

Células-Tronco de Tecido Adiposo e a Importância da Padronização de um Modelo Animal para Experimentação Pré-Clínica

Marília Sanches Santos Rizzo Zuttion¹, Cristiane Valverde Wenceslau²,
Pedro A. Lemos³, Celso Takimura⁴, Irina Kerkis⁵

RESUMO

As células-tronco são células indiferenciadas, capazes de se autorrenovar e de se diferenciarem em diversos tipos celulares, além de apresentarem propriedades imunomoduladoras e efeitos parácrinos mediante injúria tecidual, podendo, dessa forma, tratar lesões e doenças ou ainda substituir células danificadas ou perdidas. Dentre as fontes de células-tronco adultas, o tecido adiposo é uma fonte atrativa, pois o organismo humano possui grande reserva desse tecido, que, por sua vez, é obtido em grandes quantidades por meio de métodos pouco invasivos. O interesse nessas células vem aumentando constantemente devido a suas propriedades e possíveis aplicações na medicina regenerativa e terapia celular. Grande parte dessas pesquisas está voltada para doenças cardiovasculares, que são a principal causa de morbidade e mortalidade em todo o mundo. Embora nos últimos anos, os tratamentos em cardiologia tenham avançado, o desenvolvimento de novas terapias que recuperem o tecido danificado ainda permanece como um dos objetivos principais das pesquisas cardíacas. Porém, para obter resultados eficazes, é necessária a padronização de modelos animais *in vivo* e *in vitro* para estudos pré-clínicos e, conseqüentemente, a aplicação em humanos. O desenvolvimento de modelos pré-clínicos em animais de grande porte exige o uso bem caracterizado de linhagens de células animais semelhantes aos seus equivalentes humanos. O modelo suíno representa uma grande vantagem para a investigação translacional pré-clínica.

DESCRIPTORES: Células-tronco. Tecido adiposo. Doenças cardiovasculares. Suínos. Modelos animais.

ABSTRACT

Adipose Tissue-Derived Stem Cells and the Importance of Animal Model Standardization for Pre-Clinical Trials

Stem cells are undifferentiated cells and can self-renew and differentiate into various cell types, besides having immunomodulating properties and paracrine effects in response to tissue injury, and may therefore treat injuries and diseases or even replace damaged or lost cells. Adipose tissue is an attractive source of adult stem cells, since the human body has a large reserve that is obtained in large amounts by minimally invasive methods. Interest in these cells has been increasing steadily due to their properties and possible applications in regenerative medicine and cell therapy. A large part of these investigations are focused on cardiovascular diseases, which are a leading cause of morbidity and mortality worldwide. Although in recent years treatments have advanced in cardiology, the development of new therapies to recover the damaged tissue still remains one of the main goals of cardiac research. However, to achieve effective results, *in vivo* and *in vitro* animal models for preclinical studies and consequently for application in humans must be standardized. The development of preclinical models in large animals requires the use of well-characterized animal cell lines, similar to human cells, and the use of the porcine model represents a great advantage for preclinical translational research.

DESCRIPTORS: Stem cells. Adipose tissue. Cardiovascular diseases. Swine. Models, animal.

¹ Pós-graduanda (Doutorado) do Departamento de Biologia Estrutural e Funcional da Universidade Federal de São Paulo. São Paulo, SP, Brasil.

² Pós-doutoranda do Departamento de Biologia Estrutural e Funcional da Universidade Federal de São Paulo. São Paulo, SP, Brasil.

³ Livre-docente. Diretor do Serviço de Hemodinâmica e Cardiologia Intervencionista do Instituto do Coração do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. São Paulo, SP, Brasil.

⁴ Doutor. Médico pesquisador do Instituto do Coração do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. São Paulo, SP, Brasil.

Correspondência: Irina Kerkis. Laboratório de Genética do Instituto Butantan – Av. Vital Brasil, 1.500 – São Paulo, SP, Brasil – CEP 05503-900
E-mail: ikerkis@butantan.gov.br

Recebido em: 28/3/2013 • Aceito em: 8/8/2013

Fonte de financiamento: Marília Sanches Santos Rizzo Zuttion é bolsista da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

As células-tronco (CT) são células indiferenciadas e definidas por sua capacidade de autorrenovação e diferenciação para diversos tipos celulares. Nesses processos de autorrenovação e diferenciação, as CT podem seguir dois diferentes tipos de divisão: (1) divisão simétrica, na qual a CT gera uma nova CT e uma célula progenitora e (2) divisão assimétrica, na qual a CT gera células diferenciadas.¹ Esse processo ocorre mantendo a homeostase do tecido e o nicho das CT ativo. Os nichos são microambientes fisiológicos, que consistem em células especializadas, que sinalizam e fornecem moléculas da superfície celular para controlar a taxa de proliferação de CT, determinando a diferenciação das células progenitoras e protegendo as CT da apoptose. Essa interação recíproca entre as CT e o nicho ocorre nas fases iniciais do desenvolvimento embrionário e é mantida durante a vida adulta, sendo essencial para a ontogênese e reparação tecidual.²

As CT são divididas em dois tipos principais, de acordo com sua origem e plasticidade. As CT podem ter origem embrionária, ou seja, são isoladas do zigoto ou da massa celular interna do blastócito, e as adultas são derivadas do organismo adulto. No que se refere à capacidade dessas células em originar tecidos do organismo, as CT embrionárias (CTE) são classificadas como pluripotentes, ou seja, são capazes de derivar todos os tipos celulares do organismo; já as adultas possuem um potencial de diferenciação ainda mais restrito, sendo classificadas como multipotentes.

