

OBTENÇÃO DE CÉLULAS MONONUCLEARES DA MEDULA ÓSSEA PELA PUNÇÃO DO TUBÉRCULO UMERAL DE COELHOS

ACQUIREMENT OF BONE MARROW MONONUCLEAR CELLS
BY PUNCTURE OF THE HUMERUS TUBERCLE OF RABBITS

D. EURIDES¹, B. J. N. A. OLIVEIRA², L. A. SOUZA², L. A. F. SILVA²,
C. R. DALECK³, P. M. C. FREITAS⁴

RESUMO

As células-tronco mesenquimais têm sido isoladas da medula óssea e utilizadas na reparação e regeneração de defeitos osteocondrais. O objetivo desse estudo foi avaliar a eficiência da técnica de colheita da medula óssea em 12 coelhos adultos, machos, da raça Nova Zelândia, com peso entre 3,0 kg a 4,5 kg. Após flexão da articulação escápulo-umeral, foi inserida no tubérculo umeral uma agulha de biópsia de Rosenthal heparinizada, sendo aspirados 2,0 mL de medula óssea. No isolamento pelo gradiente de densidade Ficoll-paque, obteve-se um rendimento médio de $6,25 \times 10^6$ células mononucleares/mL. A técnica de colheita de medula óssea por punção do tubérculo umeral demonstrou ser eficaz e de fácil execução, devido ao alto rendimento de células mononucleares isoladas das amostras.

PALAVRAS-CHAVE: Células mesenquimais. Colheita. Medula óssea. Rendimento. Úmero

SUMMARY

Bone marrow derived-mesenchymal stem cells have been isolated and used for osteochondral defects regeneration and repair. The aim of this study was evaluate the efficiency of bone marrow harvest technique using twelve adult male New Zealand rabbits, with weight between 3.0 kg to 4.5 kg. After shoulder joint flexion, a heparinized Rosenthal biopsy needle was inserted through the humeral tubercle and further aspiration of 2.0 mL bone marrow. In the isolation with Ficoll-paque gradient density, was achieved a mean yield of 6.25×10^6 mononuclear cells per milliliter. The bone marrow harvest technique by puncture of the humerus tubercle was easily accomplished and effective, due to high yield of isolated mononuclear cells of samples.

KEY-WORDS: Bone marrow. Harvest. Humerus. Mesenchymal cells. Yield

¹ *Faculdade de Medicina Veterinária (FAMEV). Universidade Federal de Uberlândia (UFU), Uberlândia, MG. Autor para correspondência: Avenida Pará, 1720. Campus Umuarama. CEP: 38411-002. email: duvaldo@ufu.br

² Escola de Veterinária (EV). Universidade Federal de Goiás (UFG). Goiânia, GO.

³ Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV). Universidade Estadual Paulista (UNESP), Jaboticabal, SP.

⁴ Escola de Veterinária (EV). Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Belo Horizonte, MG.

As células derivadas da medula óssea (MO) são conhecidas como células-tronco mesenquimais (CTM's) devido a sua alta capacidade de replicação e diferenciação em diversas linhagens celulares como osteogênica, condrogênica, adipogênica, tenogênica e miogênica (BRUDER et al., 1998).

Nos seres humanos, a MO é a principal fonte das células mesenquimais. Entretanto, essas vêm sendo isoladas de diversos locais do organismo como músculo esquelético e derme (YOUNG et al., 2001), tecido adiposo (ZUK et al., 2001), membrana sinovial (DE BARI et al., 2001), endotélio e subendotélio da veia umbilical e safena (COVAS et al., 2003, 2005) e cordão umbilical (YU et al., 2004). Ainda, os rins (ALMEIDA-PORADA et al., 2002), a medula óssea vertebral (AHRENS et al., 2004), a cartilagem articular (ALSALAMEH et al., 2004), as vilosidades coriônicas da placenta (IGURA et al., 2004), o ligamento periodontal (SEO et al., 2004) e o pulmão (SABATINI et al., 2005) são citados como fontes ricas em CTM's.

