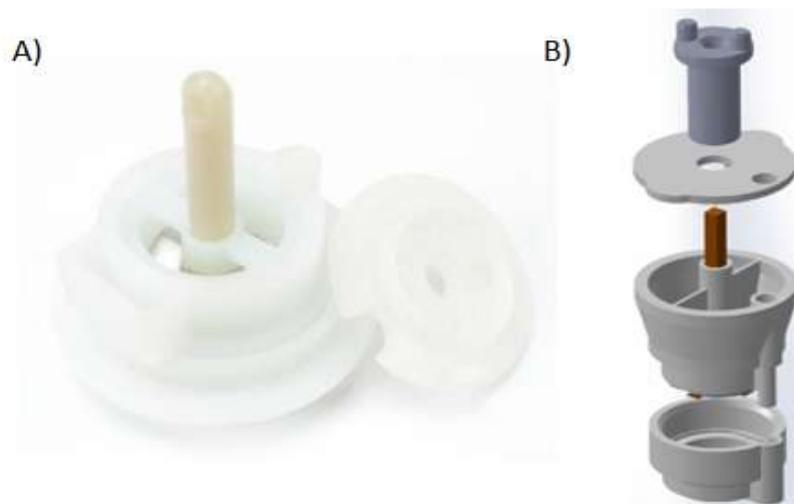
dispositivos RIGENERACONS® (Figura 2), constituídos por um recipiente de plástico, hélice de desagregação e grelha de 30 μ e 50 μ para a filtração do composto desintegrado obtido.

Figura 1 - A) Desagregador de tecido biológico Rigenera®, parte frontal; B) Desagregador de tecido biológico Rigenera®, parte lateral; C) Desagregador de tecido biológico Rigenera®, parte traseira.



Fonte: Graziano (2013)

Figura 2 - A) RIGENERACONS®, constituídos por um recipiente de plástico, hélice de desagregação e grelha de 30 μ e 50 μ para a filtração do composto desintegrado obtido. B) Imagem do RIGENERACONS® desmontado.



Fonte: Graziano (2013)

4.5 MATERIAL DE CONSUMO

Para a viabilização dos procedimentos cirúrgicos e sacrificais dos espécimes, bem como manutenção das condições de assepsia e antissepsia, requereu-se o uso de luvas cirúrgicas e de procedimentos, compressas de gaze, soro fisiológico, álcool etílico a 70%, seringas descartáveis de 1ml, 5ml e 10ml, agulhas, lâminas de bisturi nº 15, fios de sutura 3-0, máscaras e gorros descartáveis, campos cirúrgicos e campos fenestrados.

4.6 ESPAÇO FÍSICO

A manipulação dos animais – cirurgias, manutenção e eutanásia – foram realizadas na sala de procedimento cirúrgico do Biotério da Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE; O material biológico obtido foi histologicamente processado no Laboratório de Histologia da UFRPE, bem como, os procedimentos de análise e captura digital de imagens.

4.7 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO

A fim de garantirem-se os princípios de assepsia e antissepsia, todo o instrumental, utilizado nos procedimentos cirúrgicos foram esterilizados por autoclavagem em âmbito hospitalar (HV/UFRPE). Durante as cirurgias, foram utilizados equipamentos de proteção individual (óculos, gorros, luvas e máscaras descartáveis).

Os animais foram induzidos com câmara anestésica, utilizando oxigênio em um fluxo de 3 litros/minuto e isofluorano 3%. A ação pré-anestésica foi realizada pela administração intramuscular (coxa do animal) e conjunta de Meloxicam 0,2% (dose de 2mg/Kg), volume de 0,4 ml; Morfina 1% (dose de 5 mg/kg), volume de 0,2 ml, o que promoveu período anestésico de aproximadamente duas horas. A manutenção foi realizada em máscara anestésica diluído em oxigênio 3l/min., em uma concentração de 2,5% (ISO). Como o sítio da intervenção cirúrgica, elegeu-se a região troclear inferior do fêmur esquerdo, executando-se tricotomia por arracamento de pêlos na respectiva região coxo-femoral e torácica próxima a região do apêndice xifóide. Na sequência, procedeu antissepsia com aplicação local e adjacente de Clorexidina 2% e o local da cirurgia delimitado por campos fenestrados estéreis, previamente preparados para esta finalidade, (Figura 3).

Posicionando-se o animal em decúbito dorsal, o acesso cirúrgico ao esterno e ao

joelho respectivamente, teve início por meio de uma incisão incluindo os planos cutâneos e subcutâneos, medindo aproximadamente 2,5 cm em ambas as áreas. Para tanto, foi utilizado cabo de bisturi do tipo Bard-Parker, montado com lâmina nº 15. Uma vez exposta a musculatura da área, a fáscia foi seccionada no mesmo sentido da incisão cutânea; em seguida, as fibras teciduais foram divulsionadas com o auxílio de uma pinça de dissecação e uma tesoura de metzembaum curva, até a visualização da superfície cartilaginosa para a área torácica e óssea na região articular femoral.

Figura 3 – Procedimentos pré-cirúrgicos: (A) animal anestesiado em manutenção em máscara anestésica; (B) animal anestesiado; (C) animal mantido em monitoramento cardíaco; (D) Preparação do animal para incisão.



Fonte: Florentino (2018).

Com o auxílio de uma tesoura, foi extraído um fragmento do apêndice xifóide (aproximadamente 1cm) de cada um dos animais pertencentes ao G2 para o processamento e extração das células-tronco provenientes de um tecido cartilaginoso, (Figura 4).

Figura 4 - A) Extração de fragmento do apêndice xifóide; B) Exposição do apêndice xifóide após incisões cutânea e fascial, seguida de difusão das fibras musculares.



Fonte: Florentino (2018).

Estando ambos os joelhos tricotomizados e preparados de maneira asséptica, conforme descrito acima procedeu ao acesso cirúrgico à troclea do joelho esquerdo por meio de uma incisão paralela ao maior eixo do osso e medindo aproximadamente 2,5 cm. Para tanto, foi utilizado cabo de bisturi do tipo Bard-Parker, montado com lâmina nº 15. A perfuração inicial do osso com o auxílio do punch, em contra-ângulo e em ângulo reto com a cortical óssea envolvida; Alargamento e aprofundamento da loja óssea utilizando-se punch com 2,5mm e 3mm, de forma que o diâmetro do defeito correspondeu ao diâmetro do próprio punch. Os defeitos foram, portanto, padronizados na medida de 2,5 e ou 3,0mm³ (Figura 5). Uma vez exposta a articulação do joelho, a cápsula articular foi incisionada para acesso intra-articular. A patela foi localizada e deslocada medialmente, permitindo o acesso à tróclea.

Durante a confecção da lesão, a região foi irrigada com solução salina para evitar necrose por aquecimento. Após a confecção da lesão, foram colocadas as células-tronco previamente retiradas do processo (apêndice xifóide) e processadas pelo sistema Rigeneracon®. Nos animais do G1, o fragmento utilizado para a extração de células-tronco foi a peça retirada do joelho controle do mesmo animal. O processo de defeito ósseo para o membro controle de todos os animais, segue o mesmo procedimento cirúrgico já descrito acima, sendo assim, o processo foi repetido no joelho direito, sendo a lesão mantida sem células-tronco, funcionando este membro, como controle.

Figura 5 - Defeito ósseo de 2,5 mm³ no joelho esquerdo.



Fonte: Florentino (2018).

Após a conclusão do procedimento cirúrgico, os animais foram suturados com fios absorvíveis, de forma contínua e mantidos em gaiolas de recuperação (Figura 6), até estabilizarem e retornarem as gaiolas individuais, onde receberam a seguinte medicação de recuperação: Meloxicam 0,2% : 0,2 ml – (SC)/SID, durante três dias; Tramadol 5% : 0,08 ml – (SC)/BID e Enrofloxacino 2,5% : 0,08 ml (SC)/BID, durante cinco dias todos os animais foram recuperados com a medicação.

Figura 6 - Animal em recuperação após transplante de células-tronco.



Fonte: Florentino (2018).

4.8 PROCEDIMENTO RIGENERA[®]

Durante o procedimento cirúrgico, para a extração de células-tronco mesenquimais foi utilizado o desagregador de tecido biológico RIGENERA[®] que foi utilizado em combinação exclusiva com dispositivos RIGENERACONS[®], constituídos por um recipiente de plástico e hélice de desagregação.

O princípio por trás da tecnologia RIGENERA[®] é a possibilidade de obter em poucos minutos enxertos autólogos de tamanho médio de 50 microns para maximizar sua atividade biológica em uma chave regenerativa e minimizar a morte celular que classicamente acompanha cada enxerto a partir do momento de sua retirada do sistema doador de enxerto no leito receptor. Sendo a única tecnologia no mundo capaz de obter enxertos tão pequenos em tamanho (como o tamanho da célula), mantendo a taxa de vitalidade superior a 80%; a tecnologia foi certificada como dispositivo médico CE, FDA, FMA, precisamente, a fim de tornar seguro o procedimento rápido e confiável de micro-enxertos.

Os RIGENERACONS são dispositivos médicos descartáveis aprovados pela CE e FDA. Cada dispositivo possui uma grade com 100 buracos hexagonais. Qualquer buraco é abrangido por seis micro-lâminas projetadas para o corte eficiente de tecidos duros e moles. Apresentando diversas vantagens: - Preparação rápida dos tecidos - Segurança do operador - Não contaminação cruzada por amostras de tecido - Projeto compacto para todo o teatro operatório - Processamento de tecido padrão.

Através de um processo mecânico calibrado usado para separar as células e um processo de filtração especial, Rigenera[®] e seus reagentes, foram capazes de obter uma suspensão de células-tronco mesenquimais progenitoras, onde foram usadas imediatamente para regenerar os tecidos afetados.

