

**LAÍS FERNANDA MARQUES**

**ANÁLISE COMPARATIVA DE DIFERENTES METODOLOGIAS PARA  
CULTIVO DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DERIVADAS DE  
TECIDO MUSCULAR**

**ASSIS**

**2014**

**LAÍS FERNANDA MARQUES**

**ANÁLISE COMPARATIVA DE DIFERENTES METODOLOGIAS PARA  
CULTIVO DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DERIVADAS DE  
TECIDO MUSCULAR**

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências e Letras de Assis – UNESP – Universidade Estadual Paulista para a obtenção do título de Mestra em Biociências (Área de Conhecimento: Caracterização e Aplicação da Diversidade Biológica)

Orientador: Dr. João Tadeu Ribeiro Paes

ASSIS

2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Biblioteca do Instituto Educacional de Assis – I E D A

Marques, Laís Fernanda

M357a Análise comparativa de diferentes metodologias para cultivo de células-tronco mesenquimais derivadas de tecido muscular / Laís Fernanda Marques. Assis, 2014  
84 f. il.

Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências e Letras de Assis – Universidade Estadual Paulista.

Orientador: Dr. João Tadeu Ribeiro Paes

1. Células-tronco. 2. Tecido muscular. 3. Digestão enzimática.  
4. Dissociação mecânica. 5. Explante. I. Título.

CDD 616.02774

“The known is finite, the unknown infinite; intellectually we stand on an islet in the midst of an illimitable ocean of inexplicability. Our business in every generation is to reclaim a little more land, to add something to the extent and the solidity of our possessions.”

- Thomas Henry Huxley - 1887

## **AGRADECIMENTOS**

A meus pais, Isabel Alves Marques e Jorge Agnelo Marques, meus primeiros mestres, pelas grandes lições de integridade e honra.

A meus irmãos, George Agnelo Marques e Diorge Agnelo Marques, pelos momentos de alegria e por toda confiança depositada em mim.

A meu namorado, Marchus Cesar de Souza, por todo seu carinho, compreensão e apoio incondicional.

A Natalia Cristina dos Santos, meu braço direito e ombro amigo durante toda a execução desse trabalho.

Ao meu orientador, Dr. João Tadeu Ribeiro Paes, pela oportunidade, paciência e afincos despendidos a mim, e por me dar a honra de compartilhar seus grandiosos conhecimentos.

A toda a equipe do GenTe Cel e funcionários da FCL de Assis por colaborarem com o andamento deste trabalho.

À CAPES e ao Consórcio Intermunicipal do Vale do Paranapanema (CIVAP) pelo apoio financeiro.

Marques, Laís Fernanda. Análise comparativa de diferentes metodologias para o cultivo de células-tronco mesenquimais derivadas de tecido muscular 2014. 84 f. Dissertação (Mestrado em Biociências). – Faculdade de Ciências e Letras, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Assis, 2014.

## RESUMO

As pesquisas com células-tronco têm avançado expressivamente e ocupam um papel de destaque no contexto do novo ramo terapêutico que se convencionou denominar de medicina regenerativa. A abundância e facilidade de obtenção do tecido muscular têm permitido a ampliação dos estudos acerca de seu potencial como fonte de células-tronco mesenquimais. Neste sentido, diferentes metodologias têm sido propostas para a obtenção de células-tronco mesenquimais oriundas do tecido muscular (CTDM), objetivando cultivo e aplicação clínica em medicina humana e veterinária. Um aspecto importante a ser considerado nos diversos protocolos de isolamento de células-tronco mesenquimais refere-se ao emprego rotineiro da colagenase de origem bacteriana (*Clostridium histolyticum*). O emprego de reagentes xenobióticos, como a colagenase, rotineiramente empregados, obedecem às recomendações da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA - Brasil), que preconiza a não utilização desses produtos no cultivo de células destinadas à terapia celular em pacientes humanos, uma vez que podem conter agentes infecciosos e contaminantes capazes de desencadear severas reações imunológicas. Neste contexto, objetivou-se, neste estudo, a proposição de novas metodologias a fim de substituir o emprego de xenobióticos no processo de obtenção CTDM. Para tanto, foram comparados os métodos de digestão enzimática (colagenase), dissociação mecânica e explante, em diferentes meios de cultura. O conjunto de resultados mostra que as técnicas de dissociação mecânica e explante são metodologias viáveis para substituição da colagenase em procedimentos de

obtenção de CTDM. Estas novas abordagens metodológicas representam, portanto, um avanço para terapia celular, em consonância com as recomendações da ANVISA.

Palavras-chaves: células-tronco; tecido muscular; digestão enzimática; dissociação mecânica; explante.

Marques, Laís Fernanda. Análise comparativa de diferentes metodologias para o cultivo de células-tronco mesenquimais derivadas de tecido muscular 2014. 84 f. Dissertação (Mestrado em Biociências). – Faculdade de Ciências e Letras, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Assis, 2014.

## ABSTRACT

The researches with stem cells have advanced significantly and take a prominent role in the context of the new treatment branch that has been conventionally called of regenerative medicine. The abundance and ease of obtaining muscle tissue have allowed the expansion of studies on its potential as a source of mesenchymal stem cells. In this sense, different methodologies have been proposed for obtaining mesenchymal stem cells derived of muscle tissue (SCDM), aiming cultivation and clinical application in human and veterinary medicine. An important aspect to be considered in the various protocols of isolation of mesenchymal stem cells refers to the routine use of bacterial collagenase (*Clostridium histolyticum*). The use of xenobiotic reagents, such as collagenase, contrasts with the recommendations of the National Health Surveillance Agency (ANVISA - Brazil), which recommends the avoidance of the use of these products in the cultivation of cells destined for cell therapy in human patients, since which may contain infectious agents and contaminants that are capable of triggering severe immunological reactions. In this context, we aimed in this study to propose new methods to replace the use of xenobiotics in the process of obtaining SCDM. For this end, the methods of enzymatic digestion (collagenase), mechanical dissociation and explant were compared in different culture media. The set of results shows that the techniques of mechanical dissociation and explant are viable methodologies for replacement of collagenase procedures for obtaining SCDM. These new methodological



approaches, therefore, represent an advance for cell therapy, in accordance with the recommendations of ANVISA.

Keywords: Palavras-chave: stem cells, muscle, enzymatic digestion; mechanical dissociation, explante.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	12	
1.1. Desordens Musculares.....	12	
1.2. Terapia Celular .....	15	
1.3. Células-tronco .....	17	
1.4. Células-tronco mesenquimais .....	18	
1.5. Células Progenitoras Musculares .....	19	
1.6. Cultura Celular .....	21	
2. MATERIAIS E MÉTODOS .....	24	
2.1. Animais .....	24	
2.2. Coleta do Tecido Muscular .....	24	
2.3. Isolamento das Células-tronco derivadas de Tecido Muscular .....	25	
2.3.1. Técnica de Explante .....	25	
2.3.2. Dissociação Mecânica .....	26	
2.3.3. Digestão Enzimática.....	27	
2.4. Determinação da viabilidade e contagem das células .....	28	
2.5. Determinação das curvas de crescimento em diferentes meios cultura.....	29	
2.6. Diferenciações.....	30	
2.6.1. Diferenciação adipogênica .....	30	
2.6.2. Diferenciação osteogênica.....	30	
2.6.3. Diferenciação condrogênica .....	31	
2.7. Análise estatística.....	31	
3. REFERÊNCIAS .....	32	
4. ARTIGO A SER SUBMETIDO À REVISTA BRASILEIRA DE ORTOPEDIA .....	44	
Resumo.....	46	
ABSTRACT .....	47	
Introdução .....	49	
Materiais e Métodos .....	50	
Animais .....	50	
Grupos Experimentais .....	51	
Isolamento das CTDM .....	51	
Determinação da viabilidade e contagem das células .. 52	Determinação das curvas de crescimento em diferentes meios cultura.....	53
Diferenciação adipogênica .....	53	

Diferenciação osteogênica.....	54
Diferenciação condrogênica.....	54
Análise estatística.....	54
Resultados .....	55
Discussão.....	58
Conclusão.....	61
5. CONCLUSÕES GERAIS .....	62
6. REFERÊNCIAS .....	63
Anexo 1 - Figuras e Tabela .....	67
Anexo 2 - Normas para Publicação na Revista Brasileira de Ortopedia.....	73

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Desordens Musculares

As lesões musculoesqueléticas (LME) representam um grave problema de saúde pública mundial, com elevada prevalência ao redor do planeta. Segundo as Estimativas da Organização Mundial de Saúde (OMS) as exposições ocupacionais são responsáveis por 37% das LME (PRÜSS-ÜSTÜN; CORVALÁN, 2006). Além de afetar a qualidade de vida e a produtividade de trabalhadores e esportistas, as LME têm grande impacto econômico e social, sendo responsáveis por uma parcela considerável de absenteísmo no trabalho (FILARDO et al., 2012; HENGEL et al., 2011; SAMPSON et al., 2008).

As lesões musculares são caracterizadas por alterações morfológicas e histoquímicas que resultam na perda da funcionalidade do segmento afetado (ROCHA; CAVALLIERI, 2007). No esporte, as lesões são classificadas de acordo com os diferentes graus do trauma sofrido, podendo ser agudas ou crônicas, dependendo da duração. É comum a ocorrência de três formas de lesão muscular: distensão muscular aguda, contusão e lesão muscular induzida pelo exercício (SAGGIN et al., 2003).

A distensão muscular aguda (DMA) resulta do estiramento excessivo ou da sobrecarga dinâmica concêntrica (músculo encurtado) ou excêntrica (músculo alongado), acarretando lesões nas fibras musculares, tendões, junções músculo-tendíneas ou inserções ósseas podendo ser classificada de acordo com a intensidade da lesão (SAGGIN et al., 2003). Quando a ruptura é mínima e ocorre o retorno rápido à função normal, a distensão é classificada como leve. Na distensão

moderada, a laceração é parcial, havendo dor e perda parcial da função, e, quando a ruptura é completa, seguida de hemorragia e inchaço, a distensão é classificada como grave (ARMAND et al., 2003).

A contusão ocorre quando o músculo, ao se chocar com objetos, sofre o rompimento do tecido conjuntivo (LOPES et al., 1993). Este tipo de lesão caracteriza-se pela rigidez e conseqüente restrição da amplitude do movimento acompanhada de hipersensibilidade local (ARMAND et al., 2003). O processo de cicatrização é, portanto, dependente do hematoma intersticial, uma vez que as fibras musculares, vasos e tecido conjuntivo podem sofrer diferentes intensidades de ruptura (LOPES et al., 1993).