Experiências vêm sendo realizadas na tentativa de desenvolver procedimentos eficazes em defeitos osteocondrais do joelho, os quais são de difícil reparação. Dessas técnicas, o transplante de células-tronco da MO no local da lesão têm demonstrado sucesso na regeneração da cartilagem em coelhos (OLIVEIRA, 2009, SOUZA, 2009, YANAI et al., 2005, IM et al., 2001), cães (BRUDER et al., 1998) e ratos (NISHIMORI et al., 2006), quando comparado aos outros procedimentos.

Em coelhos, a MO pode ser obtida pela punção da crista ilíaca (DEL CARLO et al., 2003), bem como do fêmur (YANAI et al., 2005) e do tubérculo umeral (OLIVEIRA, 2009, SOUZA, 2009). As CTM's são utilizadas na reparação e regeneração de tecidos devido ao seu potencial clonogênico, ou seja, sua capacidade de diferenciação em vários tipos celulares em resposta a fatores de sinalização mediada por citocinas (FRIEDENSTEIN et al., 2002). São facilmente colhidas da MO e por serem isoladas e inoculadas no próprio paciente, elimina a possibilidade de rejeição. Além disso, a colheita de células adultas não provoca controvérsias no que diz respeito aos aspectos éticos e legais (WANG et al., 2004).

Devido à capacidade de auto-renovação, proliferação e diferenciação em diversas linhagens fenotípicas, as células mesenquimais são consideradas promissoras nos métodos de terapia celular. Após o isolamento e cultivo em ambiente controlado são utilizadas no tratamento de doenças hematopoiéticas e ósseas, como a osteogênese imperfeita (BAKSH et al., 2004). O efeito terapêutico das CTM's está relacionado com sua capacidade de interagir e sobreviver em tecidos-alvos distintos por longos períodos (MINGUELL & ERICES, 2006). Além disso, se proliferam rapidamente e originam células-filhas capazes de substituírem células doentes do organismo (BANFI et al., 2000). O objetivo deste trabalho foi avaliar a eficiência da técnica de colheita da medula óssea do tubérculo umeral de coelhos para a obtenção de células mononucleares (CMN's).

Foram utilizados 12 coelhos hígidos com idade entre 12 e 15 meses, machos, da raça Nova Zelândia, com peso entre 3,0 e 4,5 kg, para colheita da MO e isolamento da fração de CMN's. Os animais foram submetidos ao mesmo manejo, alojados em gaiolas individuais recebendo água à vontade e ração comercial balanceada. Para realização deste experimento, o projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética de Experimentação Animal/UFU, sob o protocolo 041/08, parecer 060/08.

Previamente ao experimento, os coelhos permaneceram em jejum hídrico e alimentar por um período de duas e quatro horas, respectivamente. Foram submetidos à antibioticoterapia profilática com cefazolina sódica¹ (30,0 mg/Kg, intramuscular [IM]) 30 minutos antes do procedimento, bem como aplicação de cloridrato de tramadol² (2,0 mg/kg, subcutâneo [SC]) para analgesia durante e após a colheita da MO.

Como protocolo anestésico, foram administrados cloridrato de cetamina³ (30,0 mg/kg, IM) e o cloridrato de xilazina⁴ (5,0 mg/kg, IM) em aplicação única. A pele da região da escápulo-umeral foi submetida à tricotomia e antisepsia com iodo degermante, álcool e polivinil-pirrolidona⁵. Com o animal em decúbito lateral esquerdo e a articulação escápulo-umeral flexionada, foi inserida uma agulha de Rosenthal⁶ de 16G x 15 cm na região do tubérculo maior do úmero, por meio de movimentos rotacionais. Após penetração na cortical óssea, foram aspirados 2,0 mL da MO em seringa de 10 mL contendo 0,1 mL de solução fisiológica estéril com heparina sódica⁷ (5000U/mL) (Figura 1A e 1B). Durante a colheita, foram realizados movimentos lentos com a seringa para homogeneização do sangue à heparina, evitando a formação de coágulos. Após o procedimento, foi fornecido aos animais uma dose única de flunixinina meglumina⁸ (1,0 mg/kg, IM) e esses foram observados diariamente durante sete dias, para verificar alterações no local da punção e na locomoção.