Descrição geral das etapas seguidas no procedimento de padronização da técnica para o Sistema Rigenera[®]:

No procedimento e processamento da técnica, foram utilizados tecidos do tipo ósseo para animais transplantados do G1 e tecido do tipo cartilaginoso para os animais do G2 (Figura 7).

Para ambos os grupos, foi utilizado uma pequena amostra de tecido, onde foi inserido no Rigeneracon[®], juntamente com 0,5 ml de solução salina fisiológica estéril.

O Rigeneracon[®] foi inserido na máquina Rigenera[®] e o processo foi iniciado. O processo levou 3 minutos para que tivéssemos uma boa suspensão celular. Vale salientar, que

o tempo de desintegração pode ser padronizado para cada tipo de tecido.

Durante o processo de desintegração, as células passaram pelo filtro e a suspensão líquida se depositou no fundo do Rigeneracon[®].

Uma vez que o tecido foi desintegrado, o Rigeneracon[®] foi extraído da máquina Rigenera[®].

Através do orifício, foi removida a suspensão celular (Figura 8). Após os três minutos de processamento, a suspensão celular estava pronta para ser usada colocando-a ou injetando-a na área receptora (Figura 9).

Figura 7 - Rigeneracon[®] com tecido cartilaginoso presente no interior do dispositivo.



Fonte: Florentino (2018).

Figura 8 – Aspiração da suspensão celular.



Fonte: Florentino (2018)

Figura 9 – Momento do transplante autólogo de CTMs no joelho esquerdo do animal.



Fonte: Florentino (2018).

4.9 EUTANÁSIA E OBTENÇÃO DA AMOSTRA TECIDUAL

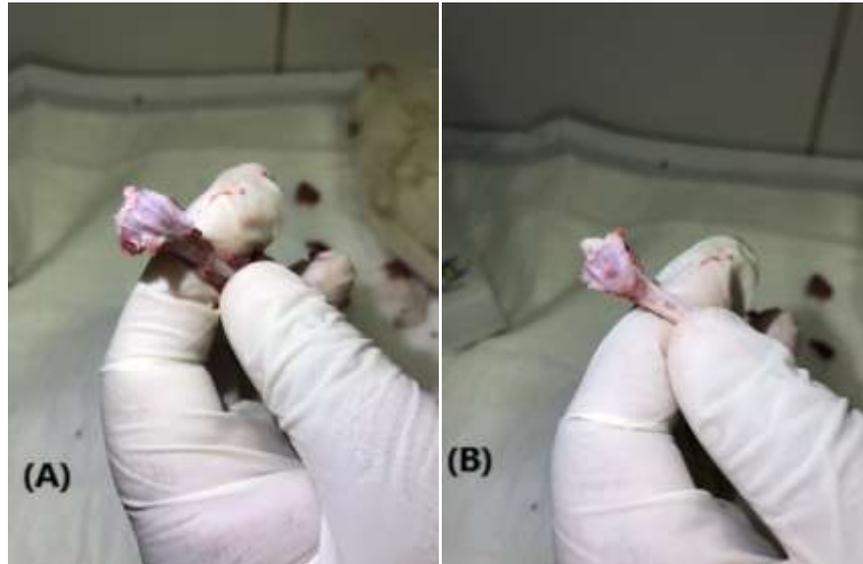
Os animais foram eutanasiados de acordo com o período de acompanhamento pós-cirúrgico pré-estipulado (60 dias), por meio da câmara de CO₂, estando os mesmos previamente dessensibilizados com isoflurano por máscara anestésica em circuito semi-aberto. Constatada sua morte, foram seccionados os ossos na região distal do fêmur e proximal da tíbia em ambos os joelhos. Após o alcance do plano ósseo e localização do defeito, o fêmur foi cuidadosamente desarticulado e removido (Figura 10). Os tecidos moles foram retirados por dissecação e as amostras identificadas e colocadas em recipientes contendo solução formólica tamponada (pH 7) a 10% (formalina).

4.10 PROCEDIMENTO LABORATORIAL

As amostras foram processadas no Laboratório de Histologia da Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE. Após a fixação do tecido em solução formólica tamponada (paraformaldeído a 10%), à temperatura ambiente, os ossos foram descalcificados em solução de ácido fórmico a 12,5% e citrato de sódio a 20% por um período de 20 dias. Constatada a flexibilidade tecidual apropriada para clivagem macroscópica, estes foram lavados em água

corrente durante 3 horas, em seguida, foram imersos em solução, na sequência permaneceram por 24 horas em álcool a 70%.

Figura 10 - A) Fêmur do animal 7 - membro esquerdo, apresentando uma boa recuperação comparando-se ao membro direito do mesmo animal removido após a eutanásia ; B) Fêmur do animal 7 – membro direito, apresentando uma recuperação não tão significativa.

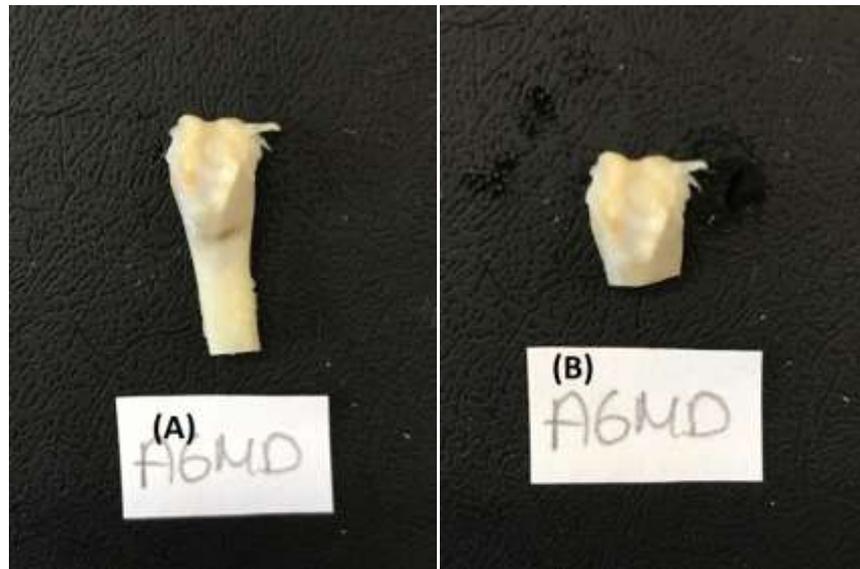


Fonte: Florentino (2018).

Após a clivagem inicial (Figura 11), o defeito foi isolado através de secção nas proximidades de suas extremidades superior e inferior; os fragmentos resultantes foram imersos, sequencialmente, em álcool absoluto e xilol durante períodos de 30 minutos em cada fase, conforme protocolo do serviço; promoveu-se, assim, respectivamente a desidratação e diafanização teciduais, após o que as amostras foram embebidas durante 30 minutos em parafina liquefeita, no interior de estufa regulada à temperatura de 60°C.

Completado o processamento, as amostras foram incluídas em moldes que, preenchidos por parafina, originaram blocos contendo a estrutura corretamente posicionada para os cortes. Foram confeccionadas e numeradas, por ordem de secção, 10 lâminas por espécie, tendo sido as mesmas alternadamente coradas pelas técnicas de Hematoxilina de Harris / Eosina Alcólica (HE), corando em matizes de róseo e lilás o material estudado (de acordo, respectivamente com o pH básico ou ácido de seus elementos), destinou-se à avaliação qualitativa das células e eventos envolvidos no reparo ósseo.

Figura 11 - A) e B) Joelho do animal 6 descalcificado e submetido a clivagem inicial (observar defeito).



Fonte: Florentino (2018).

4.11 ANÁLISE HISTOLÓGICA

A análise histológica foi realizada no Laboratório de Patologia do Departamento de Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE. Como parâmetros histológicos, foram utilizados (critérios adaptados de CARDOSO, 2008): a) reação do tipo corpo estranho (RCE); b) infiltrado (INF); c) vascularização (VAS); d) presença de tecido conjuntivo denso/fibroso (TCF); e) atividade osteoblástica (AOS); f) neoformação óssea (NEO). Observando-se a características ausentes, presentes, inexistente e incipiente em análise estatística descritiva.

4.12 CAPTAÇÃO DE IMAGENS

Após a coloração pela técnica, as imagens microscópicas foram captadas através de sistema óptico, sendo armazenadas em arquivos digitais e submetidas à delimitação da zona de defeito utilizando-se de software específico.

4.13 TRATAMENTO ESTATÍSTICO

Os resultados foram coletados através de análises histológicas.

Para os procedimentos descritivos foram calculadas as frequências e incidência das amostras.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ASPECTOS GERAIS – GRUPO I: TRANSPLANTE AUTÓLOGO DE CTMS JOELHO/JOELHO

5.1.2 Membro direito (controle)

Os animais apresentaram uma proliferação de uma membrana muito espessa e bastante vascularizada na área de superfície articular, já em outras áreas, pouca vascularização e pouca reestruturação óssea; Além destes aspectos, outros animais apresentaram a presença de membrana conjuntiva, membrana sinovial bem vascularizada e algumas áreas de cartilagem.