A lesão muscular, frequentemente causada por exercícios excêntricos, pode ser identificada pela presença de proteínas miofibrilares no sarcoplasma, desorganização e necrose focal das miofibrilas, bem como pela liberação de creatinaquinase (ENGEL; FRANZINI-ARMSTRONG, 2004). Exercícios de contração isométrica, onde o tamanho do músculo não se altera devido a força e sobrecarga equivalentes, podem resultar em lesão ultra-estrutural das fibras musculares esqueléticas (CASTILLO; PINTO, 1999).

Apesar da grande capacidade regenerativa do músculo esquelético (SEALE et al., 2001), as lesões graves e/ou sucessivas levam a um ciclo de degeneração/regeneração que resultam na perda da função e no quadro de fibrose (NOONAN et al, 1999; ORCHARD et al., 2008). As recidivas de lesões musculares, comuns em cerca de 30% dos casos, ocorrem devido à diminuição da flexibilidade, da força muscular e tênsil do tecido cicatricial, resultando em alterações das propriedades viscoelásticas do músculo que aumentam o tempo de regeneração (CORDOVA et al., 2002).

As lesões musculoesqueléticas são comuns em atividades que exigem contrações excêntricas em altas velocidades ou alongamentos lentos e excessivos (MALLIAROPOULOS et al., 2010). Em jogadores de futebol, pode corresponder a 30% de todas as lesões, podendo chegar a até 43% em jogadores de elite (ARNASON et al., 2004). Em geral, as lesões musculares são causadas por contusões e pela força muscular excessiva, mantendo o atleta inativo por muitas semanas ou mesmo meses (CICILIOT et al., 2010; ORCHARD et al., 2008).

As lesões musculares estão também associadas ao avanço da idade, em um processo que foi originalmente descrito por Quetelet há mais de 150 anos (BROOKS; FAULKNER, 1988). Na população humana, a partir dos 50 anos de vida até os 70 anos, a força muscular começa a diminuir cerca de 15% a cada 10 anos, passando então a haver uma perda de 30% por década (ROGERS; EVANS, 1993). Esse evento deve-se a gradual substituição da massa muscular por tecido conjuntivo fibroso e adiposo, associada à redução do potencial de regeneração do tecido muscular (BRACK et al., 2007).

Outra grave moléstia associada ao tecido muscular compreende as 20 variantes de distrofia muscular, que acomete 1/3500 nascidos vivos. Esta patologia é causada por mutações no gene da distrofina, ligada ao cromossomo X. De acordo com o grau de severidade, as distrofias são classificadas em de Duchenne (mais agressiva) ou Becker (mais branda) (SEALE et al., 2001). Os constantes danos ao sarcolema acarretam em repetidos ciclos de degeneração/regeneração que acabam por resultar no esgotamento das células satélites residentes e progressiva fibrose muscular (BRACK et al., 2007; WEBSTER; BLAU, 1990).

Devido ao fato das lesões musculoesqueléticas frequentemente terem processos de reparação lentos e incompletos (PEERS; LYSSENS, 2005), tem se buscado diferentes alternativas a fim de sanar este problema.

Há algum tempo, o plasma rico em plaquetas (PRP) tem sido empregado como tratamento clínico de LME, uma vez que é facilmente obtido, promove retorno rápido e seguro às atividades físicas rotineiras. Esses resultados favoráveis são atribuídos à liberação de proteínas e fatores de crescimento que estimulam os processos de regeneração, quimiotaxia, diferenciação, proliferação e angiogênese em tecidos danificados (BENNETT; SCHULTZ, 1993; MARQUES et al., 2014).

Outra alternativa promissora para o tratamento de desordens musculares seria, neste contexto, o emprego das próprias células-tronco derivadas de músculo (CTDM). A significativa abundância e considerável facilidade de obtenção deste tecido têm incentivado os crescentes estudos acerca de seu potencial terapêutico, visto que a coleta requer procedimentos minimamente invasivos, como a biópsia muscular ou fragmentos de tecido descartados durante reconstruções ortopédicas, sem causar prejuízos à saúde do paciente (JACKSON et al., 2010; USAS; HUARD, 2007; WOJCIKIEWICZ et al., 2014).

## **1.2. Terapia Celular**

A terapia celular pode ser entendida, de forma ampla e genérica, como o emprego de células ou componentes celulares para o tratamento de doenças.

Os efeitos trágicos e devastadores do emprego de bombas atômicas, durante a segunda guerra mundial, estão estritamente vinculados à história da terapia celular. Em 1949, Jacobson e colaboradores demonstraram que os efeitos letais da

radiação ionizante, em camundongos, poderiam ser evitados, desde que o baço dos animais irradiados fosse protegido com placa de chumbo. Esses mesmos autores reportaram efeitos similares com fêmur de camundongos, e propuseram ainda, que a infusão intravenosa de medula óssea poderia conferir proteção contra a radiação (FARIA et al., 2012; JACOBSON et al., 1950, 1960; SRIVASTAVA; BULTE, 2014).

Em 1956, Thomas obteve sucesso na remissão de leucemia a partir da infusão de medula óssea proveniente de gêmeos idênticos. Contudo, apenas em 1969, a partir de trabalhos iniciados por Jean Dausset, em 1952, sobre os antígenos de histocompatibilidade leucocitários (HLA) e, paralelamente, com o desenvolvimento de medicamentos imunossupressores e de antibióticos de amplo espectro, foi possível o primeiro transplante de medula óssea em que o doador e o receptor não eram gêmeos monozigóticos. Em 1961, Till e McCulloch, obtiveram a reconstrução do sistema hematopoético de animais letalmente irradiados após o transplante de células de animais singênicos normais, de modo a evidenciar a capacidade de auto-renovação e diferenciação celular, estabelecendo assim o conceito de célula-tronco (DAUSSET, 1954; FARIA et al., 2012; TILL; MCCULLOCH, 1961; THOMAS et al., 1957).

Estes avanços iniciais abriram uma série de novas metodologias, com implicações terapêuticas que, mais modernamente, foram agrupadas sob a denominação de medicina regenerativa. Segundo Corsi (2007) a medicina regenerativa consiste na substituição ou regeneração de tecidos acometidos por doenças ou lesões. Neste contexto, os procedimentos terapêuticos adotados abrangem desde o emprego de elementos biológicos, como fatores de crescimento ou células-tronco, até a engenharia de tecidos e terapia gênica. Assim, os crescentes avanços da área, tem possibilitado o tratamento, ainda que experimental,



de patologias de difícil manejo na prática clínica, como o mal de Parkinson, diabetes mellitus, distrofias musculares e acidente vascular cerebral (DAVEY et al., 2014; HAYASHI et al., 2013; GEHMERT et al., 2014; VELTHOVEN et al., 2014). Dentre os métodos empregados, as células-tronco certamente tem recebido grande destaque, uma vez que despontam como alternativa promissora na prática clínica em virtude de suas propriedades de plasticidade e autorrenovação (AJIBADE et al., 2014).

### **1.3. Células-tronco**

As células-tronco são células indiferenciadas encontradas em tecidos diferenciados que apresentam a capacidade de se autorrenovar e se diferenciar, sob condições apropriadas, em todos os tipos celulares especializados de tecido do qual se originaram. Podem, de forma geral, ser classificadas em embrionárias ou adultas (NIH, 2004).

As células-tronco embrionárias são provenientes da massa celular interna do embrião na fase de blastocisto, capazes de originar qualquer tipo celular diferenciado dos três folhetos germinativos (ectoderme, mesoderme e endoderme). As células-tronco adultas são encontradas em tecidos diferenciados, apresentando a capacidade se autorrenovar, podendo manter-se indiferenciadas por longos períodos, ou se diferenciar no tecido do qual se originaram (RIBEIRO-PAES et al., 2012).

Com base no potencial de diferenciação, as células-tronco podem ser classificadas em totipotentes (capazes de originar o embrião e anexos embrionários), pluripotentes (correspondem à massa celular interna do embrião, podendo, virtualmente, originar tipos celulares derivados a partir das três camadas

germinativas), multipotentes (capazes de originar células das múltiplas linhagens que compõem um tecido), oligopotentes (originam duas ou mais linhagens de um mesmo tecido) e aquelas que originam apenas um tipo celular maduro, denominadas unipotentes (NIH, 2001).

Apesar das células-tronco embrionárias possuírem maior plasticidade do que as células-tronco adultas, sua aplicação terapêutica esbarra em questões éticas, potencial risco de rejeição imunológica e caracterização insuficiente quanto à dinâmica de resposta aos sinais biofísicos do microambiente celular (ARAKI et al., 2013; CHEN et al., 2012). Assim, considerando a ausência de conflitos éticos, facilidade de obtenção e risco mínimo de reações imunológicas, uma vez que podem ser provenientes do próprio paciente, as células-tronco adultas têm sido exploradas, com possibilidade de aplicação terapêutica.

#### **1.4. Células-tronco mesenquimais**

Em 1867, Cohnheim sugeriu a possibilidade de existência de células-tronco não hematopoéticas na medula óssea. No entanto, apenas em 1970, Friedenstein identificou e descreveu colônias de células provenientes da medula óssea, com a propriedade de aderência ao plástico e morfologia semelhante a fibroblastos – as chamadas células-tronco mesenquimais – que foram, na época, definidas pelo autor como unidade de colônias formadoras de fibroblastos (CFU-Fs) (FRIEDENSTEIN, 1966, 1968).

Segundo a Sociedade Internacional de Terapia Celular (International Society for Cellular Therapy), além das propriedades já elencadas de aderência ao plástico e morfologia fibroblastóide, as células-tronco mesenquimais devem ainda, cumprir

outros dois critérios mínimos para comprovação: a expressão de marcadores específicos (positiva para CD105, CD73, CD90 e negativa para CD34, CD45, CD14, ou CD11b, CD79, ou CD19 e HLA-DR) em mais de 95% das células e capacidade de se diferenciar, sob determinadas condições *in vitro* em linhagem condrogênica, osteogênica e adipogênica (DOMICINI et al., 2006). Esta considerável plasticidade, associada à ausência ou baixa expressão de antígeno leucocitário humano (HLA) de classe II, faz das células-tronco mesenquimais as candidatas ideais para a medicina regenerativa (BYDLOWSKI et al., 2009; DAWSON et al., 2014; DOMINICI et al., 2006; HORWITZ, et al., 2005).