As CT adultas (CTA) foram primeiramente descritas por Friendstein, em 1970, que isolou *in vitro* células estromais da medula óssea de camundongo. Em seu estudo, ele demonstrou as características morfológicas, de expansão e de diferenciação celular.³ Mais tarde, em diferentes condições de cultura, observou-se que as CTA da medula óssea foram capazes de se diferenciarem em osteoblastos, condrócitos e adipócitos.⁴ Com base nessa capacidade de diferenciação em diversos tipos celulares, Caplan propôs, em 1991, o termo “célula-tronco mesenquimal” (CTM), do inglês *mesenchymal stem cell*.⁵

A fonte de CTM mais estudada é a medula óssea. As CTM da medula óssea, que representam uma rara subpopulação (< 0,01% das células mononucleares da medula óssea), são um grupo de células clonogênicas, presentes no estroma medular e capazes de se diferenciarem não somente em células de origem mesodérmica, mas também em outros tipos celulares não mesodérmicos, como os neurais e os hepatócitos.⁶

As CTA são denominadas multipotentes e, ao contrário do que se acreditava inicialmente, não estão envolvidas apenas no processo de reparação e homeostase dos tecidos dos quais são isoladas, mas também possuem diversos efeitos parácrinos, que contribuem para a recuperação e a regeneração de outros tipos celulares e tecidos do organismo,⁷ pois essas células

produzem e secretam uma ampla variedade de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento que atuam de forma parácrina na regeneração do tecido *in vivo*.⁸

CARACTERIZAÇÃO CELULAR

Para que uma população de células seja considerada CT, ela deve obedecer a no mínimo três pré-requisitos segundo a *International Society for Cellular Therapy*:

1. serem plástico-aderentes quando mantidas em condições de cultura;

2. serem positivas para CD105, CD73 e CD90, e negativas para CD45, CD34, CD14, CD11b, CD79 ou CD19 e HLA-DR.⁹ Contudo, dependendo da fonte da qual são obtidas, métodos de isolamento celular e características da cultura, a expressão desses marcadores pode ocorrer de forma variada. As CTA também podem expressar outras proteínas de superfície como: CD44, CD71 (receptor de transferrina), Stro-1, fibronectina, vimentina, CD73 (ecto-5'-nucleotidase, SH3 e SH4), entre outras.^{10,11} Ainda são necessários mais estudos para elucidar a variabilidade de expressão de diversos marcadores;

3. serem capazes de se diferenciarem em osteoblastos, condrócitos e adipócitos.⁹

FONTES DE CTM

Como visto anteriormente, a medula óssea é a fonte mais comum de CTM,¹² porém populações similares também foram obtidas de outras fontes, como o sangue do cordão umbilical, placenta, líquido amniótico, derme, fígado, baço,¹³ polpa dentária¹⁴ e tecido adiposo.¹⁵

Dentre essas fontes, destaca-se o tecido adiposo, que oferece mais vantagens, em comparação a outras fontes, por apresentar baixo risco para doadores, elevado número de CTM (é possível coletar de 100 mL até 1 L de tecido adiposo) e por ser capaz de manter seu potencial proliferativo de oito a dez passagens sem qualquer deterioração detectável em sua capacidade de autorrenovação, além da ausência de rejeição imunológica.¹⁶

O TECIDO ADIPOSE

O tecido adiposo é de origem mesodérmica e contém uma população celular estromal heterogênea. O mesoderma surge durante a gastrulação como camada média, entre o endoderma e ectoderma. O mesoderma embrionário dá origem a vários tipos de músculos - incluindo o cardíaco, todo tecido conjuntivo, os vasos sanguíneos e o sangue e vasos linfáticos.¹⁵ Historicamente, o tecido adiposo era considerado um reservatório metabólico de armazenamento e liberação de substratos de energia na forma de triglicérides e colesterol, bem como as vitaminas lipossolúveis. Em meados dos anos 1980, esse conceito foi modificado,

a partir da identificação de sua atuação na fisiologia sexual por meio dos esteroides sexuais.¹⁷ O tecido adiposo é um dos componentes do tecido conjuntivo com importantes funções, como fornecer rigidez e resistência aos tecidos, manter a homeostase térmica e auxiliar na estática visceral. Em mamíferos, o tipo de tecido adiposo predominante é o branco, em comparação ao tecido adiposo marrom, que é presente em recém-nascidos, mas praticamente ausente em adultos.¹⁸ Esse tecido se distribui no organismo como tecido adiposo branco subcutâneo e tecido adiposo branco visceral, consistindo em adipócitos maduros, pré-adipócitos, fibroblastos, células musculares lisas vasculares, células endoteliais, monócitos e macrófagos residentes e linfócitos.¹⁹

Segundo Zannettino et al.², o nicho das CTM de tecido adiposo localiza-se na região perivascular, sendo composto pelos vasos sanguíneos em associação com células de tecido conjuntivo, adiposas, estromais, diversos progenitores e CT (Figura 1). É possível dizer que o nicho das CT do tecido adiposo é perivascular. Embora o termo “perivascular” signifique “em torno dos vasos sanguíneos”, as CT do tecido adiposo também foram encontradas no interior dos vasos, fazendo parte dos componentes da parede dos vasos sanguíneos. No entanto, devido à falta de marcadores específicos, a exata localização e a identidade celular ainda são elusivas.