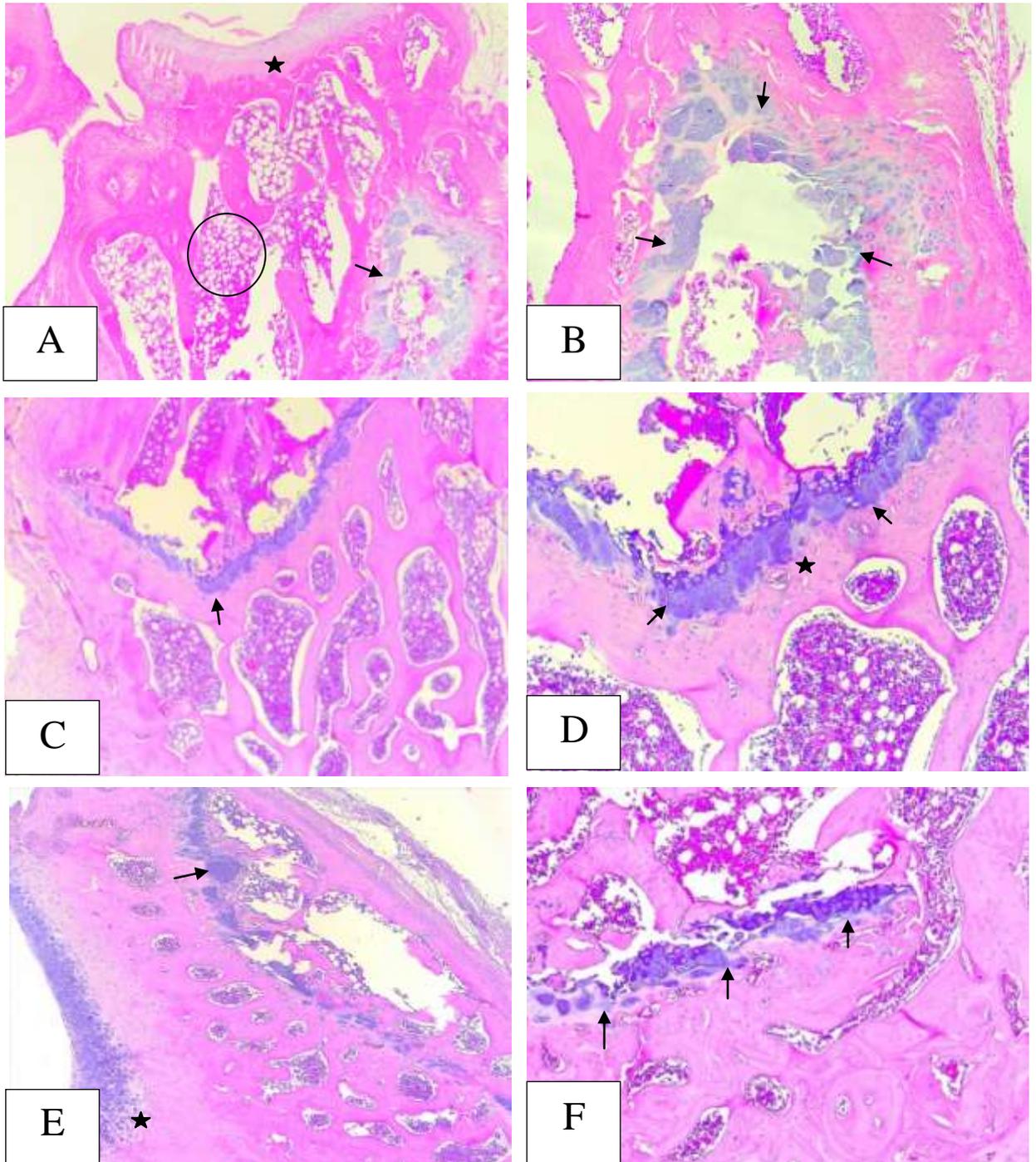
Outro aspecto relevante para esta análise é a presença de medula óssea e tecido ósseo compacto interposto, entre dois ossos compactos e cartilagem. Em alguns animais uma membrana conjuntiva se formou, formou-se tecido ósseo, medula óssea, tecido ósseo e cartilaginoso, então houve uma formação do tecido cartilaginoso que ajudou a orientar a formação de trabéculas ósseas, mas não formou superfície articular.

5.1.3 Membro esquerdo (transplante de CTMS)

Observou-se na área não lesionada que há incidência de fibrocartilagem com excesso de tendão, área de transição de superfície articular e membrana conjuntiva. Na área lesionada encontra-se a presença de membrana conjuntiva, tecido cartilaginoso neoformado derivado de uma membrana conjuntiva que encontra-se paralelamente ao tecido cartilaginoso. Presença de ilhotas de cartilagem hialina, presença de membrana e melhoramento no processo de ossificação. Presença de cartilagem neoformada, membrana, tecido ósseo, indícios de formação de diversos tecidos, porém de forma desorganizada. Os indícios de regeneração presente não é significativo, comprova que o transplante de CTMs foi responsável pela formação de células envolvidas com o tecido conjuntivo e nas suas variedades, cartilaginoso, ósseo, fibrocartilaginoso, medula óssea, vasos e até tecido adiposo.

Características descritas dos membros esquerdos e direitos presentes na (Figura 12).

Figura 12 - Fêmur de Rato Wistar G1, desmineralizado. Hematoxilina-eosina (HE). Na **(Figura 12A)** – A1MDG1JJ: Notar um corte transversal de fêmur desmineralizado, presença de uma superfície articular (estrela); Área de tecido ósseo esponjoso preenchido por medula óssea (círculo); Área cística circundada por cartilagem hialina (seta), obj. 4x. **(Figura 12B)** – A1MDG1JJ: Área cística circundada por cartilagem hialina (setas), obj. 10x. **(Figura 12C)** – A2MEG1JJ: Corte transversal de fêmur desmineralizado, destacando-se a presença de cartilagem neoformada (seta), obj. 4x. **(Figura 12D)** - A2MEG1JJ: Tecido cartilaginoso neoformado (setas), acima de tecido ósseo compacto (estrela), obj. 10x. (Figura 12E) – A4MDG1JJ: Presença de cartilagem em área profunda (seta); Área articular (estrela), obj. 4x. **(Figura 12F)** – AMEG1JJ: Presença de cartilagem hialina entre osso esponjo e compacto (setas), obj. 10x.



Fonte: Florentino (2018).

5.2 ASPECTOS GERAIS – GRUPO 2: TRANSPLANTE AUTÓLOGO DE CTMS APÊNDICE XIFÓIDE/JOELHO

5.2.1 Membro direito (controle)

Notou-se que no tecido do tipo esponjoso, com áreas preenchidas por medula óssea vermelha, aconteceu uma separação por uma margem de cartilagem hialina, onde também destacou-se a presença de cartilagem seriada para calcificação e áreas císticas com necrose do tecido de medula óssea. Também se pode destacar a formação de tecido cartilaginoso, mas de forma anômala.

Em alguns animais pode ser notado que o joelho direito não teve a recuperação esperada, observa-se uma lesão óssea profunda e há presença de cartilagem só nas extremidades, logo, não houve regeneração. Presença de necrose, matriz de medula óssea, formação de cartilagem, tecido periosteal, tecido ósseo compacto e presença de células que dão origem tanto a osteoblastos e osteócitos quanto a condroblastos e condrócitos.

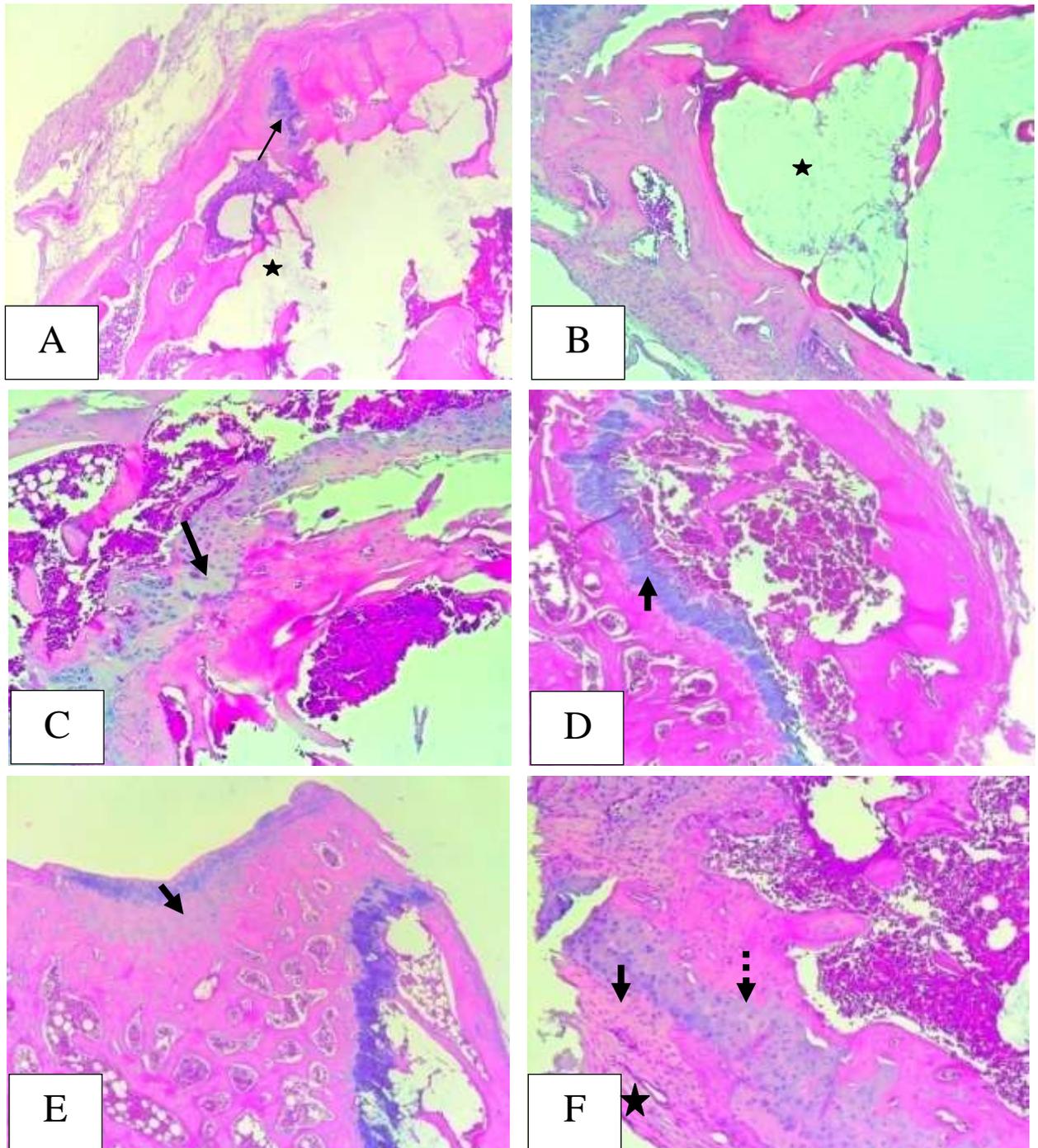
5.2.2 Membro esquerdo (transplante de CTMS)

Observa-se uma superfície articular completamente estruturada, totalmente coberta por tecido cartilaginoso, onde há margem bem delimitada entre o tecido ósseo e cartilaginoso, osso do tipo trabecular com presença de medula óssea vermelha. O resultado é positivo. As células-tronco implantadas deram origem à formação de tecido ósseo.