Embora a medula óssea tenha sido considerada a principal fonte não-hematopoética de células-tronco mesenquimais, outros tecidos como muscular, tecido adiposo, sangue de cordão umbilical, polpa dentaria, periósteo, pericitos e sinovial, têm sido identificados como fontes potenciais, de modo a abrir uma gama de possibilidades de isolamento deste tipo celular e posterior adequação como alternativa terapêutica de doenças de diferentes etiologias (AJIBADE et al., 2014; TEKKATTE et al., 2011).

### **1.5. Células Progenitoras Musculares**

Em 1961, Mauro descreveu uma população celular, localizada na periferia da fibra muscular, entre a lâmina basal e a membrana plasmática. Esta população celular foi denominada de células satélites e tem sido reportada como células-tronco musculares devido ao seu papel na manutenção da fibra muscular, uma vez que origina tanto as células musculares quanto novas células quiescentes, mantendo

assim o pool de células satélites residentes por meio da autorrenovação (VERDIJK et al., 2013).

Em geral, as células satélites encontram-se em estado quiescente, tornando-se ativas em resposta aos exercícios, crescimento normal, injúria, ou doenças degenerativas (SEALE et al., 2001). Uma vez ativadas, originam os mioblastos que se fundem, formando as miofibrilas que por sua vez se organizam em fibras musculares.

Apesar das células satélites serem as principais responsáveis pela regeneração muscular, o tecido muscular esquelético exibe outras populações celulares apresentando potencial miogênico, tais como as células periféricas (SP – side-population cells), mesoangioblastos e células-tronco derivadas de músculo (CTDM) (PEAULT et al., 2007).

As células periféricas foram inicialmente isoladas do músculo esquelético de camundongos a partir da adequação do método de purificação de células da medula óssea. São encontradas em camundongos da linhagem Pax7<sup>-/-</sup>, com acentuada deficiência em células satélites (SEALE et al., 2001) e quando cultivadas *in vitro*, seguem a linhagem miogênica, além de expressar marcadores presentes em células satélites quiescentes (ASAKURA et al., 2003). Após injeção intravenosa, as células periféricas são capazes de incorporar ao músculo esquelético de camundongos com distrofia muscular (GUSSONI et al., 1999) e supõe-se que atuem de forma parácrina, secretando fatores que estimulam a proliferação de outras células miogênicas (CORSELLI et al., 2010).

Os mesoangioblastos, inicialmente identificados na parede da aorta dorsal de embrião de camundongos, apresentam proliferação intensa *in vitro*, podendo se diferenciar em diferentes tipos de células mesodérmicas (MINASI et al., 2002). O

aumento do fornecimento de mesoangioblastos confere a reconstituição completa dos músculos esqueléticos de camundongos com distrofia deficientes em  $\alpha$ -sarcoglicanos. O transplante de mesoangioblastos humanos em camundongos linhagem mdx, que apresenta imunodeficiência severa combinada (Severe Combined Immunodeficiency – SCID) constituiu elevado número de fibras expressando distrofina humana (PEAULT et al., 2007).

As células-tronco derivadas de tecido muscular são as prováveis progenitoras de células satélites, podendo também se diferenciar diretamente em células miogênicas (SEALE et al., 2001). Este tipo celular possui a capacidade de proliferar por longos períodos, podendo se autorrenovar ou diferenciar em outras linhagens celulares (LAVASANI et al., 2012; QU-PETERSEN et al., 2002).

As habilidades de crescimento e regeneração do tecido muscular em resposta a injúrias estão, certamente, relacionadas à ampla gama de células progenitoras musculares. Sabe-se que as células periféricas, os mesoangioblastos e células-tronco derivadas de músculo compartilham os mesmos marcadores celulares, embora ainda não esteja clara a relação entre elas (COSSU; BIRESSI, 2005). Assim, estudos futuros visando compreender os fatores que influenciam no comportamento e expressão de genes miogênicos poderão indicar a melhor forma de manipular e propagar estas células para fins terapêuticos.

## **1.6. Cultura Celular**

Desde o século XIX, Claude Bernard e Paul Bert cogitavam a possibilidade de obter tecidos por meio de cultura celular (FAGOT-LARGEAULT, 2004). No entanto, foi somente em 1910 que Carrel e Burrows obtiveram a primeira cultura celular bem

sucedida, com evidente crescimento ativo de células de um pequeno fragmento de tecido vivo cultivado em meio plasmático.

A proliferação celular *in vitro* necessita de uma mistura especial de nutrientes, denominada meio de cultura. Os meios de cultura são ricos em nutrientes que suportam o crescimento e proliferação celular, uma vez que buscam mimetizar os componentes do ambiente celular *in vivo* (ISAAC et al., 2011).

Os chamados meios basais possuem quatro grupos químicos fundamentais: vitaminas, aminoácidos, sais inorgânicos e carboidratos. Os principais meios basais disponíveis no mercado são: Eagles Basal Medium, Minimum Essential Medium, Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Medium 199, Nutrient Mixtures Ham's F-10 e Ham's F-12, MacCoy's 5A, Dulbecco's MEM/F-12, Roswell Park Memorial Institute Media (RPMI-1640), Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM) e Alpha Modified Minimal Essential Medium ( $\alpha$  - MEM) (BÜSCHER et al., 2009).

O cultivo de células mesenquimais frequentemente necessita ser suplementado com até 20% de soro bovino fetal (SBF), mantido a temperatura de 31-37°C, com a concentração de CO<sub>2</sub> entre 2-10%. A fim de se evitar possíveis contaminações, pode-se ainda, adicionar antibióticos como penicilina (10-200 u/mL) e estreptomicina (10-200 ug/mL) (BÜSCHER et al., 2009).

Um aspecto importante a ser considerado nos diversos protocolos de isolamento de células-tronco mesenquimais, obtidas de tecido muscular e adiposo, é o emprego rotineiro da enzima bacteriana colagenase (obtida de *Clostridium histolyticum*), associada ou não a outras enzimas tais como a dispase (obtida de *Bacillus polymyxa*) e a tripsina (extraída de pâncreas bovino) (DE LISIO et al., 2014; LAVASANI et al., 2013; QU-PETERSON et al., 2002). Esta prática está em desacordo com a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº9, de 14 de março de

2011, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) que preconiza que se evite componentes xenobióticos em culturas de células que tenham por finalidade a terapia celular em pacientes humanos. Esta normatização é fortemente fundamentada na possibilidade de produtos de origem animal apresentarem agentes infecciosos e contaminantes potencialmente perigosos como vírus e príons, que podem provocar severas infecções e/ou reações imunológicas, quando empregados para terapia celular em pacientes humanos (MANELLO; TONTI, 2007). Assim, é importante a pesquisa por novas metodologias de isolamento e cultivo de células-tronco sem, no entanto, comprometer o crescimento e proliferação celular *in vitro*.

Dessa forma, objetivou-se, no presente trabalho, analisar comparativamente a eficiência de diferentes métodos de obtenção de células-tronco derivadas de tecido muscular, cultivadas em diferentes meios de cultura, dando início a uma linha sequencial de estudos visando à eliminação paulatina de compostos xenobióticos nos processos de isolamento e cultivo, de modo a estabelecer um protocolo eficiente e seguro destinado às futuras aplicações clínicas.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

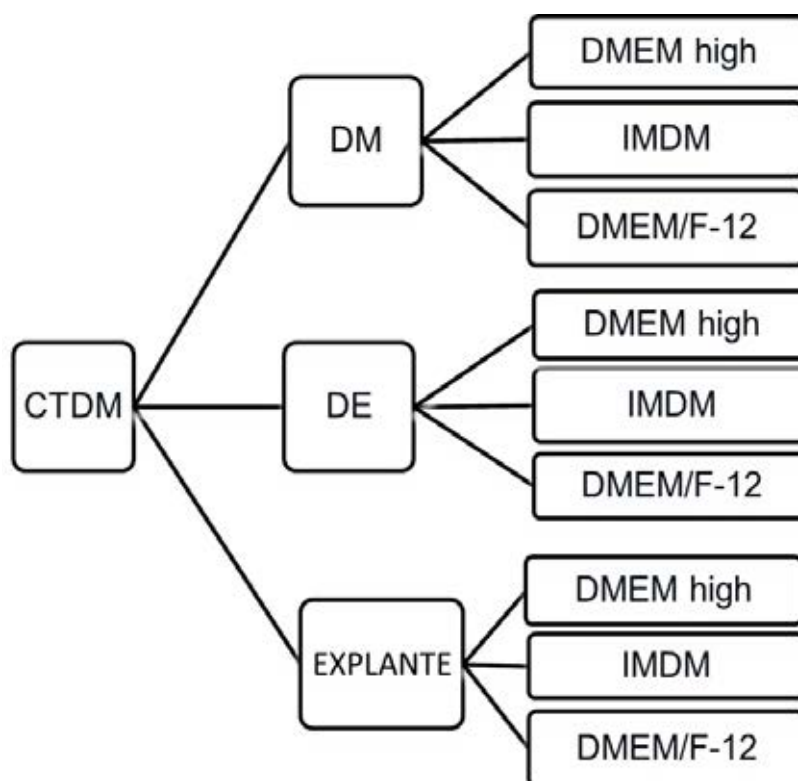
### 2.1. Animais

Foram empregados 24 camundongos machos da linhagem C57BL/6, com idade aproximada de 21 dias. Os animais foram mantidos em caixas de polietileno forradas com maravalha e submetidos a condições padrões de iluminação (claro/escuro de 12/12 horas), em temperatura constante de 22°C. Durante o período do experimento, os camundongos receberam dieta sólida e água *ad libitum*, no biotério da Universidade Estadual Paulista – UNESP. Os animais utilizados foram divididos nos seguintes grupos experimentais, conforme a Tabela 1.

### 2.2. Coleta do Tecido Muscular

Os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e banhados em álcool. O tecido muscular removido dos membros inferiores foi mantido em solução estéril contendo Tampão Fosfato, pH: 7,2 (PBS - LGC, Cotia, Brasil) suplementado com 2% de antibiótico-antimicótico (Gibco, New York, USA), durante 2 horas para desinfecção.