A rede vascular desempenha um papel na adipogênese. Durante o desenvolvimento embrionário, a formação de capilares é uma fase decisiva e específica no desenvolvimento dos lóbulos de gordura e uma vascularização adequada é necessária para um ótimo funcionamento do tecido adiposo, como um órgão metabólico e endócrino. Além disso, as células da linhagem adipogênica secretam potentes fatores

angiogênicos, como a monobutirina, o fator de crescimento endotelial vascular, a leptina e a adiponectina. E, finalmente, os fatores antiangiogênicos promovem a perda do tecido adiposo, demonstrando, assim, a importância da angiogênese para a manutenção da adipogênese.²⁰⁻²² Contudo, grandes quantidades de CT podem ser isoladas dessa fração vascular com o método de digestão enzimática.

ISOLAMENTO DAS CTM DE TECIDO ADIPOSE

Martin Rodbell,²³ em 1964, estabeleceu o método de isolamento *in vitro* de adipócitos maduros e progenitores adipogênicos do tecido adiposo de ratos. Em seu protocolo, esse tecido foi fragmentado e digerido com a enzima colagenase tipo I a 37°C e, em seguida, o material foi centrifugado. O sobrenadante continha adipócitos maduros e o *pellet* continha componentes da fração do estroma vascular, incluindo as células progenitoras dos adipócitos, além de células de linhagem hematopoiética.

Como em muitos campos de rápido desenvolvimento, uma série de denominações tem sido utilizada para descrever a população de células aderentes, isoladas a partir da digestão enzimática por colagenase do tecido adiposo, tais como lipoblasto, pericito, pré-adipócito, processado do lipoaspirado, CT estromal derivada do tecido adiposo, CTA derivada do tecido adiposo, célula estromal adulta derivada do tecido adiposo, CT multipotente derivada do tecido adiposo e CTM do tecido adiposo (Figuras 2A a 2C). A *International Fat Applied Technology Society* (IFATS) propôs, em Pittsburgh, uma nomenclatura padronizada em 2004, adotando o termo “ASC” do inglês “*adipose stem cells*”, para se referir à população de células multipotentes aderentes isoladas da fração do estroma vascular.²⁴ As CTM do tecido adiposo foram isoladas e caracterizadas em humanos e em espécies animais.^{13,25-30}

CTM DO TECIDO ADIPOSE

Similarmente à medula óssea, as CT do tecido adiposo têm um amplo potencial de diferenciação nos variados tipos celulares, como adipogênica, condrogênica, osteogênica (Figura 2D a 2F), miogênica, angiogênica, neurogênica, miogênica e cardiomiogênica.³¹ No entanto, a taxa de sucesso de isolamento é de 100% e o rendimento do tecido adiposo é 40 vezes maior que a medula óssea.³² Além disso, a quantidade de células não parece diminuir com a idade, tornando esse tipo de célula atraente para o isolamento de CTM e progenitores.³³

As CTM possuem a capacidade de se acumular ao redor de processos inflamatórios quando administradas *in vivo*, devido às suas propriedades quimiotáticas. Por esse motivo, essas células podem ser utilizadas em diversas áreas como, por exemplo, na terapia regenerativa.⁷ Atualmente, células com características

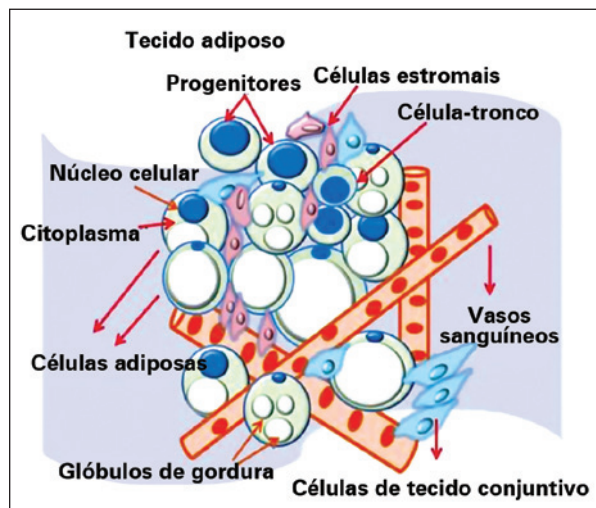


Figura 1. Ilustração do nicho das células-tronco adultas do tecido adiposo. Fonte: Irina Kerkis.