Presença de células indiferenciadas, formação de osteoclastos em grande quantidade. As células sofreram diferenciação em osteoblastos, mas a maior área é uma área de cartilagem oriunda da membrana. Destacou-se a presença de membrana conjuntiva originando cartilagem que está em área limítrofe ao tecido ósseo. Presença de uma diferenciação para o tecido cartilaginoso, tendo assim, regeneração significativa, com presença de 30% de membrana e o restante é sendo cartilagem.

Características descritas dos membros esquerdos e direitos presentes na (Figura 13).

Figura 13 - Fêmur de Rato Wistar G2. Hematoxilina-eosina (HE). **Figura (13A)** – A3MDG2XJ: Fêmur desmineralizado em corte transversal. Observar tecido cartilaginoso neoformado inserido na diáfise área de osso compacto (seta), obj. 4x. **Figura (13B)** – A3MEG2XJ: Notar área cística delimitada por osso compacto contendo matriz basofílica amorfa (estrela), obj. 10x. **Figura (13C)** – A7MDG2XJ. Notar cartilagem hialina (seta) interposta entre tecido ósseo esponjoso e compacto. Obj. 10x. **Figura (13D)** – A7MEG2XJ: Cartilagem hialina (seta) interposta entre tecido ósseo compacto que delimita área cística contendo medula óssea. Obj. 4x. **Figura (13E)** – A9MDG2XJ. Notar superfície articular íntegra (seta), obj. 10x. **Figura (13F)** – A9MEG2XJ: Notar cartilagem neoformada (seta) interposta entre tecido fibroso de perióstio (estrela) e osso compacto (seta tracejada), obj. 10x.



6 DISCUSSÃO

A ocorrência de extensas lesões, ou mesmo procedimentos cirúrgicos com grandes manipulações ósseas, como ocorre em alguns processos inflamatórios crônicos e amplas ressecções tumorais, poderá resultar na persistência de importantes cavidades no plano esquelético. Algumas delas, em condições normais (e desde que tenha havido eliminação do agente etiológico), têm a possibilidade de ser reparadas pelo processo biológico natural, estando a extensão e velocidade do mesmo na dependência da localização anatômica, da dimensão lesional e das características biológicas de cada indivíduo. Assim, podem ser necessários anos para completar-se um reparo, o que se torna um fator complicador para a resolução do processo. Tal problemática, há décadas tem levado ao desenvolvimento de pesquisas que se destinam à busca de alternativas para auxiliar o reparo tecidual nos eventos lesivos em que foi excedida a possibilidade de resposta orgânica em qualidade e tempo considerados satisfatórios (LIMEIRA JÚNIOR, 2004).

Pesquisas desenvolvidas na área lançam mão de diferentes protocolos envolvendo modelos animais de portes diversos (FUJITA et al., 2001; CANCEDDA et al., 2007; KUZNETSOV et al., 2008; WANG et al., 2009), sempre foi no intuito de replicar, com a máxima similaridade, as condições fisiopatológicas a que se submetem o ser humano. Neste contexto, pode-se citar, por exemplo a realização de experimentos na calota craniana de animais, composta por ossos de origem embrionária semelhante à dos maxilares (CARDOSO, 2008).

No presente trabalho, o uso de joelho de ratos adultos *Wistar* deveu-se à intenção de observar o reparo do tecido articular, o que envolve ainda um conjunto de fenômenos desenvolvidos na cavidade por este. O reparo em ossos articulares também tem sido avaliado em animais maiores (SCHNETTLER et al., 2008), mas o modelo escolhido, além de baixo custo, oferece a vantagem de um manejo relativamente fácil. O tamanho do defeito ósseo ora produzido (2,5 e 3,0mm³) também já havia sido padronizado em protocolos anteriores (LIMEIRA JÚNIOR, 2004; ESPITALIER et al., 2009), sendo suficiente para a acomodação dos enxertos estudados e incapaz de exceder o limite de resistência óssea do animal.

Neste sentido, encontramos em Cardoso (2008) uma abordagem de reparo ósseo aos 45 dias de pós-operatórios em ratos *Wistar*. Em seu estudo, os sítios experimentais de enxertia foram suficientes e adequados para o procedimento, fazendo com que o nosso procedimento fosse exequível.

A capacidade de regeneração óssea em animais vem sendo estudada há algum tempo

por diversos autores. Já em 1939, Sutro e Jacobson relatam que ratos jovens apresentam uma grande habilidade de regenerar defeitos ósseo de 3mm após 5 meses em comparação a ratos adultos (LAMI et al., 2004; SIROLA, 2004), evidenciam que ratos jovens (6 dias de idade) apresentam uma significativa habilidade em reossificar defeitos ósseos quando comparado a animais adultos (60 dias de idade), após 8 semanas de vida. Desse modo, na criação de um modelo experimental, os animais devem ser adultos, o que manteria o comportamento similar ao dos seres humanos. Desta forma, os animais utilizados em nossa pesquisa estavam de acordo com estudos recentes sobre regeneração óssea. Embora a regeneração óssea em animais adultos possa acontecer após esse período, acreditava-se a exemplo de outros autores, que essa recuperação seja mínima. Já em animais jovens a reparação continuaria de forma bastante robusta, e eventualmente, fecharia o defeito ósseo por completo, o que poderia dificultar a avaliação da regeneração óssea nos defeitos considerados críticos (KREBSBACH et al., 1998).

A avaliação histológica é, de fato passível de limitações quanto à replicação metodológica, tendo em vista sua inerente condição, sob muitos aspectos, de subjetividade. Entretanto, é de indiscutível importância contextualizar os diferentes fenômenos teciduais e celulares associados ao desenvolvimento de condições biológicas variadas, razão pela qual esta pesquisa se propôs a também abordá-los.

Neste estudo, buscamos critérios de avaliação histológica descritiva, previamente utilizados em experimentos envolvendo reparo ósseo, pelo que foram reproduzidos em parâmetros adotados por Cardoso (2008). Muito embora fazendo adaptações consideradas pertinentes.

Em nenhuma das amostras foram encontrados indícios de reação do tipo corpo estranho (RCE), achados destacados por Marins et al. (2004), em experimentos com ratos.

Resultados preliminares demonstram que em lesões agudas de cicatrização rápida o emprego de MSCs favorece a formação de um tecido cartilaginoso sem fibrilação e com características biomecânicas semelhante à cartilagem hialina. A cartilagem Hialina se manteve em ilhotas de cartilagem hialina, presença de membrana e melhoramento no processo de ossificação nos dois grupos, mas com uma incidência maior G2. Embora o emprego de condrócitos autólogos apresente resultados satisfatórios em lesões articulares de origem traumática, o uso das MSCs vem ditando novas perspectivas para o reparo de extensas lesões não-traumáticas de caráter crônico como a artrite reumatóide (JORGENSEN et al., 2001). Uma explicação para esses resultados reside na capacidade imunomoduladora das células-tronco que inibem a ação de linfócitos na área lesionada (NARDI; MEIRELES, 2006).

Histologicamente, em todos os animais tratados onde a neoformação óssea foi observada, o osso recém formado apresentou aspecto imaturo, acompanhado de intensa formação vascular e fibras colágenas organizadas irregularmente. Ao longo do tempo, o osso adquire aspecto de osso maduro, podendo-se identificar a presença de osteócitos e uma aparente estabilidade, características compatíveis com o padrão descrito em outros experimentos (LYNCH; GENKO, MARX, 1999; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004; MURUGAN; RAMAKRISHNA, 2005).

Nos defeitos críticos, a formação óssea limita-se às áreas periféricas sendo preenchido em toda extensão por tecido conjuntivo fibroso (HONMA et al., 2008). No tecido ósseo, defeitos com dimensões pequenas reparam-se com facilidade, sem deixar cicatriz fibrosa (SEAL; OTERO; PANITCH, 2001), mecanismo que não ocorre em defeitos que apresentam dimensões maiores, definidos como defeitos críticos (SCHMITZ; HOLLINGER, 1986; SCHMITZ et al., 1990; GONDIM, 2007; HONMA et al., 2008). Com isso, estudos experimentais com o objetivo de avaliar o processo de regeneração óssea devem, portanto, apresentar defeitos com determinadas características morfológicas de extensão e espessura suficientes para impedir a regeneração óssea espontânea (GONDIM, 2007).

Os animais utilizados nesse estudo foram machos adultos com o objetivo de minimizar as influencias hormonais esperadas na utilização de fêmeas assim como, em função de nos animais adultos, o metabolismo ósseo ser mais lento e estável, diferente dos animais jovens nos quais a neoformação e a remodelação óssea é mais dinâmica para atender as demandas naturais de crescimento esquelético do animal. Acredita-se ainda que as fêmeas sejam mais sensíveis ao ruído, ao cheiro e às variações de temperatura (AUER et al., 2007; ROLIM, 2010).