Para isolamento e rendimento das CMN's foram utilizados os protocolos anteriormente descritos por Oliveira (2009) e Souza (2009). A amostra foram diluídas em 2 mL de solução tampão⁹ (PBS) e

¹ Cezolin. BioChimico. Rio de Janeiro, RJ. Brasil.

² Tramal. União Química Farmacêutica Nacional. Pouso Alegre, MG. Brasil.

³ Cetamin. Syntec. Patrocínio Paulista, SP. Brasil

⁴ Kensol. Kong. Santana de Parnaíba, SP. Brasil.

⁵ Riodine. Rioquímica Indústria Farmacêutica. São Jose do Rio Preto, SP. Brasil.

⁶ Agulha de Rosenthal. Ecomed Comércio de Produtos Médicos. Catete, Rio de Janeiro, RJ. Brasil.

⁷ Lique mine. Produtos Roche Químicos e Farmacêuticos. Rio de Janeiro, RJ. Brasil.

⁸ Banamine Injetável. Schering-Plough Saúde Animal Indústria e Comércio. Cotia, SP.

⁹ Dulbecco Phosphate Buffered Saline. Invitrogen Brasil. São Paulo, SP. Brasil.

depositadas sobre o gradiente Ficoll-paque¹⁰ com densidade de 1,077 g/mL, na proporção de 2:1. As amostras foram centrifugadas a 495 g durante 30 minutos a 15°C. Em seguida, as CMN's foram removidas, coradas com azul de tripan e contadas em câmara hemocitométrica de Neubauer.

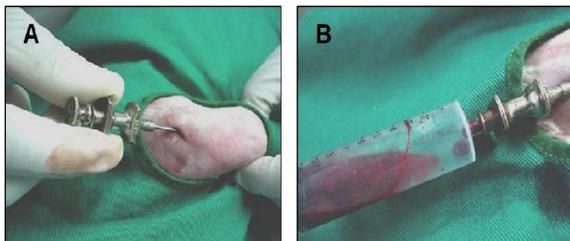


Figura 1 - Agulha de Rosenthal 16G x 15cm introduzida no tubérculo umeral de coelho da raça Nova Zelândia (A) e aspiração da medula óssea com seringa de 10mL contendo 0,1 mL de solução estéril com heparina sódica (5000 UI/mL) (B).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi referido por Quinton (2005) que intervalos maiores que quatro e cinco horas de restrição alimentar e de água em coelhos podem ocasionar perturbação no trânsito intestinal, devido ao estreitamento do diâmetro do piloro e incapacidade de relaxamento no momento do vômito. Contudo, no período instituído de duas e quatro horas para jejum hídrico e sólido, respectivamente, não foram verificadas alterações na ingestão de alimentos após o procedimento.

Para colheita de MO de coelhos, Colomé (2007) utilizou a associação de cetamina, midazolam e citrato de fentanila por via intramuscular, com administração volátil de oxigênio e isoflurano. Já IM et al. (2001), utilizaram como fármacos a cetamina e a xilazina nas doses de 50mg/kg e 10mg/kg para aspiração da MO da tibia de coelhos. Neste experimento, apesar da administração da metade da dose citada, a anestesia dissociativa com cetamina e xilazina e aplicação SC de tramadol demonstrou ser um excelente protocolo anestésico, fornecendo analgesia eficiente durante a colheita e após o procedimento.