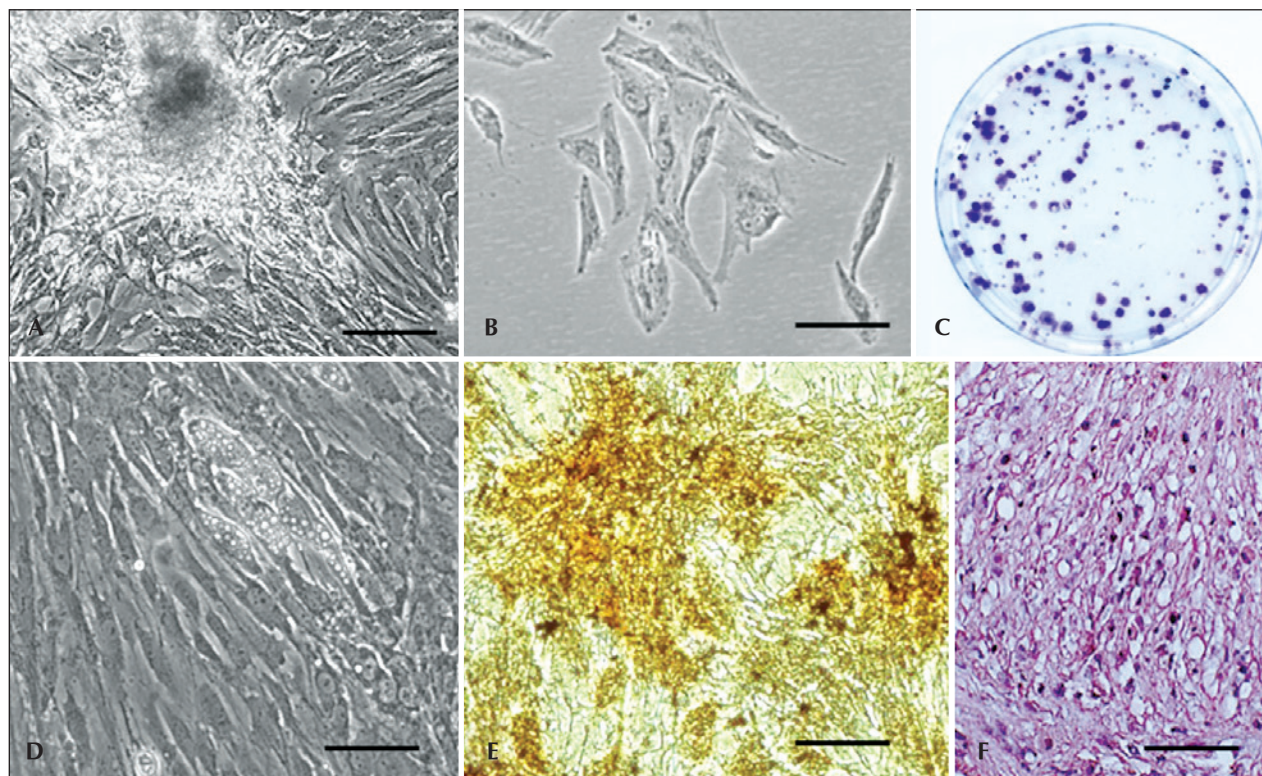


Figura 2. Células-tronco de tecido adiposo de suínos. (A) Isolamento das células-tronco de tecido adiposo. (B) Morfologia das células-tronco de tecido adiposo. (C) Ensaio de unidade formadora de colônias nas células-tronco de tecido adiposo. (D) Diferenciação adipogênica. Notam-se as células com gotas de lipídios. (E) Diferenciação osteogênica (coloração de Von Kossa); pode-se observar mineralização. (F) Coloração com hematoxilina e eosina demonstrando a diferenciação condrogênica. Escala de barras: A = 20 μ m; B a F = 10 μ m. A, B e D = contraste de fase. C, E e F = microscopia de luz. Fonte: Zuttion et al., 2013 (dados não publicados).

semelhantes às CTM de humanos foram isoladas *in vitro* a partir de diversos animais (suínos,³⁴⁻³⁸ cão³⁹ e ovinos⁴⁰). Esses animais são frequentemente utilizados nas pesquisas de medicina regenerativa como modelo animal para as doenças osteoarticulares,⁴¹ lesão medular espinal⁴² e infarto do miocárdio.³⁷

MEDICINA REGENERATIVA

Como comprovado anteriormente, as CTM de tecido adiposo exibem abundante capacidade de expansão *in vitro* e, mais importante do que isso, podem derivar células de diversas linhagens celulares e até mesmo cardiomiócitos,^{32,43} além de não haver questionamento ético quanto à sua utilização. Por isso, o tecido adiposo tornou-se uma fonte de CTM muito atrativa para a medicina regenerativa e uma das áreas em que essas células estão sendo muito empregadas é a na Cardiologia.⁶

A maior porcentagem de mortes no mundo por doenças não transmissíveis é causada por doença cardiovascular (48%), como, por exemplo, infarto do miocárdio e insuficiência cardíaca congestiva.⁴⁴ Outras doenças também são causas de disfunção miocárdica, como a doença de Chagas e outras cardiomiopatias.⁴⁵

Avanços nos tratamentos de doenças cardiovasculares decorrem, em parte, de um aperfeiçoamento das técnicas de revascularização coronária, desenvolvimento de marca-passos cardíacos e implante de desfibriladores. Com exceção do transplante cardíaco, essas opções de tratamento são limitadas por sua incapacidade de substituir cardiomiócitos perdidos e cicatrizes do miocárdio, e isso se agrava pela incapacidade do coração de substituir sua massa celular por meio da autorrenovação. Novas abordagens de tratamento são necessárias⁴⁶ e, como alternativa, tem sido proposto o uso da terapia com CT, para gerar novos cardiomiócitos.⁴⁷ Alguns estudos demonstraram a capacidade das CTM de tecido adiposo e medula óssea em se diferenciarem em cardiomiócitos.⁴⁸⁻⁵⁰ Contudo, em certos estudos, observou-se que a diferenciação das CTM em cardiomiócitos, quando injetadas no músculo cardíaco, é um evento raro, constatando que as CTM não são capazes de gerar cardiomiócitos em quantidades suficientes para reparar uma lesão no miocárdio.⁵¹ Entretanto, as CTM possuem uma propriedade não apenas autócrina, mas também parácrina, ou seja, as CTM, quando injetadas, secretam fatores (fator de crescimento vascular endotelial, fator de crescimento de fibroblasto básico, fator de crescimento dos hepatócitos, fator de crescimento

semelhante à insulina tipo 1 e adrenomedulina), que desempenham um papel antiapoptótico, pró-angiogênico e efeito reparador endógeno, além de exercer uma ação parácrina diretamente nos cardiomiócitos, aumentando sua taxa de sobrevivência.⁵²