Pôde-se afirmar que o potencial terapêutico para o uso de CTMs extraídas pelo Sistema Rigenera[®] em bioengenharia dos tecidos e terapia celular é enorme e que um modelo experimental bem definido permite analisar vários tipos de biomateriais associados a CTM, o que a obtenção de células-tronco a partir deste sistema seria totalmente reproduzível, além de apresentar inúmeras vantagens quando comparada a outros tipos de extração de CTMs. Desse modo, a disponibilidade de um bom modelo experimental poderia possibilitar a comparação de CTMs provenientes de diferentes regiões do organismo animal. Acredita-se, porém, serem necessários outros estudos, inclusive comparando o potencial dessas células extraídas pelo Sistema Rigenera[®] para que se possa num futuro próximo, utilizar esses protocolos em bioengenharia de tecido ósseo em outras espécies.

7 CONCLUSÃO

O desenvolvimento do modelo experimental determinado a partir da criação de lesões articulares no joelho de ratos e a realização de transplante autólogo por meio do sistema Rigenera[®] possibilitam o estudo de regeneração óssea, já que, Pode-se afirmar que o potencial terapêutico para o uso de CTMs extraídas pelo Sistema Rigenera[®] em bioengenharia dos tecidos e terapia celular é enorme e que um modelo experimental bem definido permite analisar vários tipos de biomateriais associados a CTM, o que a obtenção de células-tronco a partir deste sistema seria totalmente reproduzível, além de apresentar inúmeras vantagens quando comparada a outros tipos de extração de CTMs.

Para a avaliação histológica, resultados demonstram que em lesões agudas de cicatrização rápida o emprego de CTMs favoreceu a formação de um tecido cartilaginoso interposto entre tecido ósseo esponjoso e compacto, bem como, tecido cartilaginoso neoformado em área de tecido ósseo compacto. A cartilagem hialina se manteve presente nos dois grupos. sendo esta uma característica bastante relevante para o trabalho, já que, é um comportamento atípico em ratos velhos. Desse modo, a disponibilidade de um bom modelo experimental poderia possibilitar a comparação de CTMs provenientes de diferentes regiões do organismo animal. Acredita-se, porém, serem necessários outros estudos, inclusive comparando o potencial dessas células extraídas pelo Sistema Rigenera[®] para que se possa num futuro próximo, utilizar esses protocolos em bioengenharia de tecido ósseo em outras espécies.

Pode-se concluir que um tecido membranoso com presença de células-tronco deu origem a célula cartilaginosa, embora ainda em um processo muito lento.

REFERÊNCIAS

- ABUKAWA, H. et al. The engineering of craniofacial tissues in the laboratory: a review of biomaterials for scaffolds and implant coatings. **Dental clinics of North America**, Boston, v. 50, n. 2, p. 205-16, abr. 2006.
- AHRENS, N. et al. Mesenchymal stem cell content of human vertebral bone marrow. **Transplantation**, London, v. 78, n. 6, p. 925-929, 2004.
- ALAMOUDI N, M.; EL ASHIRY, E. A.; FARSI, N. M. Treatment of oral ulcers in dogs using adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. **The Journal of Clinical Pediatric Dentistry**, Birmingham, UK, v. 38, n. 3, p. 215-22, 2014.
- ALDAHMAH, A. et al. Human stromal (mesenchymal) stem cells: basic biology and current clinical use for tissue regeneration. **Annals of Saudi Medicine**, Saudi Arabia, v. 32, n. 1, p. 68-77, 2012.
- ALMEIDA-PORADA, G. et al. Differentiative potential of human metanephric mesenchymal cells. **Experimental Hematology**, Philadelphia, v. 30, n. 12, p. 1454-1462, 2002.
- ALSALAMEH, S. et al. Identification of mesenchymal progenitor cells in normal and osteoarthritic human articular cartilage. **Arthritis & Rheumatology**, Atlanta, v. 50, n. 5, p. 1522-1532, 2004.
- ALVES, C. A. Células-tronco embrionárias: algumas reflexões sobre o atual cenário brasileiro. **Revista de Bioética y Derecho**, Barcelona, n. 14, p. 19-22, set. 2008.
- ALY, L. A.; EL-MENOUFY, H.; SADEQ, H. S. Efficiency of systemic versus intralesional bone marrow-derived stem cells in regeneration of oral mucosa after induction of formocresol induced ulcers in dogs. **Dental Research Journal**, , v. 11, n. 2, p. 212-21, 2014.
- ARAGÃO, C. M. A.; BEZERRA, F. T. G. Brasil e as pesquisas com células-tronco: visão geral. **Revista de Biologia**, Iran, v. 9, n. 1, p. 12-15, 2012.
- ARGÔLO-NETO, N. M. **Tratamento de feridas cutâneas experimentais em camundongos (Mus musculus C57BL/6) diabéticos com células-tronco mesenquimais aplicadas de forma isolada e associadas ao plasma autólogo rico em plaquetas**. Tese de Doutorado em Medicina Veterinária, Departamento de Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, MG, 121p, 2009
- ARZI, B. et al. Therapeutic efficacy of fresh, allogeneic mesenchymal stem cells for severe refractory feline chronic gingivostomatitis. **Stem Cells Translational Medicine**, Durham, v. 6, n. 8, p. 1710-1722, 2017.
- ARZI, B. et al. Therapeutic efficacy of 7 fresh, autologous mesenchymal stem cells for severe refractory gingivostomatitis in cats. **Stem Cells Translational Medicine**, Durham, v. 5, n. 1, p. 75-86, 2016.
- ASSIS, T. L. S.; WINCK, C. P.; SANTOS, E. J. C. S. Análise da viabilidade terapêutica das

células-tronco mesenquimais alogênicas no tratamento de felino acometido por complexo gengivite estomatite felina. **Revista Científica Multidisciplinar Núcleo do Conhecimento**, São Paulo, ano 2, v. 1, p 470-482, 2017.

AUBIN, J. E. Advances in the osteoblast lineage. **Biochemistry and Cell Biology**, Ottawa, v. 76, p. 899-910, 1998.

AUER, J. A. et al. Refining animal models in fracture research: seeking consensus in optimising both animal welfare and scientific validity for appropriate biomedical use. **BMC Musculoskelet Disord**, London, v. 8, p.1-13, aug. 2007.

BAR-SHAVIT, Z. Taking a toll on the bones: regulation of bone metabolism by innate immune regulators. **Autoimmunity**, New York, v. 41, n. 3, p. 195-203, abr. 2008.

BARROS, S.V.G.; DEL CARLO, R. J.; VIROLIA, M. I.; GALVÃO, S. R.; MAIA FILHO, A.; OLIVEIRA, D. R. Autoenxerto percutâneo de medula óssea. II - Reparação de falhas segmentares produzidas no rádio de coelhos. **Ciência Rural**. 31:627-632, 2001.

BITTENCOURT, R.A.C.; PEREIRA, H.R.; FELISBINO, S.L.; MURADOR, P.; OLIVEIRA, A.P.E.; DEFFUNE, E. Isolamento de células tronco mesenquimais da medula óssea. **Acta Ortopédica Brasileira**, 14(1):22-24, 2006.

BLACK, L. L. et al. Effect of adipose-derived mesenchymal stem and regenerative cells on lameness in dogs with chronic osteoarthritis of the coxofemoral joints: a randomized, double-blinded, multicenter, controlled trial. **Veterinary Therapeutics : Research in Applied Veterinary Medicine**, Apopka, v. 8, n. 4, p. 272-84, 2007.

BRASIL. **Lei nº 11.105**, de 24 de Março de 2005. 2005. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2004-2006/2005/lei/l11105.htm>. Acesso em: 18 jan. 2018.

BRASIL. **Portaria nº 931**, de 2 de Maio de 2006. 2006. Disponível em: <http://redsang.ial.sp.gov.br/site/docs_leis/ps/ps4.pdf>. Acesso em: 18 jan. 2018.

BRASIL. **Portaria nº 1.701**, de 12 de dezembro de 2012. Disponível em: <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2012/prt1701_12_12_2012.html>. Acesso em: 18 jan. 2018.

BRASIL. **Portaria nº 298**, de 9 de Fevereiro de 2018. Disponível em: <http://www.lex.com.br/legis_27614958_PORTARIA_N_298_DE_9_DE_FEVEREIRO_DE_2018.aspx>. Acesso em: 18 jan. 2018.

BRITO, H. F. V. et al. Tratamento de sequelas neurológicas em cães, causadas por infecção pelo vírus da cinomose, através do transplante alogênico de células mononucleares de medula óssea. **MEDVEP : Revista Científica de Medicina Veterinária . Pequenos Animais e Animais de Estimação**, Curitiba, PR, v. 24, n. 8, p. 26-29, 2010.

BURASTERO, G. et al. The association of human mesenchymal stem cells with BMP-7 improves bone regeneration of critical-size segmental bone defects in athymic rats. **Bone**, Philadelphia, USA, v. 47, n. 1, p. 117-126, 2010.

BYDLOWSKI, S. P. Características biológicas das células-tronco mesenquimais. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, São Paulo, v. 31, p. 25-35, 2009.

CANCEDDA, R.; GIANNOTI, P.; MASTROGIACOMO, M. A. Tissue engineering approach to bone repair in large animal models and in clinical practice. **Biomaterials**, New York, v. 28, p. 4240-4250, 2007.

CAPLAN, A. I. Mesenchymal stem cells. **Journal Orthopaedic Research**, Rosemont, v. 9, n. 5, p. 641-50, 1991.

CAPLAN, A. I. Why are MSCs therapeutic? New data: new insight. **Journal of Pathology**, v. 217, p. 318-324, 2009. Disponível em: <http://www.ugr.es/~inmuno/Novidades/parolini/Caplan,_2009.pdf>. Acesso em: 18 jan. 2018.

CARDOSO, A. B. **Estudo histomorfométrico comparativo de reparação óssea em ratos após o uso de biomateriais de origem bovina e sintética**. 2008. 133 f. Tese (Doutorado em Odontologia) – Universidade Federal da Paraíba, Universidade Federal da Bahia, João Pessoa, 2008.