DMEM-High - Dulbecco's Modified Eagle Medium High Glucose Modificado;  
 DMEM/Ham's- F12 - Dulbecco's Modified Eagle Medium High Glucose Modificado- Ham's F-12;  
 IMDM - Iscove's Modified Dulbecco's Medium

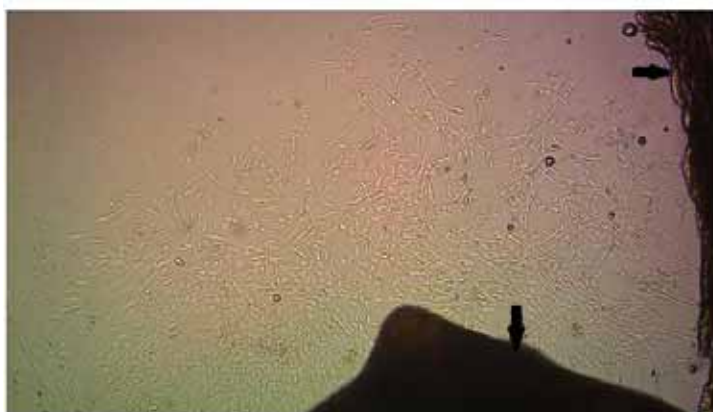
**Figura 1** – Grupos experimentais

## 2.3. Isolamento das Células-tronco derivadas de Tecido Muscular

### 2.3.1. Técnica de Explante

Após a desinfecção, o tecido muscular foi limpo, em placa de Petri, e posteriormente fragmentado em dimensões padronizadas com aproximadamente 50 mm<sup>3</sup>. Em seguida, quatro fragmentos foram dispostos, em forma de cruz, em placas para cultura celular de seis poços e cobertos com meio previamente selecionado.

Os meios foram trocados a cada três dias. As três primeiras trocas foram acompanhadas de lavagem com solução estéril contendo PBS (LGC, Cotia, Brasil), suplementado com 2% de antibiótico-antimicótico (Gibco, New York, USA). Os meios, suplementados com 15% de soro bovino fetal (SBF) e 1% de antibiótico/antimicótico foram trocados a cada três dias e os tecidos foram mantidos em cultura durante dez dias para que as células-tronco se desprenderem (Figura 1).



**Figura 2** – Placa com cultivo de células obtidas por meio de explante de tecido muscular. As setas indicam o tecido muscular (Aumento 40 x).

### 2.3.2. Dissociação Mecânica

Após a desinfecção, o tecido muscular foi limpo, em placa de Petri posteriormente submetido à dissociação mecânica. Duas agulhas de seringa, adaptadas em forma de L (Figura 2), forma empregadas para desagregação dos tecidos obtidos, durante duas horas em meio suplementado com soro bovino fetal, para desagregação máxima do tecido. O material obtido foi então filtrado em malhas de 100 e 70  $\mu\text{m}$  (BD Falcon, New Jersey, USA), para a remoção dos debris e, em seguida, centrifugado por 10 min a 900 g, para precipitação das células-tronco musculares. Os meios foram suplementado com 15% de soro bovino fetal e 1% de antibiótico/antimicótico.



**Figura 3** – Procedimento de dissociação mecânica do tecido muscular

### 2.3.3. Digestão Enzimática

O tecido muscular foi fragmentado e, a seguir, mantido em uma solução de PBS com 0,2% de Colagenase tipo I (Sigma-Aldrich, Missouri, USA), durante 2h a 37°C, sendo cuidadosamente homogeneizado a cada 15 minutos (Figura 3). O tecido foi então filtrado em malhas de 100 e 70  $\mu\text{m}$  (BD Falcon, New Jersey, USA), para a remoção dos “debris”. Em seguida, o material filtrado foi centrifugado por 10 min a 900 g, para precipitação das células musculares, em meios suplementados com 15% de soro bovino fetal e 1% de antibiótico/antimicótico



**Figura 4** – Tecido muscular após a ação da enzima bacteriana colagenase

#### 2.4. Determinação da viabilidade e contagem das células

Após a centrifugação (Figura 4), o sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspenso em 2 mL de meio DMEM-High (LGC, Cotia, Brasil), DMEM/Ham's F-12 (LGC, Cotia, Brasil), ou IMDM (LGC, Cotia, Brasil), suplementados com 15% de soro bovino fetal (SFB) (LGC, Cotia, Brasil) e 1% de antibiótico-antimicótico (Gibco, New York, USA). Uma alíquota de 10  $\mu$ L foi retirada para contagem em câmara de Neubauer. A viabilidade das células foi verificada utilizando-se Azul de Tripán (Sigma-Aldrich, Missouri, USA). Em seguida foi feita a diluição das células isoladas pelo emprego da digestão mecânica e dissociação enzimática, em meio previamente selecionado para contagem. As células foram semeadas em placa de 6 poços (BD Falcon, New Jersey, USA), na concentração  $5 \times 10^3$  células/cm<sup>2</sup> ( $4,8 \times 10^4$  células/poço).

As culturas foram diariamente observadas e fotografadas a cada 7 dias, em microscópio invertido (TCM 400, Labomed, Fremont, USA). Todas as trocas foram feitas a cada três dias.



**Figura 5** – Obtenção de precipitado de células musculares após o processo de centrifugação.

## **2.5. Determinação das curvas de crescimento em diferentes meios cultura**

Após o estabelecimento da cultura primária, com aproximadamente 80 % de confluência, as células foram tripsinizadas (tripsina bovina), centrifugadas e ressuspensas nos respectivos meios de cultura. Para os ensaios de cinética de crescimento e diferenciação, foram empregadas células obtidas pela quinta passagem.

As células foram dispostas, em triplicata, na densidade de  $1 \times 10^3$  células/cm<sup>2</sup>, em placas de cultura de 96 poços (BD, New Jersey, USA), mantidas em meio de cultura, suplementados com 15% de soro bovino fetal e 1% antibiótico/antimicótico (Gibco, New York, USA). Após 24 horas de incubação, os meios foram aspirados e as células lavadas com Tampão Fosfato pH: 7,2 (LGC, Cotia, Brasil) suplementado com 2% de antibiótico-antimicótico (Gibco, New York, USA). Em seguida, foram acrescentados 100 µL de meios DMEM sem fenol e 10 µL de solução de brometo 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT; Sigma- Aldrich, St. Louis, MO) na concentração de 0,5 mg/mL, incubados em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>, por 4 horas. Após este período, o meio foi removido e substituído por 100 µL de dimetil sulfóxido (DMSO; LGC, Cotia, Brasil) para a solubilização dos cristais de formazan, formados pela redução do MTT devido à atividade de enzimas mitocondriais. As leituras de absorbância foram feitas em espectrofotômetro (Multiskan FC Versão 1.0079 – Thermo Fisher Scientific), no comprimento de onda de 560 nm. O procedimento foi

realizado durante 10 dias, com trocas de meios a cada 72 horas e intervalo de leitura correspondente a 24 horas, para obtenção dos valores das absorbâncias empregados na construção das curvas de crescimento (FERNÁNDEZ et al., 2010).

## **2.6. Diferenciações**

### **2.6.1. Diferenciação adipogênica**

Para induzir a diferenciação adipogênica, as células-tronco derivadas de tecido muscular foram plaqueadas a uma concentração de  $1 \times 10^5$  células/cm<sup>2</sup> e cultivadas durante 7 dias na presença do kit de diferenciação osteogênica StemPro<sup>®</sup> (Gibco, New York, USA), segundo a metodologia proposta pelo fabricante. A diferenciação adipogênica foi confirmada pela análise da coloração com Oil Red O (Sigma-Aldrich, Missouri, USA).

### **2.6.2. Diferenciação osteogênica**

Para induzir a diferenciação osteogênica, as células-tronco derivadas de tecido muscular foram plaqueadas a uma concentração de  $1 \times 10^5$  células/cm<sup>2</sup> cultivadas durante 21 dias na presença do kit de diferenciação osteogênica StemPro<sup>®</sup> (Gibco®, New York, USA), segundo a metodologia proposta pelo fabricante. A diferenciação condrogênica foi confirmada pela análise da coloração com Alizarin Red S (Sigma-Aldrich, Missouri, USA).

### **2.6.3. Diferenciação condrogênica**

Para induzir a diferenciação condrogênica, as células-tronco derivadas de tecido muscular foram plaqueadas a uma concentração de  $1 \times 10^5$  células/cm<sup>2</sup> e cultivadas durante 14 dias em presença do kit de diferenciação condrogênica StemPro (Gibco, New York, USA), segundo a metodologia proposta pelo fabricante. A diferenciação condrogênica foi confirmada pela análise da coloração com Alcian Blue (Sigma-Aldrich, Missouri, USA).

### **2.7. Análise estatística**

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software BioEstat 5.0. Os dados foram submetidos à análise de variância paramétrica ANOVA, complementada com o teste de Tukey, para a obtenção da média  $\pm$  desvio padrão. Na ausência de normalidade, foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, complementado com o teste de Student-Neuman, para obtenção de mediana  $\pm$  desvio interquartilico. A significância estatística foi dada para  $p < 0,05$ .

### 3. REFERÊNCIAS

AJIBADE, D. A., VANCE, D. D., HARE, J. M., KAPLAN, L. D., LESNIAK, B. P. Emerging Applications of Stem Cell and Regenerative Medicine to Sports Injuries. **Orthopaedic Journal of Sports Medicine**, v. 2, n. 2, p. 2325967113519935, 2014.

ARAKI, R., UDA, M., HOKI, Y., SUNAYAMA, M., NAKAMURA, M., ANDO, S., ABE, M. Negligible immunogenicity of terminally differentiated cells derived from induced pluripotent or embryonic stem cells. **Nature**, 2013.

ARMAND, A. S., LAUNAY, T., GASPERA, B. D., CHARBONNIER, F., GALLIEN, C. L., CHANOINE, C. Effects of eccentric treadmill running on mouse soleus: degeneration/regeneration studied with Myf-5 and MyoD probes. **Acta physiologica scandinavica**, v. 179, n. 1, p. 75-84, 2003.

ARNASON, A., SIGURDSSON, S. B., GUDMUNDSSON, A., HOLME, I., ENGBRETSSEN, L., BAHR, R. Risk factors for injuries in football. **The American Journal of Sports Medicine**, v. 32, n. 1 suppl, p. 5S-16S, 2004.

ASAKURA, A. Stem cells in adult skeletal muscle. **Trends in cardiovascular medicine**, v. 13, n. 3, p. 123-128, 2003.

BENNETT, N. T., SCHULTZ, G. S. Growth factors and wound healing: biochemical properties of growth factors and their receptors. **The American journal of surgery**, v. 165, n. 6, p. 728-737, 1993.



BRACK, A. S., CONBOY, M. J., ROY, S., LEE, M., KUO, C. J., KELLER, C., RANDO, T. A. Increased Wnt signaling during aging alters muscle stem cell fate and increases fibrosis. **Science**, v. 317, n. 5839, p. 807-810, 2007.

BROOKS, S. V., FAULKNER, J. A. Contractile properties of skeletal muscles from young, adult and aged mice. **The Journal of Physiology**, v. 404, n. 1, p. 71-82, 1988.

BÜSCHER, D., DELGADO, M., GONZALEZ-REY, E. **Uses of mesenchymal stem cells**. U.S. Patent Application 13/057,467, 3 ago. 2009.