Outro processo biológico importante influenciado pelas CTM por meio de seus efeitos parácrinos é a neovascularização. Recentes estudos pré-clínicos em ratos com fraturas em fêmur demonstraram o potencial angiogênico das CT derivadas do tecido adiposo de humanos. Após o transplante de CTA, ocorreu o aumento da angiogênese e da neovascularização ao redor da área de ossificação endocondral e um significativo aumento da densidade capilar.⁵³ Em um outro estudo utilizando o porco como modelo animal, foi demonstrado que, 8 semanas após o transplante intramiocárdico de CTM, houve a melhora da função ventricular esquerda. Os pesquisadores observaram que, após a primeira semana do transplante, houve melhora do fluxo sanguíneo miocárdico durante a diástole, o que foi diretamente relacionado ao aumento do tamanho dos vasos sanguíneos. Esses resultados apontaram o processo de neovascularização como consequência de significativa cardiomiogênese.⁵⁴ Isso ocorre devido à produção e à secreção pelas CTM de fatores como óxido nítrico, fator de crescimento vascular endotelial, fator de crescimento de fibroblasto básico, fator de crescimento dos hepatócitos e angiopoietina, entre outros. A ação desses fatores acarreta migração e proliferação das células endoteliais, e de células musculares lisas vasculares; e aumento e maturação dos vasos; e síntese de matriz extracelular. Desse modo, as CTM atuam na melhora da densidade capilar e na formação de vasos colaterais.⁷ Porém, apesar de muitas pesquisas em relação ao potencial de diferenciação dessas células em cardiomiócitos, ainda são necessários estudos para a compreensão desses mecanismos.

MODELO ANIMAL UTILIZADO EM PESQUISAS COM CT

Desde muitos anos atrás até os dias de hoje, as mais variadas espécies de animais têm sido usadas como objetos de experimentação em pesquisas científicas, a fim de se descobrirem medidas profiláticas ou tratamento de inúmeras doenças que afetam os seres vivos.^{55,56} Por volta de 1865, Claude Bernard⁵⁷ iniciou a utilização dos animais como modelo de estudo e transposição dos conhecimentos adquiridos para a compreensão da fisiologia humana. Em seu estudo, Bernard⁵⁷ acarretava alterações físicas e químicas que ocasionavam alterações nos animais semelhantes a doenças em humanos. Animais de pequeno porte (camundongo, rato, *hamster* ou gerbil) compreendem mais de 90% do total de espécies usadas em laboratórios,⁴⁸ mas o modelo ideal para uso nas pesquisas seria aquele que se assemelhasse em suas características fisiológicas, anatômicas e orgânicas ao ser humano, o que implica na eficiência das conclusões obtidas.⁵⁷

Diante desse fato, muitos resultados em pesquisas com CT são inconclusivos devido à prática do xenotransplante (transplante de órgão ou células entre espécies diferentes), pois essas células são isoladas normalmente de seres humanos^{58,59} e transplantadas em outra espécie, o que dificulta o estudo e o entendimento da ação delas no organismo. Além disso, poucos animais são semelhantes ao organismo humano, o que prejudica ainda mais o entendimento das CT. Desse modo, seria ideal um modelo animal que fosse semelhante em anatomia, fisiologia e fisiopatologia aos seres humanos. Segundo Bustard e McClellan⁶⁰, o porco (*Sus scrofa domestica*) apresenta similaridades com o homem no que diz respeito à odontologia, morfologia e fisiologia renal, acuidade visual, estrutura do olho, fisiologia e morfologia da pele, fisiologia e anatomia cardiovascular, fisiologia e anatomia digestiva e imunologia. Essas semelhanças são mais distantes quando comparadas com outros modelos, como o cão, o rato, os camundongo e outras espécies utilizadas em pesquisas.⁵⁶ Segundo Tumbleson,⁶¹ o suíno é um modelo eficaz para estudos em pesquisas biomédicas, pois, além de apresentar estrutura e funções semelhantes ao humano, apresenta similaridade com o tamanho, padrão de alimentação, fisiologia digestiva, hábitos dietéticos, estrutura e funções do rim, estrutura vascular do pulmão, distribuição das artérias coronárias, propensão para a obesidade, frequência respiratória e comportamento social, sendo um modelo animal flexível para determinar as exposições crônicas e agudas ao álcool, cafeína, tabaco, aditivos alimentares e poluentes do ambiente.

Em relação às CTM do tecido adiposo, o modelo suíno seria ideal, pois, além de todas as semelhanças com o humano encontradas nesse animal, ele apresenta uma grande reserva de gordura,⁶¹ facilitando o isolamento das CTM de tecido adiposo e o transplante autólogo ou heterólogo (transplantes de órgãos ou células entre a mesma espécie), a fim de avaliar o mecanismo de ação dessas células e das CTM de humanos.