CARVALHO, A. C. Megaestudo de células tronco dignifica a cardiologia brasileira. **Jornal Sociedade Brasileira de Cardiologia**, São Paulo, v. 68, p. 65, 2005.

CARVALHO, A. C. C. Células-tronco: a medicina do futuro. **Ciência Hoje**, São Paulo, v. 29, n. 172, p. 26-31, 2001.

CARVALHO, A. M.; ALVEZ, A. L. G.; GOLIM, M. A.; MOROZ, A.; HUSSINI, C. A.; OLIVEIRA, P. G. G.; DEFFUNE, E. Isolation and immunophenotypic characterization of mesenchymal stem cells derived from equine species adipose tissue. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. 132:303-306, 2009.

CSAKI, C.; MATIS, U.; MOBASHERI, A.; YE, H.; SHAKIBAEI, M. Chondrogenesis, osteogenesis and adipogenesis of canine mesenchymal stem cells: a biochemical, morphological and ultrastructural study. **Histochemistry and Cell Biology**. 128(6):507-520, 2007.

CHU, C. R.; SZCZODRY, M.; BRUNO, S. Animal Models for Cartilage Regeneration and Repair. **Tissue Engineering: Part B**, Missouri, v. 16, n. 1, p. 105-115, 2010.

CLARKE, D. L. et al. Generalized potential of adult neural stem cells. **Science**, Washington, v. 288, p. 1660-1663, 2000. Clinical Trials.

COVAS, D. T. et al. Mesenchymal stem cells can be obtained from the human saphena vein. **Experimental Cell Research**, Amsterdam, v. 309, n. 2, p. 340-344, 2005.

COVAS, D. T. et al. Isolation and culture of umbilical vein mesenchymal stem cells. **Brazilian Journal Medical Biological Research**, São Paulo, v. 36, n. 9, p. 1179-1183, 2003.

CRUZ, E. et al. Terapia celular: uma nova indústria na biotecnologia. In: CARVALHO, A.;

- GOLDENBERG, R. (Org.). **Células-tronco mesenquimais: conceitos, métodos de obtenção e aplicações**. São Paulo: Editora Atheneu, 2012. cap. 6, p. 185-204.
- DALMONI, F. et al. Células-Tronco mesenquimais adultas: características e aplicações experimentais em animais. **Veterinária e Zootecnia**, São Paulo, v. 20, p. 49-59, 2013.
- DE BARI, C. et al. Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. **Arthritis Rheumatology**, Atlanta, v. 44, n. 8, p. 1928-1942, 2001.
- DEANS, R. J.; MOSELEY, A. B. Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses. **Experimental Hematology**, Philadelphia, v. 28, n. 8, p. 875-884, 2000.
- DESANDO, G. et al. Intra-articular delivery of adipose derived stromal cells attenuates osteoarthritis progression in an experimental rabbit model. **Arthritis Research & Therapy**, London, v. 15, n. 1, p. 22, 2013.
- DIEKMAN, B. O. et al. Intra-articular delivery of purified mesenchymal stem cells from C57BL/6 or MRL/MpJ superhealer mice prevents posttraumatic arthritis. **Cell Transplantation**, Tampa, v. 22, n. 8, p. 1395-1408, 2013.
- DOMINICI, M. et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, Philadelphia, v. 8, n. 4, p. 315-317, 2006.
- DÓRO, M. P.; PASQUINI, R. Transplante de medula óssea: uma confluência Biopsicossocial. **Interação em Psicologia**, Curitiba, v. 4, p. 39-60, 2000.
- DU, L. M. et al. Platelet-targeted gene therapy with human factor VIII establishes haemostasis in dogs with haemophilia A. **Nature Communications**, London, v. 4, p. 2773, 2013.
- ESPITALIER, F. et al. A comparison between bone reconstruction following the use of mesenchymal stem cells and total bone marrow in association with calcium phosphate scaffold in irradiated bone. **Biomaterials**, New York, v. 30, p. 763-769, 2009.
- FERRIS, D.J.; FRISBIE, D.D.; KISIDAY, J.D.; MCILWRAITH, C.W.; HAGUE, B.A.; MAJOR, M.D.; SCHNEIDER, R.K.; ZUBROD, C.J.; KAWCAK, C.E.; GOODRICH, L.R. Clinical followup of thirty-three horses treated for stifle injury with bone marrow derived mesenchymal stem cells intra-articularly. **Veterinary Surgery, in press**. 2013.
- FILARDO, G. et al. Stem cells in articular cartilage regeneration. **Journal of Orthopaedic Surgery and Research**, London, v. 11, n. 1, p. 42, 2016.
- FINOCCHIARO, L. M. E.; GLIKIN, G. C. Recent clinical trials of cancer immunogene therapy in companion animals. **World Journal Experimental Medicine**, Pleasanton, v. 7, n. 2, p. 42-48, may, 2017.
- FRAGA, A. M. et al. Establishment of a new line of human embryonic stem cells from the Brazilian population in defined medium: implications for cell therapy in an ethnically diverse population. **Cell Transplantation**, Tampa, v. 20, p. 431- 440, 2011.

- FRIEDENSTEIN, A. J. et al. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. **Transplantation**, London, v. 6, n. 2, p. 230-247, 1968.
- FUCHS, E.; SEGRE, J. Stem Cell: a new lease on life. **Cell Press**, Cambridge, v. 100, p. 143-155, 2000.
- FUJITA, R. et al. Bone substitute: transforming β -tricalcium phosphate blocks. **Journal Oral Maxillofacial Surgery**, Philadelphia, v. 61, p. 1045-1053, 2003.
- GATTI, A.; MARTINS, D. S.; SANTOS, E. J. C. Cell therapy in the treatment of myeloid aplasia - a case report. **MEDVEP : Revista Científica de Medicina Veterinária . Pequenos Animais e Animais de Estimação**, Curitiba, v. 12, n. 41, p. 296-303, 2014
- GATTI, R. A, MEUWISSEN, H. J.; ALLEN, H. D. Immunological reconstitution of sex-linked lymphopenic immunological deficiency. **The Lancet**, London, v. 292, n.7606, p. 1366-1369, 1968.
- GEBUREK, F. et al. Effect of single intralesional treatment of surgically induced equine superficial digital flexor tendoncore lesions with adipose-derived mesenchymal stromal cells: a controlled experimental trial. **Stem Cell Research Therapy**, London, v. 8, n. 1, p. 129, jun. 2017.
- GENESER, F. **Histologia**. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan, 2003. p.119-123, 208-234.
- GIACCONE, M. et al. A New medical device, based on rigenera protocol, in the management of complex wounds. **Journal of Stem Cells Research, Reviews & Reports**, New Jersey, v. 1, n. 3, p. 3, 2014.
- GODWIN, E.E.; YOUNG, N.J.; DUDHIA, J.; BEAMISH, I.C.; SMITH, R.K. Implantation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells demonstrates improved outcome in horses with overstrain injury of the superficial digital flexor tendon. **Equine Veterinary Journal**. 44:25–32, 2012.
- GONDIM, A. L. M. **Efeito da laserterapia na biomodulação da osteogênese em defeitos críticos confeccionados em calota craniana de ratos**. 2007. 117 f. Dissertação (Mestrado em Odontologia) - Faculdade de Odontologia, Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- GRAZIANO, A. et al. Periodontal tissue generation using autologous dental ligament micro-grafts: case report with 6 months follow-up. **Annals of Oral & Maxillofacial Surgery**, London, v. 1, n. 2, p. 20, jun. 2013.
- GRECO, O. T.; GRECO, R. L.; ABREU, A. C. de. Uso de células-tronco no tratamento de pacientes com miocardiopatia dilatada de diferentes etiologias, associada à ressincronização cardíaca artificial, **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, São Paulo, v. 29, n. 4, p. 416-424, 2007.
- GRODZINSKY, A. J. et al. Cartilage tissue remodeling in response to mechanical forces. **Annual Review Biomedical Engineering**, Palo Alto, v. 2, p. 691-713, 2000.

GURDA, B. L.; BRADBURY, A. M.; VITE, C. H. Canine and feline models of human genetic diseases and their contributions to advancing clinical therapies. **Yale Journal Biology Medicine**, New Haven, v. 90, n. 3, p. 417-431, 2017.

HARMAN, R. et al. Prospective, 8 randomized, masked, and placebo-controlled efficacy study of intraarticular allogeneic adipose stem cells for the treatment of osteoarthritis in dogs. **Frontiers Veterinary in Science**, Lausanne, v. 3, p. 81, set. 2016.

HERZOG, E. L.; CHAI, L.; KRAUSE, D. S. Plasticity of marrow-derived stem cells. **Blood Journal**, Washington, v. 102, n. 10, p. 3483-3493, 2003.

HOLZAPFEL, B. M. et al. Can bone tissue engineering contribute to therapy concepts after resection of musculoskeletal sarcoma? **Sarcoma**, London, v. 2013, p. 153640, jan. 2013.

HONMA, T. et al. Bone formation in rat calvaria ceases within a limited period regardless of completion of defect repair. **Oral Diseases**, Oxford, v. 14, n. 5, p. 457-464, jul. 2008.

HORWITZ, E. M. et al. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, Washington, v. 7, n. 5, p. 393-395, 2005.

HUANG, S. X. et al. The in vitro generation of lung and airway progenitor cells from human pluripotent stem cells. **Nature Protocols**, London, v. 10, n. 3, p. 413-425, mar. 2015.

HULSE, D. A.; JOHNSON, A. L. Diseases of the joints. In: FOSSUM, T. W. (ED.). **Small animal surgery**. 3rd ed. St. Louis: Mosby, 2007. p. 1143-1315.

JAÉN, M. L. et al. Long-Term Efficacy and Safety of Insulin and Glucokinase Gene Therapy for Diabetes: 8-Year Follow-Up in Dogs. **Molecular Therapy Methods Clinical Development**, Kuopio, v. 6, p. 1-7, 2017.