A maioria dos estudos com colheita de MO não relatam sinais de claudicação ou outras alterações após punção e aspiração medular (OLIVEIRA, 2009, SOUZA, 2009, IM et al., 2001). No período de observação de sete dias, não foram constatados sinais de hematomas subcutâneos e infecções ósseas, bem como alterações locomotoras no membro submetido à punção. A técnica de punção no tubérculo umeral, pela flexão da articulação escápulo-umeral com o animal em decúbito lateral, permitiu a exata localização do ponto de punção, facilitando a introdução da agulha de Rosenthal na cortical óssea.

Durante a colheita de MO, existe a possibilidade de coagulação da amostra quando não se utilizam soluções

anticoagulantes, como a heparina. A formação de coágulos é considerada desfavorável, pois a agregação plaquetária pode ocasionar o aprisionamento de CMN's e, conseqüentemente, leva a redução no rendimento de células durante o processo de isolamento. Contudo, esse processo pode ser evitado diluindo-se inicialmente o sangue em heparina e PBS, aumentando assim o rendimento celular e reduzindo a agregação das células vermelhas (AMERSHAM BIOSCIENCES, 2002).

Muschler et al. (1997) avaliaram a influência no rendimento de células a partir do volume aspirado da MO de humanos, e utilizaram como diluente a heparina sódica (1000 U/mL) e o PBS, obtendo sucesso no isolamento celular. Neste trabalho, realizou-se o mesmo método de diluição citado por Muschler et al. (1997). Nesse estudo, acreditamos que a homogeneização das amostras com solução de heparina (5000 U/mL) e tampão PBS impediram a formação de coágulos, influenciando positivamente no rendimento final de CMN's.

O isolamento das CMN's com gradiente de densidade Ficoll-paque demonstrou um rendimento médio de $6,25 \times 10^6$ células/mL (Figura 2). A média celular encontrada foi ligeiramente superior a 5×10^6 células/mL constatada por Yanai et al. (2005) e superior a obtida por IM et al. (2001), que encontraram em média $3,4 \pm 1,5 \times 10^6$ células/mL isoladas da MO de coelhos. Presume-se que as diferenças nos protocolos de isolamento podem interferir no rendimento celular final, além do que a quantidade de células obtidas por aspirados podem variar de acordo com o indivíduo, como verificado nesse estudo (Tabela 1). Além disso, o número total de CMN's isoladas do tubérculo umeral é considerado expressivo, podendo este ser um local de predileção para a obtenção de aspirados de MO de coelhos.

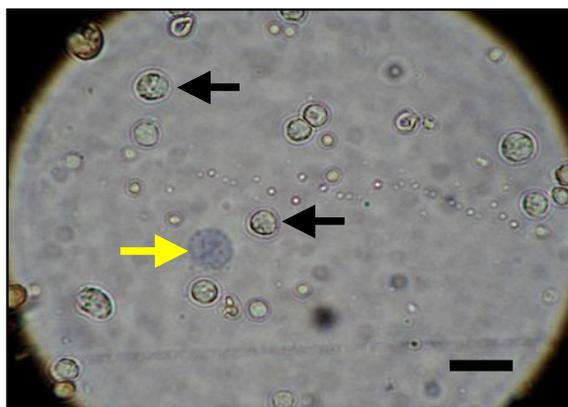


Figura 2 - Fotomicrografia óptica da câmara de Neubauer mostrando as CMN's isoladas da medula óssea. As células viáveis (setas pretas) e inviáveis (seta amarela) são contadas para obter o rendimento total de CMN's. Barra: 100µm.

¹⁰ Ficoll-paque Plus. Amersham Biosciences. São Paulo, SP. Brasil.

Tabela 1 - Resultados individuais de rendimento de CMN's isoladas de coelhos da raça Nova Zelândia, a partir da coleta de 2,0 mL de medula óssea.