CT DE TECIDO ADIPOSEO DE SUÍNO

Diversos autores realizaram o isolamento de CT do tecido adiposo de suínos. Tais células demonstraram potencial de diferenciação em diferentes linhagens mesodermiais como osso, cartilagem, gordura, músculo e cardiomiócitos, e expressaram diferentes marcadores de CT, apresentando similaridades com CTM de tecido adiposo de humanos.³⁴⁻³⁸ Interessantemente, o suíno já é bastante utilizado nessa área no que se refere ao implante de dispositivos endovasculares, como os stents.^{62,63} Entretanto é um ótimo modelo pré-clínico para testar o efeito das CT especificamente na área de CT aplicadas a doenças cardiovasculares.

Além disso, essas células isoladas de suínos foram parcialmente caracterizadas em relação à expressão dos marcadores de CTM, sendo difícil, portanto, comparar

os benefícios dessas células em um organismo que não seja semelhante ao organismo humano.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

As CTM isoladas do tecido adiposo apresentam um amplo potencial de diferenciação e podem ser facilmente obtidas e em grandes quantidades por meio de métodos pouco invasivos e dolorosos. Além disso, essas células são capazes de promover a imunomodulação do sistema imune e possuem um efeito parácrino capaz de mobilizar moléculas, a fim de regenerar um tecido lesionado. Contudo, grande parte das pesquisas que estudam CT é limitada, em razão do uso de xenotransplantes e da escassez de padronização do modelo animal anatômica e fisiologicamente próximo do organismo humano, como, por exemplo, o porco. Portanto, faz-se necessário um maior conhecimento do mecanismo de ação dessas células em um ambiente fisiológico, que reproduza o organismo humano. Esse fato faz com que algumas aplicações clínicas e terapêuticas das CT ainda sejam incertas. Em resumo, a expectativa da medicina regenerativa baseada na aplicação de CT depende do conhecimento do mecanismo dessas células e de seus efeitos no organismo, assim como das moléculas, dos fatores e das cascatas de sinalização que controlam a sobrevivência e a proliferação celulares - mediante o contato com as CT. Portanto, a aplicabilidade delas depende, em grande parte, da utilização dos modelos adequados e de CT bem caracterizadas. Múltiplas soluções deverão surgir a partir das tecnologias crescentes na área de CT e da medicina regenerativa. Diversas inovações mudarão a prática da medicina pelo reconhecimento de que as células vivas são capazes de executar uma série de funções que os fármacos não podem proporcionar.

CONFLITO DE INTERESSES

Os autores declaram não haver conflito de interesses relacionado a este manuscrito.

REFERÊNCIAS

1. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*. 1998;282(5391):1145-47.
2. Zannettino AC, Paton S, Arthur A, Khor F, Itescu S, Gimble JM, et al. Multipotential human adipose-derived stromal stem cells exhibit a perivascular phenotype in vitro and in vivo. *J Cell Physiol*. 2008;214(2):413-21.
3. Friedenstein AJ, Chailakhjan RK, Lalykina KS. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet*. 1970;3(4):393-403.
4. Dennis JE, Charbord P. Origin and differentiation of human and murine stroma. *Stem Cells*. 2002;20(3):205-14.
5. Caplan AI. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res*. 1991;9(5):641-50.
6. Blydlowski SP, Debes AA, Maselli LMF, Janz FL. Características biológicas das células-tronco mesenquimais. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2009; 31 Supl.1:25-35.
7. Souza CF, Napoli P, Han SW, Lima VC, Carvalho ACC. Células-tronco mesenquimais: células ideais para a regeneração cardíaca. *Rev Bras Cardiol Invasiva*. 2010;18(3):344-53.
8. Caplan AI, Dennis JE. Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *J Cell Biochem*. 2006;98(5):1076-84.
9. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8(4):315-7.
10. Gronthos S, Franklin DM, Leddy HA, Robey PG, Storms RW, Gimble JM. Surface protein characterization of human adipose tissue-derived stromal cells. *J Cell Physiol*. 2001;189(1):54-63.
11. Sabatini F, Petecchia L, Taviani M, Jodon de Villeroché V, Rossi GA, Brouty-Boyé D. Human bronchial fibroblasts exhibit a mesenchymal stem cell phenotype and multilineage differentiating potentialities. *Lab Invest*. 2005;85(8):962-71.
12. Conget PA, Minguell JJ. Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells. *J Cell Physiol*. 1999;181(1):67-73.
13. Bianco P, Cossu G. Uno, nessuno e centomila: searching for the identity of mesodermal progenitors. *Exp Cell Res*. 1999;251(2):257-63.
14. Kerkis I, Caplan AI. Stem cells in dental pulp of deciduous teeth. *Tissue Eng Part B Rev*. 2012;18(2):129-38.
15. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng*. 2001;7(2):211-28.
16. Gruber HE, Somayaji S, Riley F, Hoelscher GL, Norton HJ, Ingram J, et al. Human adipose-derived mesenchymal stem cells: serial passaging, doubling time and cell senescence. *Biotech Histochem*. 2012;87(4):303-11.
17. Rada T, Reis RL, Gomes ME. Adipose tissue-derived stem cells and their application in bone and cartilage tissue engineering. *Tissue Eng Part B Rev*. 2009;15(2):113-25.
18. Lin CS, Xin ZC, Deng CH, Ning H, Lin G, Lue TF. Defining adipose tissue-derived stem cells in tissue and in culture. *Histol Histopathol*. 2010;25(6):807-15.
19. Schäffler A, Büchler C. Concise review: adipose tissue-derived stromal cells basic and clinical implications for novel cell-based therapies. *Stem Cells*. 2007;25(4):818-27.
20. Lin G, Garcia M, Ning H, Banie L, Guo YL, Lue TH, et al. Tissue-engineered skin containing mesenchymal stem cells improves burn wounds. *Artif Organs*. 2008;32(12):925-31.
21. Rupnick MA, Panigrahy D, Zhang CY, Dallabrida SM, Lowell BB, Langer R, et al. Adipose tissue mass can be regulated through the vasculature. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(16):10730-5.
22. Ouchi N, Kobayashi H, Kihara S, Kumada M, Sato K, Inoue T, et al. Adiponectin stimulates angiogenesis by promoting cross-talk between AMP-activated protein kinase and Akt signaling in endothelial cells. *J Biol Chem*. 2004;279(2):1304-9.
23. Rodbell M. Localization of lipoprotein lipase in fat cells of rat adipose tissue. *J Biol Chem*. 1964;239:753-5.
24. Daher SR, Johnstone BH, Phinney DG, March KL. Adipose stromal/stem cells: basic and translational advances: the IFATS collection. *Stem Cells*. 2008;26(10):2664-5.
25. Kingham PJ, Kalbermatten DF, Mahay D, Armstrong SJ, Wiberg M, Terenghi G. Adipose-derived stem cells differentiate into a Schwann cell phenotype and promote neurite outgrowth in vitro. *Exp Neurol*. 2007;207(2):267-74.
26. Yoshimura H, Muneta T, Nimura A, Yokoyama A, Koga H, Sekiya I. Comparison of rat mesenchymal stem cells derived from bone marrow, synovium, periosteum, adipose tissue, and muscle. *Cell Tissue Res*. 2007;327(3):449-62.