JAVAZON, E. H.; BEGGS, K. J.; FLAKE, A. W. Mesenchymal stem cells: paradoxes of passaging. **Experimental Hematology**, Vancouver, v. 32, n. 5, p. 414-425, 2004.

JIMÉNEZ-QUEVEDO, P.; GONZÁLEZ FERRER, J. J.; PÉRIN, E. What to do when everything has failed: alternative treatment strategies for failure revascularizations. **Eurointervention**. 2009 May; 5 Suppl D:D139-48. Review.

JORGENSEN, C. et al. Stem cells for repair of cartilage and bone: the next challenge in osteoarthritis and rheumatoid arthritis. **Annals Rheumatic Diseases**, London, v. 60, p. 305-309, 2001.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

KADIYALA, S.; JAISWAL, N.; BRUDER, S. P. Culture-expanded, bone marrow-derived mesenchymal stem cells can regenerate a critical-sized segmental bone defect. **Tissue engineering**. 3(2):173- 185, 1997a.

KANDEL, R. A. et al. Repair of osteochondral defects with biphasic cartilage-calcium

polyphosphate constructs in a Sheep model. **Biomaterials**, New York, v. 27, n. 22, p. 4120-4131, 2006.

KEMP, P. History of regenerative medicine: looking backwards to move forwards. **Regenerative Medicine**, London, v. 1, n. 5, p. 653-669, 2006.

KESSLER, D. A. et al. Regulation of somatic-cell therapy and gene therapy by the food and Drug Administration. **New England Journal of Medicine**, Waltham, v. 329, n. 16, p. 1169-1173, 1993.

KIM, J. W.; LEE, J. H.; LYOO, Y. S. The effects of topical mesenchymal stem cell transplantation in canine experimental cutaneous wounds. **Veterinary Dermatology**, Hatfield, v. 24, n. 2, p. 242-253, 2013.

KIM, Y. et al. Antioxidant and anti-inflammatory effects of intravenously injected adipose derived mesenchymal stem cells in dogs with acute spinal cord injury. **Stem Cell Research Therapy**, London, v. 26, n. 6, p. 229, 2015.

KIM, Y. et al. Transplantation of adipose derived mesenchymal stem cells for acute thoracolumbar disc disease with no deep pain perception in dogs. **Journal of Veterinary Science**, Seoul, v. 17, n. 1, p. 123-126, 2016.

KODIPPILI, K. et al. Dual AAV Gene Therapy for Duchenne Muscular Dystrophy with a 7-kb Mini-Dystrophin Gene in the Canine Model. **Human Gene Therapy**, New Rochelle, v. 4, n. 3, p. 299-311, 2017.

KREBSBACH, P. H. et al. Repair of craniotomy defects using boné marrow stromal cells. **Transplantation**, London, v. 66, n. 10, p. 1272-1278, 1998.

KRISTON-PÁL, É. et al. Characterization and therapeutic application of canine adipose mesenchymal stem cells to treat elbow osteoarthritis. **Canadian Journal of Veterinary Research**, Ottawa, v. 81, n. 1, p. 73-78, jan. 2017.

KUZNETOV, S. A. et al. Long-term stable canine mandibular augmentation using autologous boné marrow stromal cells and hydroxyapatite/tricalcium phosphate. **Biomaterials**, New York, v. 29, p. 4211-4216, 2008.

LEE, K. S.; NAH, J.-J.; LEE, B.-C.; LEE, H.T.; LEE, H.-S.; SO, B.-J.; CHA, S.-H. Maintenance and characterization of multipotent mesenchymal stem cells isolated from canine umbilical cord matrix by collagenase digestion. **Research in Veterinary Science** 94:144–151, 2013.

LEE, M. W. et al. Mesenchymal stem cells from cryopreserved human umbilical cord blood. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Cambridge, v. 320, n. 1, p. 273-278, 2004.

LEITE, M. Overcoming opposition, Brazil Banks on Stem Cells. **Science**, Washington, v. 324, p. 26, 2009.

LIMEIRA JÚNIOR, F. A. **Estudo do reparo de defeitos ósseos irradiados com laser**

λ830nm submetidos ou não a implante de hidroxiapatia sintética e/ou membrana de osso bovino. 2004. 150 f. Tese (Doutorado em Odontologia) - Universidade Federal da Paraíba, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2004.

LENNON, D.P. & CAPLAN, A.I. Isolation of rat marrow-derived mesenchymal stem cells. **Experimental Hematology**. 34:1606-1607, 2006.

LINDVALL, O.; HYUN, I. Medical innovation versus stem cell tourism. **Science**, Washington, v. 24, n. 5935, p. 1664-1665, jun. 2009.

LOMBELLO, C. et al. Study on human chondrocyte culture viability for autologous transplantation in clinical application. **Einstein**, São Paulo, v. 1, p. 84-88, 2003.

MARINS, L. V. et al. Radiographic and histological study of perennial boné defect repair in rat calvária after treatment with blocks of porous bovine organic graft material. **Journal of Applied Oral Science**, Bauru, v. 12, n. 1, p. 62-69, 2004.

MARTIN, D.R.; COX, N.R.; HATHCOCK, T.L.; NIEMEYER, G.P.; BAKER, H.J. Isolation and characterization of multipotential mesenchymal stem cells from feline bone marrow. **Experimental hematology**. 30:879-886, 2002.

MEIRELLES, L. S.; CHAGASTELLES, P. C.; NARDI, N. B. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. **Journal of Cell Science**, Cambridge, v. 119, n. 11, p. 2204-2213, 2006.

MINGUELL, J. J.; ERICES, A.; CONGET, P. Mesenchymal stem cells. **Experimental Biology and Medicine (Maywood, N.J.)**, Memphis, v. 226, n. 6, p. 507-520, 2001.

MONTEIRO, B.S. **Tratamento de defeitos críticos em calvária de camundongos com células-tronco mesenquimais associadas ou não ao plasma rico em plaquetas.** Tese (Doutorado Medicina Veterinária) – Departamento de Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, MG, 109p, 2009

MONTEIRO, B. S. et al. Associação de células-tronco mesenquimais com plasma rico em plaquetas na reparação de defeitos críticos em calvária de camundongos. **Acta Cirúrgica Brasileira**, São Paulo, v. 27, n. 3, p. 201-209, 2012.

MORETTI, A. et al. Patient-Specific induced Pluripotent Stem-Cell Models for Long-QT Syndrome. **The New England Journal of Medicine**, Waltham, n. 363, p. 1397-1409, jul. 2010.

MORIYAMA, H.; KASASHIMA, Y.; KUWANO, A. Anatomical location and culture of equine corneal epithelial stem cells. **Veterinary Ophthalmology**, Medford, v. 17, p. 106-112, 2014.

MOWAT, F. M. et al. Gene Therapy in a Large Animal Model of PDE6A-Retinitis Pigmentosa. **Frontiers Neuroscience**, Lausanne, v. 11, p. 342, 2017.

NADIG, R. R. Stem cell therapy: hype or hope? a review. **Journal of Conservative Dentistry**, Kolkata, v. 12, n. 4, p. 131-138, 2009.

NARDI, N.; MEIRELES, L. S. Mesenchymal stem cells: isolation, in vitro expansion and characterization. **Handbook of Experimental Pharmacology**, Berlin, v. 174, p. 249-282, 2006.

ODORICO, J. S.; KAUFMAN, D. S.; THOMSON, J. A. Multilineage differentiation from human embryonic stem cell lines. **Stem Cells**, Basel, v. 19, n. 3, p. 193-204, 2001.

OLIVEIRA, G. K. et al. Células-tronco mononucleares e proteína óssea morfogenética na cicatrização de defeitos tibiais experimentalmente induzidos em cães. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, MG, v. 62, n. 1, p. 72-79, 2010.

OTTO, W. R.; WRIGHT, N. A. Mesenchymal stem cells: from experiment to clinic. **Fibrogenesis & Tissue Repair**, England, v. 4, p. 20, 2011.

OWEN, M.; FRIEDENSTEIN, A. J. Stromal stem cells: marrow-derived osteogenic precursors. **Ciba Foundation Symposium**, Medford, v. 136, p. 42-60, 1988.

PACINI, S.; SPINABELLA, S.; TROMBI, L.; FAZZI, R.; GALIMBERTI, S.; DINI, F.; CARLUCCI, F.; PETRINI, M. Suspension of bone marrow-derived undifferentiated mesenchymal stromal cells for repair of superficial digital flexor tendon in race horses. **Tissue Engineering**. 13:2949–2955, 2007.

PAES, L. A. **Uso de células-tronco adultas derivadas do tecido adiposo (ADSCs) para reparo de lesões ósseas**: revisão de literatura. 2008. (Monografia de conclusão de curso em medicina Veterinária) - Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília, DF.

PEREIRA, L. da V. A importância do uso das células-tronco para a saúde pública. **Ciência & Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, v. 13, n. 1, p. 7-14, 2008.

PITTENGER, M. F. et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. **Science**, v. 284, Issue 5411, p. 143-147, 1999. Disponível em: <<http://www.sciencemag.org/cgi/content/abstract/284/5411/143>>. Acesso em: 18 jan. 2018.

PRANKE, P. A importância de discutir o uso de células-tronco embrionárias para fins terapêuticos. **Ciência e Cultura**, Campinas, v. 56, n. 3, p. 39-40, 2004.

PRATHEESH, M.D.; GADE, N. E.; KATIYAR, A. N.; DUBEY, P. K.; SHARMA, B.; SAIKUMAR, G.; AMARPAL; SHARMA, G.T. Isolation, culture and characterization of caprine mesenchymal stem cells derived from amniotic fluid. **Research in Veterinary Science**. 94:313–319, 2013.

PROCKOP, D. J. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. **Science**, Washington, v. 276, n. 5309, p. 71-74, 1997.