BYDLOWSKI, S. P., DEBES, A. A., MASELLI, L. M., JANZ, F. L. Características biológicas das células-tronco mesenquimais. **Rev Bras Hematol Hemoter**, v. 31, n. supl 1, p. 25-35, 2009.

CHEN, W., VILLA-DIAZ, L. G., SUN, Y., WENG, S., KIM, J. K., LAM, R. H., FU, J. Nanotopography influences adhesion, spreading, and self-renewal of human embryonic stem cells. **ACS nano**, v. 6, n. 5, p. 4094-4103, 2012.

CICILIOT, S., SCHIAFFINO, S. Regeneration of mammalian skeletal muscle: basic mechanisms and clinical implications. **Current pharmaceutical design**, v. 16, n. 8, p. 906-914, 2010.

CORDOVA, M. L., INGERSOLL, C. D., PALMIERI, R. M. Efficacy of prophylactic ankle support: an experimental perspective. **Journal of athletic training**, v. 37, n. 4, p. 446, 2002.

CORSELLI, M., CHEN, C. W., CRISAN, M., LAZZARI, L., PÉAULT, B. Perivascular ancestors of adult multipotent stem cells. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 30, n. 6, p. 1104-1109, 2010.

CORSI, K. A., SCHWARZ, E. M., MOONEY, D. J., & HUARD, J. Regenerative medicine in orthopaedic surgery. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 25, n. 10, p. 1261-1268, 2007.

COSSU, G., BIRESSI, S. Satellite cells, myoblasts and other occasional myogenic progenitors: possible origin, phenotypic features and role in muscle regeneration. In: **Seminars in cell & developmental biology**. Academic Press, p. 623-631, 2005.

DAUSSET, J. Presence of A & B antigens in leukocytes disclosed by agglutination tests. **Comptes rendus des seances de la Societe de biologie et de ses filiales**, v. 148, n. 19-20, p. 1607-1608, 1954.

DAVEY, G. C., PATIL, S. B., O'LOUGHLIN, A., O'BRIEN, T. Mesenchymal Stem Cell-Based Treatment for Microvascular and Secondary Complications of Diabetes Mellitus. **Diabetes**, v. 5, p. 86, 2014.

DAWSON, J. I., KANCZLER, J., TARE, R., KASSEM, M., OREFFO, R. O. Concise Review: Bridging the Gap: Bone Regeneration Using Skeletal Stem Cell-Based Strategies—Where Are We Now?. **Stem Cells**, v. 32, n. 1, p. 35-44, 2014.

DE LISIO, M., JENSEN, T., SUKIENNIK, R. A., HUNTSMAN, H. D., BOPPART, M. Substrate and strain alter the muscle-derived mesenchymal stem cell secretome to promote myogenesis. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 5, n. 3, p. 74, 2014.

DOMINICI, M., LE BLANC, K., MUELLER, I., SLAPER-CORTENBACH, I., MARINI, F. C., KRAUSE, D. S., HORWITZ, E. M. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, v. 8, n. 4, p. 315-317, 2006.

ENGEL, A. G., FRANZINI-ARMSTRONG, C. Myology, vol II. **New York, Chicago, San Francisco, Lisbon, London, Madrid, Mexico City, Milan, New Delhi, San Juan, Seoul, Singapore, Sydney, Toronto**, 2004.

FAGOT-LARGEAULT, A. Embriões, células-tronco e terapias celulares: questões filosóficas e antropológicas. **Estudos Avançados**, v. 18, n. 51, p. 227-245, 2004.

FARIA, C. A., DE LAS HERAS KOZMA, R., STESSUK, T., RIBEIRO-PAES, J. T. Experimental basis and new insights for cell therapy in chronic obstructive pulmonary disease. **Stem Cell Reviews and Reports**, v. 8, n. 4, p. 1236-1244, 2012.

FILARDO, G., KON, E., RUIZ, M. T. P., VACCARO, F., GUITALDI, R., DI MARTINO, A., MARCACCI, M. Platelet-rich plasma intra-articular injections for cartilage degeneration and osteoarthritis: single-versus double-spinning approach. **Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy**, v. 20, n. 10, p. 2082-2091, 2012.

FRIEDENSTEIN A.J., PIATETZKY-SHAPIRO I., PETRAKOVA K.V. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. **J Embryol Exp Morph**, v. 16, n. 30, p. 381-390, 1966.

FRIEDENSTEIN, A. J., PETRAKOVA, K. V., KUROLESOVA, A. I., FROLOVA, G.P. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. **Transplantation**, v. 6, p. 230–247, 1968.

GEHMERT, S., WENZEL, C., LOIBL, M., BROCKHOFF, G., HUBER, M., KRUTSCH, W., GEHMERT, S. Adipose Tissue-Derived Stem Cell Secreted IGF-1 Protects Myoblasts from the Negative Effect of Myostatin. **BioMed research international**, v. 2014, 2014.

GUSSONI, E., SONEOKA, Y., STRICKLAND, C. D., BUZNEY, E. A., KHAN, M. K., FLINT, A. F., KUNKEL, L. M., MULLIGAN, R.C. Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation. **Nature**, v. 401, n. 6751, p. 390-394, 1999.

HAYASHI, T., WAKAO, S., KITADA, M., OSE, T., WATABE, H., KURODA, Y., DEZAWA, M. Autologous mesenchymal stem cell–derived dopaminergic neurons function in parkinsonian macaques. **The Journal of clinical investigation**, v. 123, n. 1, p. 272-284, 2013.

HENGEL, K. M. O., VISSER, B., SLUITER, J. K. The prevalence and incidence of musculoskeletal symptoms among hospital physicians: a systematic review. **International archives of occupational and environmental health**, v. 84, n. 2, p. 115-119, 2011.

HORWITZ, E. M., LE BLANC, K., DOMINICI, M., MUELLER, I., SLAPERCORTENBACH, I., MARINI, F. C., KEATING, A. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, v. 7, n. 5, p. 393-395, 2005.

ISAAC, C., MATTOS, C. N. D., RÊGO, F. M. P. D., CARDIM, L. N., ALTRAN, S. C., PAGGIARO, A. O., TUTIHASHI, R. M. C., MATHOR, M. B., FERREIRA, M. C. Replacement of fetal calf serum by human serum as supplementation for human fibroblast culture. **Revista Brasileira de Cirurgia Plástica**, v. 26, n. 3, p. 379-384, 2011.

JACKSON, W. M., NESTI, L. J., TUAN, R. S. Potential therapeutic applications of muscle-derived mesenchymal stem and progenitor cells. **Expert opinion on biological therapy**, v. 10, n. 4, p. 505-517, 2010.

JACOBSON, L. O., SIMMONS, E. L., BETHARD, W. F., MARKS, E. K., ROBSON, M. J. The influence of the spleen on hematopoietic recovery after irradiation injury. **Experimental Biology and Medicine**, v. 73, n. 3, p. 455-459, 1950.

LAVASANI, M., LU, A., THOMPSON, S. D., ROBBINS, P. D., HUARD, J., NIEDERNHOFER, L. J. Isolation of muscle-derived stem/progenitor cells based on adhesion characteristics to collagen-coated surfaces. **Stem Cells and Aging**. Humana Press, p. 53-65, 2013.

LAVASANI, M., ROBINSON, A. R., LU, A., SONG, M., FEDUSKA, J. M., AHANI, B., JEREMY S. T., CHELSEA H. F., PAUL D. R., LAURA J. N., HUARD, J. Muscle-derived stem/progenitor cell dysfunction limits healthspan and lifespan in a murine progeria model. **Nature communications**, v. 3, p. 608, 2012.

LOPES, A. S., KATTAN, R., COSTA, S., MOURA, C. E. Estudo clínico e classificação das lesões musculares. **Rev Bras Ortop**, v. 28, n. 10, p. 707-17, 1993.

MALLIAROPOULOS, N., ISINKAYE, T., TSITAS, K., MAFFULLI, N. Reinjury after acute posterior thigh muscle injuries in elite track and field athletes. **The American journal of sports medicine**, v. 39, n. 2, p. 304-310, 2011.

MANNELLO, F., TONTI, G. A. Concise Review: No Breakthroughs for Human Mesenchymal and Embryonic Stem Cell Culture: Conditioned Medium, Feeder Layer, or Feeder-Free; Medium with Fetal Calf Serum, Human Serum, or Enriched Plasma; Serum-Free, Serum Replacement Nonconditioned Medium, or Ad Hoc Formula? All That Glitters Is Not Gold!. **Stem Cells**, v. 25, n. 7, p. 1603-1609, 2007.

MARQUES, L. F., STESSUK, T., CAMARGO, I. C. C., SABEH JUNIOR, N., SANTOS, L. D., RIBEIRO-PAES, J. T. Platelet-rich plasma (PRP): Methodological aspects and clinical applications. **Platelets**, n. 0, p. 1-13, 2014.

MAURO, Alexander. Satellite cell of skeletal muscle fibers. **The Journal of biophysical and biochemical cytology**, v. 9, n. 2, p. 493-495, 1961.

MINASI, M. G., RIMINUCCI, M., DE ANGELIS, L., BORELLO, U., BERARDUCCI, B., INNOCENZI, A., COSSU, G. The meso-angioblast: a multipotent, self-renewing cell that originates from the dorsal aorta and differentiates into most mesodermal tissues. **Development**, v. 129, n. 11, p. 2773-2783, 2002.

NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH. **Stem cells: scientific progress and future research directions**. University Press of the Pacific, 2004.

NOONAN, T. J., GARRETT, W. E. Muscle strain injury: diagnosis and treatment. **Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons**, v. 7, n. 4, p. 262-269, 1999.

ORCHARD, J. W., BEST, T. M., MUELLER-WOHLFAHRT, H. W., HUNTER, G., HAMILTON, B. H., WEBBORN, N., JAQUES, R., KENNEALLY, D., BUDGETT, B., PHILLIPS, N., BECKER, C., GLASGOW, P. The early management of muscle strains in the elite athlete: best practice in a world with a limited evidence basis. **British Journal of Sports Medicine**, v. 42, n. 3, p. 158-159, 2008.

PÉAULT, B., RUDNICKI, M., TORRENTE, Y., COSSU, G., TREMBLAY, J. P., PARTRIDGE, T., HUARD, J. Stem and progenitor cells in skeletal muscle development, maintenance, and therapy. **Molecular Therapy**, v. 15, n. 5, p. 867-877, 2007.

PEERS, K. H. E., LYSENS, R. J. J. Patellar tendinopathy in athletes. **Sports Medicine**, v. 35, n. 1, p. 71-87, 2005.