ANIMAIS	CÉLULAS (x 10 ⁶ céls/mL)
1	3,84
2	6,80
3	7,92
4	5,40
5	4,16
6	6,00
7	5,98
8	5,90
9	6,50
10	5,94
11	6,64
12	9,92
MÉDIA	6,25

A quantidade de CTM representa uma fração muito pequena, em torno de 0,001-0,01% da população total das CMN's da medula (PITTENGER et al., 1999). Acredita-se que a quantidade de células isoladas seja proporcional ao volume de MO aspirada e, no presente estudo, mesmo coletando 2,0 mL de MO se obteve uma alta fração de células. Muschler et al. (1997) aspiraram 2,0 e 4,0 mL de MO e observaram uma média de 2,85 x 10⁷ e 1,75 x 10⁷ CMN's/mL, respectivamente. Concordando com nosso estudo, os autores observaram altos rendimentos celulares a partir de pequenos volumes de MO, e concluíram que esta quantidade já é necessária para se realizar o transplante terapêutico.

A grande preocupação acerca dos fatores de sucesso e insucesso dos procedimentos de cultura celular tem relação com o número de células obtidas nas colheitas, sua diferenciação e viabilidade nos meios utilizados (PEREIRA et al., 2008), principalmente, quando se trata das células com potencial reparador, as chamadas células-tronco mesenquimais (PROCKOP et al., 2003). As pesquisas atuais relacionadas à fração de células têm apontado inúmeras possibilidades para a reparação tecidual e melhoria dos processos regenerativos, quando essas são transplantadas em número igual ou superior a 2 x 10⁶ (SUTER et al., 2004). Contudo, a forma de colheita de MO realizada nesse estudo permite a aquisição de um expressivo número de CMN's, podendo proporcionar efeitos terapêuticos benéficos na regeneração de tecidos.

CONCLUSÕES

A técnica de colheita de medula óssea por punção do tubérculo umeral de coelhos se demonstrou eficaz e exequível, não ocasionando efeitos deletérios ao animal doador. O procedimento permite uma correta colheita

de amostras medulares, o que favorece o isolamento e a obtenção de um expressivo rendimento de células mononucleares.

REFERÊNCIAS

AHRENS, N., TORMIN, A., PAULUS, M., ROOSTERMAN, D., SALAMA, A., KRENN, V., NEUMANN, U., SCHEDING, S. Mesenchymal stem cell content of human vertebral bone marrow. *Transplantation*, v.78, n.6, p.925-929, 2004.

ALMEIDA-PORADA, G., EL SHABRAWY, D., PORADA, C., ZANJANI, E. D. Differentiative potential of human metanephric mesenchymal cells. *Experimental Hematology*, v.30, n.12, p.1454-1462, 2002.

ALSALAMEH, S., AMIN, R., GEMBA, T., LOTZ, M. Identification of mesenchymal progenitor cells in normal and osteoarthritic human articular cartilage. *Arthritis and Rheumatism*, v.50, n.5, p.1522-1532, 2004.

AMERSHAM BIOSCIENCES (GE Healthcare Life Science). **Ficoll-Paque Plus. For in vitro isolation of lymphocytes.** New Jersey, 2002. 20p.

BAKSH, D., SONG, L., TUAN, R. S. Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, v.8, n.3, p.301-316, 2004.

BANFI, A., MURAGLIA, A., DOZIN, B., MASTROGIACOMO, M., CANCEDDA, R., QUARTO, R. Proliferation kinetics and differentiation potential of ex vivo expanded human bone marrow stromal cells: implications for their use in cell therapy. *Experimental Hematology*, v.28, n.6, p.707-715, 2000.

BRUDER, S. P., KRAUS, K. H., GOLDBERG, V. M., KADIYALA, S. The effect of implants loaded with autologous mesenchymal stem cells on the healing of canine segmental bone defects. *The Journal of Bone and Joint Surgery*, v.80, n.7, p.985-996, 1998.