REED S. A.; JOHNSON S. E. 2012. Refinement of Culture Conditions for Maintenance of Undifferentiated Equine Umbilical Cord Blood Stem Cells. **Journal of Equine Veterinary Science**. 32:360-366, 2008.

REN, Y.; WU, H.; ZHOU, X.; WEN, J.; JIN, M.; CANG, M.; GUO, X.; WANG, Q.; LIU, D.; MA, Y. Isolation, expansion, and differentiation of goat adipose-derived stem cells. **Research in Veterinary Science**. 93:404–411, 2012

REZENDE, U. M.; HERNANDEZ, A. J.; CAMANHO, G. L. Articular cartilage and osteoarthritis. **Acta Ortopédica Brasileira**, São Paulo, v. 8, p. 100-104, 2000.

RIPAMONTI, U. et al. The induction of bone formation by coral-derived calcium carbonate/hydroxyapatite constructs. **Biomaterials**, New York, v. 30, p. 1428- 1429, 2009.

RODRIGUES, P. C. R. **Células-tronco e terapia regenerativa do tecido muscular cardíaco**. Rio de Janeiro: Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio, 2006

ROLIM, A. E. H. **Avaliação de microesferas de hidroxiapatita, dopadas ou não com estrôncio, no reparo de defeito crítico, em calvária de rato**. 2010. 91 f. Dissertação (Mestrado em Odontologia) - Faculdade de Odontologia, Universidade Federal da Bahia, Salvador.

ROSE, N. **A política da própria vida: biomedicina, poder e subjetividade no século XXI**. São Paulo: Paulus, 2013.

ROUWKEMA, J.; RIVRON, N. C.; VAN BLITTERSWIJK, C. A. Vascularization in tissue engineering. **Trends in biotechnology**, Cambridge, v. 26, n. 8, p. 434-41, ago. 2008.

SABATINI, F. et al. Human bronchial fibroblasts exhibit a mesenchymal stem cell phenotype and multilineage differentiating potentialities. **Laboratory Investigation**, Evans, v. 85, n. 8, p. 962-971, 2005.

SANTOS, E. J. C. Avaliação de diferentes vias de administração de células progenitoras adultas multipotentes visando sua utilização terapêutica no tratamento da diabete. **Revista Científica Multidisciplinar Núcleo do Conhecimento**, São Paulo, ano 2, v. 1. P. 1066-1075, jul. 2017b.

SATO, M. et al. Direct transplantation of mesenchymal stem cells into the knee joints of Hartley strain guinea pigs with spontaneous osteoarthritis. **Arthritis Research & Therapy**, London, v. 14, n. 1, p. R31, 2012.

SCHMIDT, M. B.; CHEN, E. H.; LYNCH, S. E. A review of the effects of insulin-like growth factor and platelet derived growth factor on in vivo cartilage healing and repair. **Osteoarthritis Cartilage**, Philadelphia, v. 14, p. 403-412, 2006.

SCHMITZ, J.; HOLLINGER, J. O. The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, Nova York, v. 205, p. 299-308, apr. 1986.

SCHMITZ, J. P. et al. Characterization of rat calvarial nonunion defects. **Acta Anatomica**, Atlanta, v. 138, n. 3, p. 185-192, 1990.

SCHNETTLER, R. et al. Enhancement of bone formation in hydroxyapatite implants by rhBMP-2 coating. **Journal of Biomedical Materials Research . Part B . Applied**

Biomaterials, Hoboken, v. 90, n. 1, p. 75-81, 2008.

SEAL, B. L.; OTERO, T. C.; PANITCH, A. Polymeric biomaterials for tissue and organ regeneration. **Material Science Engineering**, London, v. 34, n. 4/5, p. 147-230, oct. 2001.

SEO, B. M. et al. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. **The Lancet**, London, v. 364, n. 9429, p. 149-55, 2004.

SEO, J.-P.; TSUZUKI, N.; HANEDA, S.; YAMADA, K.; FURUOKA, H.; TABATA, Y.; SASAKI, N. Proliferation of equine bone marrow-derived mesenchymal stem cells in gelatin/btricalcium phosphate sponges. **Research in Veterinary Science**. 93:1481–1486, 2012.

SEO, J. TANABE, T.; TSUZUKI, N.; HANEDA, S. et al. Effects of bilayer gelatin/ β - 49 tricalcium phosphate sponges loaded with mesenchymal stem cells, chondrocytes, bone morphogenetic protein-2, and platelet rich plasma on osteochondral defects of the talus in horses. **Research in Veterinary Science**, London, v. 95, n. 3, p. 1210-1216, 2013.

SILVA JUNIOR, F.C. da; ODONGO, F. C. A.; DULLEY, F. L. Células- -tronco hematopoéticas: utilidades e perspectivas. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, London, v. 31, p. 53-58, 2009.

SILVEIRA, A. C. C.; LIMA, R. S.; PENHA, E. M.; MACAMBIRA, S. G.; SOARES, M. B. P.; RIBEIRO-DOSSANTOS, R.; BARROUIN-MELO, S. M.; AGUIAR, P. H. P. Harvest and characterization of mesenchymal canine stem cells from adipose tissue and bone marrow. In: 8th International Veterinary Immunology Symposium, Ouro Preto. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. 128:342, 2009.

SIROLA, K. Regeneration of defects in the calvária: na experimental study. **Annales Medicinæ Experimentalis et Biologiae Fenniae**, Finland, v. 38, supl. 2, p. 1-87, 1960.

SLACK, J. M. Stem cells in epithelial tissues. **Science**, Washington, v. 287, n. 5457, p. 1431-1433, 2000.

SOLE, A.; SPRIET, M.; GALUPPO, L.D.; PADGETT, K.A.; BORJESSON, D.L.; WISNER, E.R.; BROSANAN, R.J.; VIDAL, M.A. Scintigraphic evaluation of intraarterial and intravenous regional limb perfusion of allogeneic bone marrowderived mesenchymal stem cells in the normal equine distal limb using (99 m) TcHMPAO. **Equine Veterinary Journal**. 44, 594–599, 2012.

SOUSA, T. D.; DEL CARLO, R. J.; VILORIA, M. I. V. Histologic evaluation of the repair process in the articular surface of rabbits. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 30, p. 439-444, 2000.

SOUZA, M. H. L.; ELIAS, D. O. **As Células-tronco e o seu potencial na reparação de órgãos e tecidos, manual de instrução programada: princípios de hematologia e hemoterapia**. 2. ed. Rio de Janeiro: Centro Editorial Alfa Rio, 2005.

SUNG, J.H.; YANG, H.-M.; PARK, J.B.; CHOI, G.-S.; JOH, J.-W, KWON, C.H.; CHUN, J.M., LEE, S.-K.; KIM, S.-J. Isolation and characterization of mouse mesenchymal stem cells.

Transplantation proceedings. 40:2649-2654, 2008.

TAKAHASHI, K. et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. **Cell**, v. 131, p. 1-12, 2007. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18035408> >. Acesso em: 28 jan. 2018.

THOMSON, J. A. et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. **Science**, Washington, v. 482, p. 1145-1147, 1998.

TODHUNTER, R. J.; JOHNSTON, S. A. Osteoarthritis. In: SLATTER, D. (Ed.). **Textbook of small animal surgery**. 3rd ed. Philadelphia: WB Saunders, 2003. Cap. 6, p. 2208-2245.

TORTORA, G. J. et al. **Princípios de anatomia e fisiologia**. 12. ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 2010. 1256 p.

TRIPPEL, S. B.; MANKIN, H. J. Articular cartilage injury and repair. In: SILISKY, J. M. (Ed.). **Traumatic disorders of the knee**. New York: Springer Verlag, 1994. p. 19-36.

TRZIL, J. E.; MASSEAU, I.; WEBB, T. L. Intravenous adipose-derived mesenchymal stem cell therapy for the treatment of feline asthma: a pilot study. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, Sydney, v. 18, n. 12, p. 981-990, sep. 2015.

VISCONDI, E. S. et al. Células-tronco em pequenos animais. **Enciclopédia Biosfera**, Goiânia, v. 9, n. 16, p. 635-636, 2013. Centro Científico Conhecer.

WALDMAN, S. D. et al. Effect of biomechanical conditioning on cartilaginous tissue formation in vitro. **Journal Bone Joint Surgery**, Needham, v. 85-A, p. 101-105, 2003.

WANG, S. et al. Vertical alveolar ridge augmentation with β -tricalcium phosphate and autologous osteoblasts in canine mandible. **Biomaterials**, New York, v. 22, p. 1599-1606, 2001.

WEI Y, H. U. H. et al. Cartilage regeneration of adipose-derived stem cells in a hybrid scaffold from fibrin-modified PLGA. **Cell Transplantation**, Tampa, v. 18, p. 159-170, 2009.

YAMAMOTO, N.; AKAMATSU, H.; HASEGAWA, S.; YAMADA, T.; NAKATA, S.; OHKUMA, M.; MIYACHI, E.-I.; MARUNOUCHI, T.; MATSUNAGA, K. Isolation of multipotent stem cells from mouse adipose tissue. **Journal of Dermatological Science**. 48(1):43-52, 2007.

YOUNG, H. E. et al. Human reserve pluripotent mesenchymal stem cells are present in the connective tissues of skeletal muscle and dermis derived from fetal, adult, and geriatric donors. **The Anatomic Records**, Utah, v. 264, n. 1, p. 51-62, 2001.

ZHANG, Q. et al. Stem cells and cardiovascular tissue repair: mechanism, methods, and clinical applications. **Journal of Cardiothoracic-Renal Research**, London, v. 1, p. 3-14, 2006.

ZORZANELLI, R. T. et al. Pesquisa com células-tronco no Brasil: a produção de um novo campo científico. **História, Ciências, Saúde – Manguinhos**, Rio de Janeiro, v. 24, n. 1,

p.129-144, jan./mar. 2017.

ZUK, P. A. et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. **Tissue Engineering**, Missoure, v. 7, n. 2, p. 211-228, 2001.