PINTO, S. S., CASTILLO, A. A. Lesão muscular: fisiopatologia e tratamento. **Fisioter. mov**, v. 12, n. 2, p. 23-36, 1999.

PRÜSS-ÜSTÜN, A., CORVALÁN, C. **Preventing disease through healthy environments**. Geneva: World Health Organization, 2006.

QU-PETERSEN, Z., DEASY, B., JANKOWSKI, R., IKEZAWA, M., CUMMINS, J., PRUCHNIC, R., HUARD, J. Identification of a novel population of muscle stem cells in mice potential for muscle regeneration. **The Journal of cell biology**, v. 157, n. 5, p. 851-864, 2002.

RANDO, T. A., BLAU, H. M. Primary mouse myoblast purification, characterization, and transplantation for cell-mediated gene therapy. **The Journal of cell biology**, v. 125, n. 6, p. 1275-1287, 1994.



RIBEIRO-PAES, J. T., BILAQUI, A., GRECO, O. T., RUIZ, M. A., ALVES-DE-MORAES, L. B., FARIA, C. A., STESSUK, T. Terapia celular em doenças pulmonares: existem perspectivas. **Rev Bras Hematol Hemoter**, v. 31, n. Supl 1, p. 140-8, 2009.

RIBEIRO-PAES, J. T., STESSUK, T., & DE LAS HERAS KOZMA, R. Cell therapy in Chronic Obstructive Pulmonary Disease: state of the art and perspectives. **Chronic Obstructive Pulmonary Disease-Current Concepts and Practice**. Rijeka: InTech, p. 455-74, 2012.

ROCHA, R. S. B., CAVALLIERI, A. G. Lesão, plasticidade e reabilitação do sistema muscular. **Rev. bras. ciênc. mov**, v. 15, n. 2, p. 81-85, 2007.

ROGERS, M. A., EVANS, W. J. Changes in skeletal muscle with aging: effects of exercise training. **Exercise and sport sciences reviews**, v. 21, n. 1, p. 65-102, 1993.

SAGGIN, A., OVANDO, A., WIERCINSKI, C., ANDREAZZA, M., & BIGOLIN, S. E. Lesões Osteomusculares no Futebol. **Revista Contexto & Saúde**, v. 3, n. 04, p. 83-93, 2003.

SAHRAIAN, M. A., BONAB, M. M., KARVIGH, S. A., YAZDANBAKHSH, S., NIKBIN, B., & LOTFI, J. Intrathecal Mesenchymal Stem Cell Therapy in Multiple Sclerosis: A Follow-Up Study for Five Years After Injection. **Archives of Neuroscience**, v. 1, n. 2, p. 71-75, 2013.

SAMPSON, S., GERHARDT, M., MANDELBAUM, B. Platelet rich plasma injection grafts for musculoskeletal injuries: a review. **Current reviews in musculoskeletal medicine**, v. 1, n. 3-4, p. 165-174, 2008.

SEALE, P., ASAKURA, A., RUDNICKI, M. A. The potential of muscle stem cells. **Developmental cell**, v. 1, n. 3, p. 333-342, 2001.

SRIVASTAVA, A. K., BULTE, J. W. M. Seeing Stem Cells at Work *In vivo*. **Stem Cell Reviews and Reports**, v. 10, n. 1, p. 127-144, 2014.

STANGEL-WOJCIKIEWICZ, K., JAROCHA, D., PIWOWAR, M., JACH, R., UHL, T., BASTA, A., & MAJKA, M. Autologous muscle-derived cells for the treatment of female stress urinary incontinence: A 2-year follow-up of a polish investigation. **Neurourology and urodynamics**, v. 33, n. 3, p. 324-330, 2014.

TEKKATTE, C., GUNASINGH, G. P., CHERIAN, K. M., SANKARANARAYANAN, K. "Humanized" stem cell culture techniques: the animal serum controversy. **Stem cells international**, v. 2011, 2011.

THOMAS, E. D., LOCHTE JR, H. L., LU, W. C., FERREBEE, J. W. Intravenous infusion of bone marrow in patients receiving radiation and chemotherapy. **New England Journal of Medicine**, v. 257, n. 11, p. 491-496, 1957.

TILL, J. E., MCCULLOCH, E. A. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. **Radiation research**, v. 14, n. 2, p. 213-222, 1961.

USAS, A., HUARD, J. Muscle-derived stem cells for tissue engineering and regenerative therapy. **Biomaterials**, v. 28, n. 36, p. 5401-5406, 2007.

VAN VELTHOVEN, C. T., SHELDON, R. A., KAVELAARS, A., DERUGIN, N., VEXLER, Z. S., WILLEMEN, H. L., Maas, M., HEIJNEN, C. J., FERRIERO, D. M. Mesenchymal stem cell transplantation attenuates brain injury after neonatal stroke. **Stroke**, v. 44, n. 5, p. 1426-1432, 2013.

VERDIJK, L. B., SNIJDERS, T., DROST, M., DELHAAS, T., KADI, F., VAN LOON, L. J. Satellite cells in human skeletal muscle; from birth to old age. **Age**, v. 36, n. 2, p. 545-557, 2014.

WEBSTER, C., BLAU, H. M. Accelerated age-related decline in replicative life-span of Duchenne muscular dystrophy myoblasts: implications for cell and gene therapy. **Somatic cell and molecular genetics**, v. 16, n. 6, p. 557-565, 1990.

**4. ARTIGO A SER SUBMETIDO À REVISTA BRASILEIRA DE ORTOPEDIA**

**ARTIGO ORIGINAL****ANÁLISE COMPARATIVA DE DIFERENTES METODOLOGIAS PARA  
CULTIVO DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DERIVADAS DE  
TECIDO MUSCULAR**

Laís Fernanda Marques, Natália Cristina dos Santos, João Tadeu Ribeiro-Paes\*

Trabalho realizado no laboratório de Genética e Terapia Celular da Faculdade de Ciências e Letras – UNESP/Assis - SP - Brasil.

\*Autor para correspondência: João Tadeu Ribeiro Paes

Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual Paulista.

Av. Dom Antônio, 2100, Assis, 19806-900 SP, Brasil

Tel +55 18 3302 5856

Email [jtrpaes@yahoo.com.br](mailto:jtrpaes@yahoo.com.br)

Os autores declaram que não há conflito de interesses.

## Resumo

As pesquisas com células-tronco têm avançado expressivamente e ocupam um papel de destaque no contexto do novo ramo terapêutico que se convencionou denominar de medicina regenerativa. A abundância e facilidade de obtenção do tecido muscular têm permitido a ampliação dos estudos acerca de seu potencial como fonte de células-tronco mesenquimais. Neste sentido, diferentes metodologias têm sido propostas para a obtenção de células-tronco mesenquimais oriundas do tecido muscular (CTDM), objetivando cultivo e aplicação clínica em medicina humana e veterinária. Um aspecto importante a ser considerado nos diversos protocolos de isolamento de células-tronco mesenquimais refere-se ao emprego rotineiro da colagenase de origem bacteriana (*Clostridium histolyticum*). O emprego de reagentes xenobióticos, como a colagenase, rotineiramente empregados, vão de encontro às recomendações da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA - Brasil), que preconiza a não utilização desses produtos no cultivo de células destinadas à terapia celular em pacientes humanos, uma vez que podem conter agentes infecciosos e contaminantes capazes de desencadear severas reações imunológicas. Neste contexto, objetivou-se, neste estudo, a proposição de novas metodologias a fim de substituir o emprego de xenobióticos no processo de obtenção CTDM. Para tanto, foram comparados os métodos de digestão enzimática (colagenase), dissociação mecânica e explante, em diferentes meios de cultura. O conjunto de resultados mostra que as técnicas de dissociação mecânica e explante são metodologias viáveis para substituição da colagenase em procedimentos de obtenção de CTDM. Estas novas abordagens metodológicas representam, portanto, um avanço para terapia celular, em consonância com as recomendações da ANVISA.

**Palavras-chave:** células-tronco; tecido muscular, digestão enzimática; dissociação mecânica; explante.

## **COMPARATIVE ANALYSIS OF DIFFERENT METHODS FOR CULTURE OF MUSCLE-DERIVED STEM CELLS**

### **ABSTRACT**

The researches with stem cells have advanced significantly and take a prominent role in the context of the new treatment branch that has been conventionally called of regenerative medicine. The abundance and ease of obtaining muscle tissue have allowed the expansion of studies on its potential as a source of mesenchymal stem cells. In this sense, different methodologies have been proposed for obtaining mesenchymal stem cells derived of muscle tissue (SCDM), aiming cultivation and clinical application in human and veterinary medicine. An important aspect to be considered in the various protocols of isolation of mesenchymal stem cells refers to the routine use of bacterial collagenase (*Clostridium histolyticum*). The use of xenobiotic reagents, such as collagenase, contrasts with the recommendations of the National Health Surveillance Agency (ANVISA - Brazil), which recommends the avoidance of the use of these products in the cultivation of cells destined for cell therapy in human patients, since which may contain infectious agents and contaminants that are capable of triggering severe immunological reactions. In this context, we aimed in this study to propose new methods to replace the use of xenobiotics in the process of obtaining SCDM. For this end, the methods of enzymatic digestion (collagenase), mechanical dissociation and explant were compared in different culture media. The set of results shows that the techniques of mechanical dissociation and explant are viable methodologies for replacement of

collagenase procedures for obtaining SCDM. These new methodological approaches, therefore, represent an advance for cell therapy, in accordance with the recommendations of ANVISA.

**Keywords: Palavras-chave:** stem cells, muscle, enzymatic digestion; mechanical dissociation, explante.



## Introdução

A elevada incidência de lesões musculoesqueléticas (LME) representa um grave problema de saúde pública mundial. Estimativas da Organização Mundial de Saúde (OMS) apontam as exposições ocupacionais como responsáveis por 37% LME, acarretando prejuízos sociais e econômicos, uma vez que afetam a qualidade de vida, a produtividade e aumenta as taxas de absenteísmo no trabalho [1-4].

Atletas profissionais ou recreacionais, idosos e portadores de distrofia muscular estão entre os principais acometidos por desordens musculares em virtude da ocorrência de constantes danos ao sarcolema. Repetidos ciclos de degeneração/regeneração resultam no esgotamento dos principais precursores musculares residentes, as células satélites, levando a processos reparativos lentos e incompletos [5-6]. Desse modo, é lícita a busca por novas opções terapêuticas com potencial de sanar este problema.