27. Peptan IA, Hong L, Mao JJ. Comparison of osteogenic potentials of visceral and subcutaneous adipose-derived cells of rabbits. *Plast Reconstr Surg.* 2006;117(5):1462-70.
28. Torres FC, Rodrigues CJ, Stocchero IN, Ferreira MC. Stem cells from the fat tissue of rabbits: an easy-to-find experimental source. *Aesthetic Plast Surg.* 2007;31(5):574-8.
29. Mambelli LI, Santos EJ, Frazão PJ, Chaparro MB, Kerkis A, Zoppa AL, et al. Characterization of equine adipose tissue-derived progenitor cells before and after cryopreservation. *Tissue Eng Part C Methods.* 2009;15(1):87-94.
30. Mohammadi-Sangcheshmeh A, Shafiee A, Seyedjafari E, Dinarvand P, Toghdy A, Bagherizadeh I, et al. Isolation, characterization, and mesodermic differentiation of stem cells from adipose tissue of camel (*Camelus dromedarius*). *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 2013;94(2):147-54.
31. Strem BM, Hicok KC, Zhu M, Wulur I, Alfonso Z, Schreiber RE, et al. Multipotential differentiation of adipose tissue-derived stem cells. *Keio J Med.* 2005;54(3):132-41.
32. Kern S, Eichler H, Stoeve J, Kluter H, Bieback K. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells.* 2006;24(5):1294-301.
33. DiMuzio P, Tulenko T. Tissue engineering applications to vascular bypass graft development: the use of adipose derived stem cells. *J Vasc Surg.* 2007;45 Suppl A:A99-103.
34. Qu CQ, Zhang GH, Zhang LJ, Yang GS. Osteogenic and adipogenic potential of porcine adipose mesenchymal stem cells. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 2007;43(2):95-100.
35. Ringe J, Kaps C, Schmitt B, Büscher K, Bartel J, Smolian H, et al. Porcine mesenchymal stem cells. Induction of distinct mesenchymal cell lineages. *Cell Tissue Res.* 2002;307(3):321-7.
36. Arrigoni E, Lopa S, de Girolamo L, Stanco D, Brini AT. Isolation, characterization and osteogenic differentiation of adipose-derived stem cells: from small to large animal models. *Cell Tissue Res.* 2009;338(3):401-11.
37. Casado JG, Gomez-Mauricio G, Alvarez V, Mijares J, Tarazona R, Bernad A, et al. Comparative phenotypic and molecular characterization of porcine mesenchymal stem cells from different sources for translational studies in a large animal model. *Vet Immunol Immunopathol.* 2012;147(1-2):104-12.
38. Wang KH, Kao AP, Wangchen H, Wang FY, Chang CH, Chang CC, et al. Optimizing proliferation and characterization of multipotent stem cells from porcine adipose tissue. *Biotechnol Appl Biochem.* 2008;51(Pt 4):159-66.
39. Neupane M, Chang CC, Kiupel M, Yuzbasiyan-Gurkan V. Isolation and characterization of canine adipose-derived mesenchymal stem cells. *Tissue Eng Part A.* 2008;14(6):1007-15.
40. Fadel L, Viana BR, Feitosa ML, Ercolin AC, Roballo KC, Casals JB, et al. Protocols for obtainment and isolation of two mesenchymal stem cell sources in sheep. *Acta Cir Bras.* 2011;26(4):267-73.
41. Feitosa ML, Fadel L, Beltrão-Braga PC, Wenceslau CV, Kerkis I, Kerkis A, et al. Successful transplant of mesenchymal stem cells in induced osteonecrosis of the ovine femoral: preliminary results. *Acta Cir Bras.* 2010;25(5):416-22.
42. Lim JH, Byeon YE, Ryu HH, Jeong YH, Lee YW, Kim WH, et al. Transplantation of canine umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells in experimentally induced spinal-cord injured dogs. *J Vet Sci.* 2007;8(3):275-82.
43. Phinney DG, Prockop DJ. Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair-current views. *Stem Cells.* 2007;25(11):2896-902.
44. World Health Organization. Global health risks: mortality and burden of disease attributable to selected major risks [Internet]. Geneva; WHO; 2009 [cited 2013 Mar 19]. Available from: http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/GlobalHealthRisks_report_Front.pdf