COLOMÉ, L. M. **Avaliação do envolvimento de células-tronco autólogas de medula óssea em associação com técnicas de tubulação por prótese de silicone na regeneração do nervo tibial de coelhos.** Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria, 2007. 75p. Dissertação (Mestrado em Cirurgia Veterinária) - Centro de Ciências Rurais, 2007.

COVAS, D. T., PICCINATO, C. E., ORELLANA, M. D., SIUFI, J. L., SILVA, W. A. JR., PROTO-SIQUEIRA, R., RIZZATTI, E. G., NEDER, L., SILVA, A. R., ROCHA, V., ZAGO, M. A. Mesenchymal stem cells can be obtained from the human saphena vein. *Experimental Cell Research*, v.309, n.2, p.340-344, 2005.

- COVAS, D. T., SIUFI, J. L., SILVA, A. R., ORELLANA, M. D. Isolation and culture of umbilical vein mesenchymal stem cells. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.36, n.9, p.1179-1183, 2003.
- DE BARI, C., DELL'ACCIO, F., TYLZANOWSKI, P., LUYTEN, F. P. Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. **Arthritis and Rheumatism**, v.44, n.8, p.1928-1942, 2001.
- DEL CARLO, R. J., KAVATA, D., VILORIA, M. I. V., OLIVEIRA, D. R., SILVA, A. S., MARCHESI, D. R., GALVÃO, S. R., AZEVEDO, P., MONTEIRO, B.S. Polímero derivado de mamona acrescido de cálcio, associado ou não à medula óssea autógena na reparação de falhas ósseas. **Ciência Rural**, v.33, n.6, p.1081-1088, 2003.
- FRIEDENSTEIN, A. J., PETRAKOVA, K., KUROLESOVA, A., FROLOVA, G. P. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. **Transplantation**, v.6, n.2, p.230-247, 2002.
- IGURA, K., ZHANG, X., TAKAHASHI, K., MITSURU, A., YAMAGUCHI, S., TAKASHI, T. A. Isolation and characterization of mesenchymal progenitor cells from chorionic villi of human placenta. **Cytotherapy**, v.6, n.6, p.543-553, 2004.
- IM, G. I.: KIM, D. Y., SHIN, J. H., HYUN, C. W., CHO, W. H. Repair of cartilage defect in the rabbit with cultured mesenchymal stem cells from bone marrow. **The Journal of Bone and Joint Surgery**, v.83, n.2, p.289-294, 2001.
- MINGUELL, J. J., ERICES, A. Mesenchymal stem cells and the treatment of cardiac disease. **Experimental Biology and Medicine**, v.231, n.1, p.39-49, 2006.
- MUSCHLER G. V., BOEHM, C., EASLEY, K. Aspiration to obtain osteoblast progenitor cells from human bone marrow: the influence of aspiration volume. **Journal Bone Joint Surgery**, v.79, n.11, p.1699-1709, 1997.
- NISHIMORI, M., DEIE, M., KANAYA, A., EXHAM, H., ADACHI, N., OCHI, M. Repair of chronic osteochondral defects in the rat. A bone marrow-stimulating procedure enhanced by culture allogenic bone marrow mesenchymal stromal cells. **The Journal of Bone and Joint Surgery**, v.88, n.9, p.1236-1244, 2006.
- OLIVEIRA, B. J. N. A. **Enxerto osteocondral alógeno, associado à inoculação de células mononucleares da medula óssea e proteína morfogenética óssea no reparo do sulco troclear de coelhos**. Uberlândia: Universidade Federal de Uberlândia, 2009. 53p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Faculdade de Medicina Veterinária, 2009.
- PEREIRA, I. S. O., PONTES, P., EÇA, L. P., FERREIRA, A. T., MAZZETTI, P. M. V., SILVA, L., SOUZA, F. C. Protocolo piloto de separação e quantificação de células tronco de tecido adiposo de coelhos para posterior uso em laringe. **Acta ORL**, v.26, n.3, p.11-16, 2008.
- PITTENGER, M. F., MACKAY, A. M., BECK, S. C., JAISWAL, R. K., DOUGLAS, R., MOSCA, J. D., MOORMAN, M. A., SIMONETTI, D. W., CRAIG, S., MARSHAK, D. R. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. **Science**, v.284, n.5411, p.143-147, 1999.
- PROCKOP, D. J., GREGORY, C. A., SPEES, J. L. One strategy for cell and gene therapy: harnessing the power of adult stem cells to repair tissues. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v.100, n.1, p.11917-11923, 2003.
- QUINTON, J. F. **Novos animais de estimação: pequenos mamíferos**. São Paulo: Roca, 2005. 280p.
- ROMANO, G. Stem cells transplantation therapy: controversy over ethical issues and clinical relevance. **Drug News & Perspectives**, v.17, n.10, p.637-645, 2004.
- SABATINI, F., PETECCHIA, L., TAVIAN, M., JODON DE VILLEROCHÉ, V., ROSSI, G. A., BROUTY-BOYÉ, D. Human bronchial fibroblasts exhibit a mesenchymal stem cell phenotype and multilineage differentiating potentialities. **Laboratory Investigation**, v.85, n.8, p.962-971, 2005.
- SEO, B., MIURA, M., GRONTHOS, S., BARTOLD, P. M., BATOULI, S., BRAHIM, J., YOUNG, M., ROBEY, P. G., WANG, C. Y., SHI, S. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. **Lancet**, v.364, n.9429, p.149-155, 2004.
- SOUZA, L. A. **Enxerto osteocondral alógeno, associado à inoculação de células mononucleares autólogas da medula óssea no reparo do sulco troclear de coelhos**. Uberlândia: Universidade Federal de Uberlândia, 2009. 67p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Faculdade de Medicina Veterinária, 2009.
- SUTER, S. E., GOUTHRO, T. A., MCSWEENEY, P. A., NASH, R. A., HASKINS, M. E., FELSBURG, P. J., HENTHORN, P. S. Isolation and characterization of pediatric canine bone marrow CD34+ cells. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.101, n.1-2, p.31-47, 2004.
- WANG, J., FAN, H. E. H., SUN, Y. Allograft bone-marrow derived mesenchymal stem cells transplanted into heart infarcted model of rabbit to renovate