As células-tronco, em especial as derivadas de tecido muscular (CTDM), despontam como uma promissora opção terapêutica para o tratamento de LME. A considerável abundância do tecido muscular, que representa cerca de 40% da massa corporal, bem como a possibilidade de coleta por métodos minimamente invasivos, como biópsias musculares ou o aproveitamento de fragmentos de tecido descartados durante reconstruções ortopédicas, fazem das CTDM candidatas promissoras para o emprego da terapia celular [7-8].

Expansões celulares *in vitro* de CTDM são necessárias a fim de se obter volumes celulares adequados ao emprego terapêutico. Os protocolos frequentemente adotados para obtenção e/ou propagação de CTDM, utilizam-se de compostos xenobióticos como as enzimas colagenase (obtida de *Clostridium*

*histolyticum*), dispase (obtida de *Bacillus polymyxa*) e a tripsina (extraída de pâncreas bovino), suplementadas com soro bovino fetal (SBF). O emprego destes componentes, de origem xenobiótica, apresenta segurança questionável, uma vez que existe o risco de infecções virais, bacterianas, por zoonoses ou príons, desencadeando severas reações imunológicas no organismo receptor [9].

Deste modo, visando à eliminação de componentes xenobióticos, o presente trabalho comparou o desenvolvimento do cultivo de CTDM obtidas por meio das técnicas de explante, dissociação mecânica e digestão enzimática, cultivadas em meios diferentes meios de cultura a fim de se avaliar a possibilidade de obtenção CTDM prescindindo-se de componentes xenobióticos.

## **Materiais e Métodos**

### **Animais**

Foram empregados camundongos machos da linhagem C57Bl/6, com aproximadamente 21 dias. Os animais foram mantidos no Biotério da Universidade Estadual Paulista – Campus de Assis (SP, Brasil) em caixas de polipropileno forradas com maravalha, em sala com condições padrões de iluminação (claro/escuro de 12/12 horas), em temperatura constante de 22°C. Durante o período do experimento, os camundongos receberam dieta sólida e água *ad libitum*.

### **Grupos Experimentais**

Os animais foram divididos em nove grupos experimentais: DE DMEM, DE DMEM/F-12, DE IMDM, DM DMEM, DM DMEM/F-12, DM IMDM, E DMEM, E DMEM/F-12 e E IMDM. Os grupos DE consistiram na obtenção das células-tronco mesenquimais de tecido muscular (CTDM) obtidas pelo método da digestão enzimática, cultivadas em meios Dulbecco's Modified Eagle Medium High Glucose Modificado (DMEM-High; LGC, Cotia, Brasil), Dulbecco's Modified Eagle Medium High Glucose Modificado- Ham's F-12 (DMEM/Ham's- F12; LGC, Cotia, Brasil) e Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM; LGC, Cotia, Brasil), suplementados com soro bovino fetal (SBF; LGC, Cotia, Brasil) e 1% de antibiótico-antimicótico (Gibco, New York, USA). Nos grupos DM as CTDM foram obtidas por dissociação mecânica do tecido muscular e cultivados em DMEM-High, DMEM/Ham's- F12 e IMDM, suplementados com 15% de SBF e 1% de antibiótico-antimicótico . Nos grupos E foi empregada a técnica de explante, cultivados em meios DMEM-High, DMEM/Ham's- F12 e IMDM, suplementados com 15 % de SBF e 1% de antibiótico-antimicótico.

### **Isolamento das CTDM**

Os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e os membros inferiores foram dissecados. O tecido muscular foi mantido em solução estéril contendo Tampão Fosfato pH: 7,2 (PBS - LGC, Cotia, Brasil) suplementado com 2% de antibiótico-antimicótico (Gibco, New York, USA), durante duas horas para a desinfecção. Após a desinfecção, 3 gramas de tecido foram fragmentadas e enzimaticamente digeridas em PBS contendo 0,2% de Colagenase tipo 1 (Sigma-

Aldrich, Missouri, USA). Outros 3 gramas foram mecanicamente dissociados, durante duas horas, com o auxílio de duas agulhas dobradas, em forma de L para a fragmentação do tecido e, por fim, constituindo a técnica de explante, fragmentos com tamanho padronizados de 0,5 mm de tecido muscular foram dispostos na forma de cruz em placas de cultura, contendo 6 poços (BD, New Jersey, USA);

Após a desagregação celular pelos métodos mecânico e enzimático, o material obtido foi filtrado em malhas de 100 e 70  $\mu\text{m}$  (Cell Strainer; BD Falcon), para a remoção dos restos celulares. Em seguida, o material foi centrifugado por 10 min a 900 g, para precipitação das células musculares que foram ressuspensas na concentração de  $5 \times 10^3$  células/ $\text{cm}^2$ . Os meios foram trocados a cada três dias. As três primeiras trocas foram acompanhadas de lavagem com solução estéril contendo PBS (LGC, Cotia, Brasil), suplementado com 2% de antibiótico-antimicótico (Gibco, New York, USA).

### **Determinação da viabilidade e contagem das células**

Alíquotas de 10  $\mu\text{L}$  foram retiradas para contagem das células em câmara de Neubauer. A viabilidade das células foi verificada utilizando-se Azul de Tripán. Em seguida foi feita a diluição das células isoladas, em meio previamente selecionado, para contagem. As células foram semeadas em placa de 6 poços (BD Falcon™, New Jersey, USA), na concentração  $5 \times 10^3$  células/ $\text{cm}^2$ . As culturas foram diariamente observadas e fotografadas a cada 7 dias, em microscópio invertido (TCM 400, Labomed, Fremont, USA) Todas as trocas foram feitas a cada três dias.

### **Determinação das curvas de crescimento em diferentes meios cultura**

As células foram dispostas, em triplicata, na densidade de  $1 \times 10^3$  células/cm<sup>2</sup>, em placas de cultura de 96 poços (BD, New Jersey, USA), mantidas em meio de cultura, suplementados com 15% de soro bovino fetal e 1% antibiótico/antimicótico (Gibco, New York, USA). Após a quinta passagem, as células foram incubadas por 24 horas. Os meios foram aspirados e as células lavados com Tampão Fosfato pH: 7,2 (LGC, Cotia, Brasil) suplementado com 2% de antibiótico-antimicótico (Gibco, New York, USA). Em seguida, foram acrescentados 100 µL de meios DMEM sem fenol e 10 µL de solução de brometo 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazólio) (MTT; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) na concentração de 0,5 mg/mL, mantidos por 4 h em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Após este período, o meio foi removido e substituído por 100 µL de dimetil sulfóxido (DMSO; LGC, Cotia, Brasil) para a solubilização dos cristais de formazan, formados pela redução do MTT devido à atividade de enzimas mitocondriais. As leituras de absorvância foram feitas em espectrofotômetro (Multiskan FC Versão 1.0079 – Thermo Fisher Scientific), no comprimento de onda de 560 nm. O procedimento foi realizado durante 10 dias, e os valores das absorvâncias foram empregados para a construção das curvas de crescimento [10].

### **Diferenciação adipogênica**

As CTDM foram semeadas na densidade inicial de  $1 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup>. A diferenciação adipogênica foi feita utilizando-se do kit StemPro (Gibco, New York, USA), segundo as instruções do fabricante. A diferenciação adipogênica foi confirmada pela análise da coloração com Oil Red O (Sigma-Aldrich, Missouri, USA).

### **Diferenciação osteogênica**

As CTDM foram semeadas na densidade inicial de  $1 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup>. A diferenciação osteogênica foi feita utilizando-se do kit StemPro (Gibco, New York, USA), segundo as instruções do fabricante. A diferenciação osteogênica foi confirmada pela análise da coloração com Alizarin Red S (Sigma-Aldrich, Missouri, USA).

### **Diferenciação condrogênica**

As CTDM foram semeadas na densidade inicial de  $1 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup>. A diferenciação condrogênica foi feita utilizando-se do kit StemPro (Gibco, New York, USA), segundo as instruções do fabricante. A diferenciação condrogênica foi confirmada pela análise da coloração com Alcian Blue (Sigma-Aldrich, Missouri, USA).

### **Análise estatística**

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software BioEstat 5.0. Os dados foram submetidos à análise de variância paramétrica ANOVA, complementada com o teste de Tukey, para a obtenção da média  $\pm$  desvio padrão. Na ausência de normalidade, foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, complementado com o teste de Student-Neuman, para obtenção de mediana  $\pm$  desvio interquartilico. A significância estatística foi dada para  $p < 0,05$ .

## Resultados

As culturas obtidas pelo método de dissociação mecânica apresentaram crescimento lento, em especial durante a cultura primária, devido a presença de restos celulares, que reduziram o espaço disponível na placa de cultura celular. No sétimo dia, entretanto, conforme se apreende pela análise da Figura 1, verifica-se o aparecimento das primeiras células alongadas, em áreas periféricas, enquanto, paralelamente, os artefatos e restos celulares (“debris”) acumularam-se entre as células. No 14º dia de cultura, as placas contendo meio IMDM e DMEM/F-12 apresentaram confluência próxima de 60%, enquanto que para o meio DMEM-High houve confluência de 40%. No 21º dia, as placas contendo IMDM apresentaram expressiva proliferação, ao atingir mais de 90% de confluência, necessitando, portanto, serem tripsinizadas. Os meios DMEM-High e DMEM/F-12 foram tripsinizados no 30º dia, com confluência aproximada de 80%.

Após as sucessivas tripsinizações e transferências das células para novas placas de cultivo (“passagens”), os debris/artefatos presentes na dissociação mecânica foram paulatinamente eliminados e o padrão de crescimento celular assemelhou-se ao dos demais grupos, excetuando-se as células mantidas em meio DMEM que demandaram maior tempo para atingir a confluência de 80%.

Durante a primeira semana de cultivo, as células obtidas pelo método de digestão enzimática, apresentaram pequenas colônias, esparsamente distribuídas, com confluência, aproximada, de 30%, em relação à área total da placa de cultivo celular. No 14º dia de cultivo, todos os diferentes meios de cultura apresentaram confluência aproximada de 60%, sendo tripsinizados no 21º dia, ao apresentarem confluência de 80%. Destaca-se, neste resultado, a área de confluência superior a 90%, obtida em meio IMDM (Figura 2).

Os resultados de cultivo celular das células obtidas pela metodologia de isolamento celular por meio de explante, conforme apresentado na Figura 3, mostraram que, na primeira semana, houve desprendimento de pequeno número de células do tecido muscular, com migração e aderência à região da placa de cultivo contendo meio de cultura. No 14º dia de cultivo, o tecido muscular foi retirado. Neste estágio do cultivo celular, os meios DMEM-High e IMDM apresentaram confluência aproximada de 30% ao passo que o DMEM/F-12 apresentou confluência de 15%. No 21º dia, todos os meios apresentaram confluência de 60%, inclusive o meio DMEM/F-12 que nos primeiros dias que cultura apresentou crescimento mais lento. Todas as culturas de explante foram tripsinizadas no 30º dia, com 90% e confluência (Figura 3).