45. Arom KV, Ruengsakulrach P, Jotisakulratana V. Intramyocardial angiogenic cell precursor injection for cardiomyopathy. *Asian Cardiovasc Thorac Ann.* 2008;16(2):143-8.
46. Psaltis PJ, Gronthos S, Worthley SG, Zannettino ACW. Cellular therapy for cardiovascular disease. Part 1 – preclinical insights. *Clin Med Cardiol.* 2008;2:125-38.
47. Rajala K, Pekkanen-Mattila M, Aalto-Setälä K. Cardiac differentiation of pluripotent stem cells [images]. *Stem Cells Int.* 2011; 2011:383709.
48. Tokcaer-Keskin Z, Akar AR, Ayaloglu-Butun F, Terzioglu-Kara E, Durdu S, Ozyurda U, et al. Timing of introduction of cardiomyocyte differentiation for in vitro cultured mesenchymal stem cells: a perspective for emergencies. *Can J Physiol Pharmacol.* 2009;87(2):143-50.
49. Choi YS, Dusting GJ, Stubbs S, Arunothayaraj S, Han XL, Collas P, et al. Differentiation of human adipose-derived stem cells into beating cardiomyocytes. *J Cell Mol Med.* 2010;14(4):878-89.
50. Xing Y, Lv A, Wang L, Yan X. The combination of angiotensin II and 5-azacytidine promotes cardiomyocyte differentiation of rat bone marrow mesenchymal stem cells. *Mol Cell Biochem.* 2012;360(1-2):279-87.
51. Breitbach M, Bostani T, Roell W, Xia Y, Dewald O, Nygren JM, et al. Potential risks of bone marrow cell transplantation into infarcted hearts. *Blood.* 2007;110(4):1362-9.
52. Gneocchi M, Zhang Z, Ni A, Dzau VJ. Paracrine mechanisms in adult stem cell signaling and therapy. *Circ Res.* 2008; 103(11):1204-19.
53. Shoji T, Li M, Mifune Y, Matsumoto T, Kawamoto A, Kwon SM, et al. Local transplantation of human multipotent adipose-derived stem cells accelerates fracture healing via enhanced osteogenesis and angiogenesis. *Lab Invest.* 2010;90(4):637-49.
54. Schuleri KH, Amado LC, Boyle AJ, Centola M, Saliaris AP, Gutman MR, et al. Early improvement in cardiac tissue perfusion due to mesenchymal stem cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2008;294(5):H2002-11.
55. Chorilli M, Michelin DC, Salgado HRN. Animais de laboratório: o camundongo. *Rev Ciênc Farm Básica Apl.* 2007;28(1):11-23.
56. Mariano M. Minisuíno (minipig) na pesquisa biomédica experimental: o Minipig br1. *Acta Miniature swine (minipig) in biomedical experimental research: the Minipig br1. Acta Cir Bras.* 2003;18(5):387-91.
57. Bernard C. An introduction to the study of experimental medicine (1865) [Internet]. [cited 2013 July 24]. Available from: <http://campus.udayton.edu/~hume/Bernard/bernard.htm>
58. Schanaider A, Silva PC. Uso de animais em cirurgia experimental. *Acta Cir Bras.* 2004;19(4):380-5.
59. Li J, Ezzelarab MB, Cooper DK. Do mesenchymal stem cells function across species barriers? Relevance for xenotransplantation. *Xenotransplantation.* 2012;19(5):273-85.
60. Bustard LK, McClellan RO. Use of pigs in biomedical research. *Nature.* 1965;208:531-5.
61. Tumbleson ME. Swine in biomedical research. New York: Plenum Press; 1986.
62. Lemos PA, Laurindo FRM, Morato SP, Takimura C, Campos CA, Gutierrez OS, et al. Stent coronário de liga cobalto-cromo concebido no Brasil: achados histológicos preliminares em modelo experimental porcino. *Rev Bras Cardiol Invasiva.* 2007; 15(4):378-85.
63. Galon MZ, Takimura CK, Carvalho J, Chaves MJF, Lecchini S, Aiello VD, et al. Evolução temporal da proliferação neointimal após implante de dois tipos de stent farmacológico com polímeros biodegradáveis em modelo porcino: avaliação qualitativa por tomografia de coerência óptica sequencial. *Rev Bras Cardiol Invasiva.* 2012;20(4):413-9.