infracted heart. **Journal of Zhejiang University Science**, v.5, n.10, p.1279-1285, 2004.

YANAI, T., ISHII, T., CHANG, F., OCHIAI, N. Repair of large full-thickness articular cartilage defects in the rabbit. The effects of joint distraction and autologous bone marrow- derived mesenchymal cell transplantation. **The Journal of Bone and Joint Surgery**, v.87, n.5, p.721-729, 2005.

YOUNG, H. E., STEELE, T. A., BRAY, R. A., HUDSON, J., FLOYD, J. A., HAWKINS, K., THOMAS, K., AUSTIN, T., EDWARDS, C., CUZZOURT, J., DUENZL, M., LUCAS, P.A., BLACK, A. C. JR. Human reserve pluripotent mesenchymal stem cells are present in the connective

tissues of skeletal muscle and dermis derived from fetal, adult, and geriatric donors. **Anatomical Record**, v.264, n.1, p.51-62, 2001.

YU, M., XIAO, Z., SHEN, L., LI, L. Mid-trimester fetal blood-derived adherent cells share characteristics similar to mesenchymal stem cells but full-term umbilical cord blood does not. **British Journal of Haematology**, v.124, n.5, p.666-675, 2004.

ZUK, P. A., ZHU, M., MIZUNO, H., HUANG, J., FUTRELL, J. W., KATZ, A. J., BENHAIM, P., LORENZ, H. P., HEDRICK, M. H. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. **Tissue Engineering**, v.7, n.2, p.211-228, 2001.