As curvas de crescimento de células obtidas pela dissociação mecânica mostraram que o número de células aumentou com decorrer do tempo nos três meios de cultura. Contudo, o meio de cultivo IMDM apresentou maior proliferação celular, em comparação aos meios DMEM/F-12 e DMEM-High, que mostraram proliferação semelhante (Figura 4).

Conforme se verifica na Figura 5, as Curvas de crescimento celular obtidas pela técnica de digestão enzimática apontam crescimento mais expressivo em meio de cultura DMEM/F-12, em comparação aos outros meios empregados.

As curvas de crescimento de CTDM obtidas pela técnica de explante mostraram que, em cada período de tempo analisado, o meio de cultivo IMDM apresentou os maiores valores de proliferação celular, conforme também se verifica na Figura 6.

Os resultados fornecidos pela Tabela 1 apontam que a proliferação das CTDM obtidas pelos diferentes métodos foi influenciada tanto pelo método de



obtenção empregado para o isolamento das células, como pelo meio de cultivo utilizado. Todos os grupos experimentais foram capazes de suportar a expansão celular (embora em diferentes proporções), bem como mantiveram o potencial de diferenciarem nas linhagens adipogênica, condrogênica e osteogênica (Figura 7).

De acordo com a Tabela 1, as células obtidas pela técnica de explante e dissociação mecânica apresentaram melhores resultados em meio de cultivo IMDM, seguido DMEM/F-12 e de DMEM-High. Os melhores resultados com a técnica de digestão enzimática foram obtidos com meio, F12, seguidos de IMDM e DMEM-High.

Quanto à técnica de digestão enzimática, o resultado mais expressivo foi alcançado em meio de cultivo DMEM/F-12, embora não tenha diferido estatisticamente quando comparada ao meio IMDM. Em contrapartida, o meio DMEM-High apresentou a menor proliferação celular em todos os métodos de obtenção empregados (Tabela 1).

A Figura 7 mostra que os métodos de digestão enzimática, dissociação mecânica e explante, empregados para o isolamento das células de tecido muscular, foram capazes permitir o isolamento de CTDM, uma vez que, sob condições apropriadas, se diferenciaram nas três linhagens que caracterizam as células-tronco mesenquimais. As estruturas coradas de vermelho, da diferenciação adipogênica, indicam os vacúolos lipídicos, corados com Oil Red O. As estruturas coradas de azul escura, nas diferenciações condrogênica representam proteoglicanos, corados com Alcian Blue, e por fim, as estruturas vermelho-alaranjadas representam os depósitos de cálcio corados com Vermelho de Alizarina S.

## Discussão

Considerando as necessidades específicas de cada tipo celular, diferentes meios de cultura têm sido propostos para viabilizar o crescimento e a proliferação celular *in vitro*. Os diferentes meios buscam, de forma geral, manter os componentes, osmolaridade e pH sanguíneo para mimetizar, *in vitro*, a homeostase, ou seja o estado de equilíbrio celular, *in vivo* [11].

Para a obtenção de células-tronco mesenquimais, emprega-se rotineiramente, a enzima colagenase (obtida de *Clostridium histolyticum*), podendo estar associada às enzimas dispase (obtida de *Bacillus polymyxa*) e tripsina, extraída de pâncreas bovino [12-14].

Buscando estabelecer de forma gradativa uma metodologia de cultivo celular que prescindia de produtos xenobióticos, foram comparados três procedimentos para separação de células mesenquimais de tecido muscular: digestão enzimática, dissociação mecânica e explante. Estes procedimentos foram testados em diferentes meios de cultura: DMEM-High, DMEM/F-12 e IMDM, suplementados com soro bovino fetal e antibiótico/antimicótico.

A análise comparativa da constituição química entre os três meios de cultura empregados, evidenciou a ausência total de bicarbonato de sódio, bem como a metade da concentração de piruvato de sódio em meio Ham's F-12, em comparação aos meios DMEM-High e IMDM. Considerando que as células musculares não sobrevivem na ausência de piruvato [15], é possível inferir que esta seja a causa do menor desempenho das culturas primárias empregando a técnica de explante em meio DMEM/F-12, uma vez que as fibras musculares poderiam estar sendo

prejudicadas pela ausência de bicarbonato de sódio, que segundo Guolo e Powers et al. atua como principal tampão extracelular [16-17].

Após a remoção do explante, no décimo dia, a proliferação celular em meio DMEM/F-12 passou a se intensificar e alcançou 90% de confluência no 30º dia de cultura, equiparando-se aos meios DMEM-High e DMEM/Ham's-F12 evidenciando que as CTDM que migraram do tecido não foram dependentes do bicarbonato de sódio e do piruvato de sódio.

Em geral, trabalhos empregando a técnica de explante têm apresentado resultados satisfatórios, independente do tecido de origem. Girard et al., em 2011, cultivou explantes humanos de tecido nasal, em DMEM/Ham's F-12, atingindo confluência entre 7 a 14 dias. O sucesso da técnica de explante, segundo o autor, está associado à espessura do tecido que deve estar entre 0,2 a 0,5 mm [14]. Apesar de empregarmos explante com 0,5 mm, nossos resultados foram diferentes para o tecido muscular, uma vez que foram necessários 30 dias para que as células atingissem a confluência de 80%, podendo então ser tripsinizadas

Um estudo conduzido por Lizier e colaboradores, em 2012, mostrou resultados similares em células-tronco obtidas de polpa dentária pelo método de explante [18]. Visando a otimização dos meios de cultura empregados para a proliferação celular, Lizier comparou os meios Alpha-MEM, DMEM/Ham's F-12 E DMEM-LG (suplementado com L-glutamina, assim como o DMEM-High empregado no presente trabalho), verificando DMEM-LG como o ineficiente para o isolamento e proliferação. Contudo, após o processo de criopreservação, este meio foi capaz de suportar a expansão celular, embora tenha voltado a apresentar menor desempenho após a 15ª passagem. Estudos subsequentes comparando o desempenho de células-tronco mesenquimais derivadas de tecido muscular devem, portanto, ser

realizados a fim se comparar se há, também para este tecido, alteração no padrão de proliferação das culturas cultivadas em DMEM-High e submetidas a criopreservação.

A comparação entre células-tronco mesenquimais obtidas por digestão enzimática e métodos prescindindo-se o uso de enzimas, foi também verificada em estudos de tecido adiposo. Bianchi et al., em 2013, propôs o isolamento de células-tronco mesenquimais de tecido adiposo por meio de procedimento mecânico executado por sistemas de imersão fechados, obtendo volumes consideráveis de células-tronco, possibilitando, inclusive a obtenção de culturas com menos elementos hematopoéticos quando comparado ao lipoaspirado digerido enzimaticamente [19]. Estes dados corroboram aqueles obtidos, em nosso laboratório, pelo método de dissociação mecânica em meio IMDM, uma vez que, assim como reportados pelo trabalho de Bianchi et al. (2013), esse grupo experimental apresentou boa capacidade proliferativa e alcançou 80% de confluência em aproximadamente 14 dias.

Outro procedimento, seguindo ainda o princípio da eliminação de xenobióticos, foi empregado por Shah et al., também em 2013, substituindo a digestão enzimática do tecido adiposo pela lavagem do lipoaspirado [20]. Os pesquisadores obtiveram taxa proliferativa de, aproximadamente, 20 vezes menor no processo de lavagem. Nossos resultados estão coerentes com esses achados, uma vez que, com o emprego de meio DMEM/F-12 no cultivo de células-tronco derivadas de tecido muscular obtidas enzimaticamente, houve crescimento, neste meio, três vezes superior relativamente às células oriundas do procedimento de dissociação mecânica. Por outro lado, a dissociação mecânica e o explante

cultivados em IMDM apresentaram resultados similares à digestão enzimática cultivadas em meio de cultura DMEM/F-12.

### **Conclusão**

O conjunto de resultados mostra que as técnicas de dissociação mecânica e explante representam alternativas metodológicas viáveis para substituição da collagenase, de origem bacteriana, em procedimentos de obtenção de células-tronco mesenquimais oriundas do tecido muscular. Estas novas abordagens metodológicas representam, portanto, um avanço para terapia celular, em consonância com Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº9, de 14 de março de 2011, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), que preconiza a substituição de xenobióticos em culturas de células tronco cuja finalidade seja o emprego em terapia celular de pacientes humanos [21]. Dessa forma, os resultados obtidos representam um forte embasamento experimental para substituição, sem prejuízo do rendimento, da digestão enzimática pelo emprego de explante ou dissociação mecânica.

## **5. CONCLUSÕES GERAIS**

Os experimentos evidenciaram a possibilidade de obtenção de células-tronco obtidas de tecido muscular, prescindindo-se do componente xenobiótico Colagenase. Todos os grupos experimentais foram capazes de suportar a expansão celular, bem como mantiveram o potencial de diferenciarem nas linhagens adipogênica, condrogênica e osteogênica.

## 6. REFERÊNCIAS

1. Prüss-Üstün, A, Corvalán, C. Preventing disease through healthy environments. Geneva: World Health Organization. 2006.
2. Hengel, KMO, Visser, B, Sluiter, JK. The prevalence and incidence of musculoskeletal symptoms among hospital physicians: a systematic review. *International archives of occupational and environmental health*. 2011; 84(2), 115-119.
3. Filardo, G, Kon, E, Ruiz, MTP, Vaccaro, F, Guitaldi, R, Di Martino, A, et al. Platelet-rich plasma intra-articular injections for cartilage degeneration and osteoarthritis: single-versus double-spinning approach. *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy*. 2012; 20(10), 2082-2091.
4. Ajibade, DA, Vance, DD, Hare, JM, Kaplan, LD, Lesniak, BP. Emerging Applications of Stem Cell and Regenerative Medicine to Sports Injuries. *Orthopaedic Journal of Sports Medicine*. 2014; 2(2), 2325967113519935.
5. Orchard, J W, Best, TM, Mueller-Wohlfahrt, HW, Hunter, G, Hamilton, BH, Webborn, N, et al. The early management of muscle strains in the elite athlete: best practice in a world with a limited evidence basis. *British Journal of Sports Medicine*. 2008; 42(3), 158-159.
6. Peers, KH, Lysens, RJ. Patellar tendinopathy in athletes. *Sports Medicine*, 2005; 35(1), 71-87.

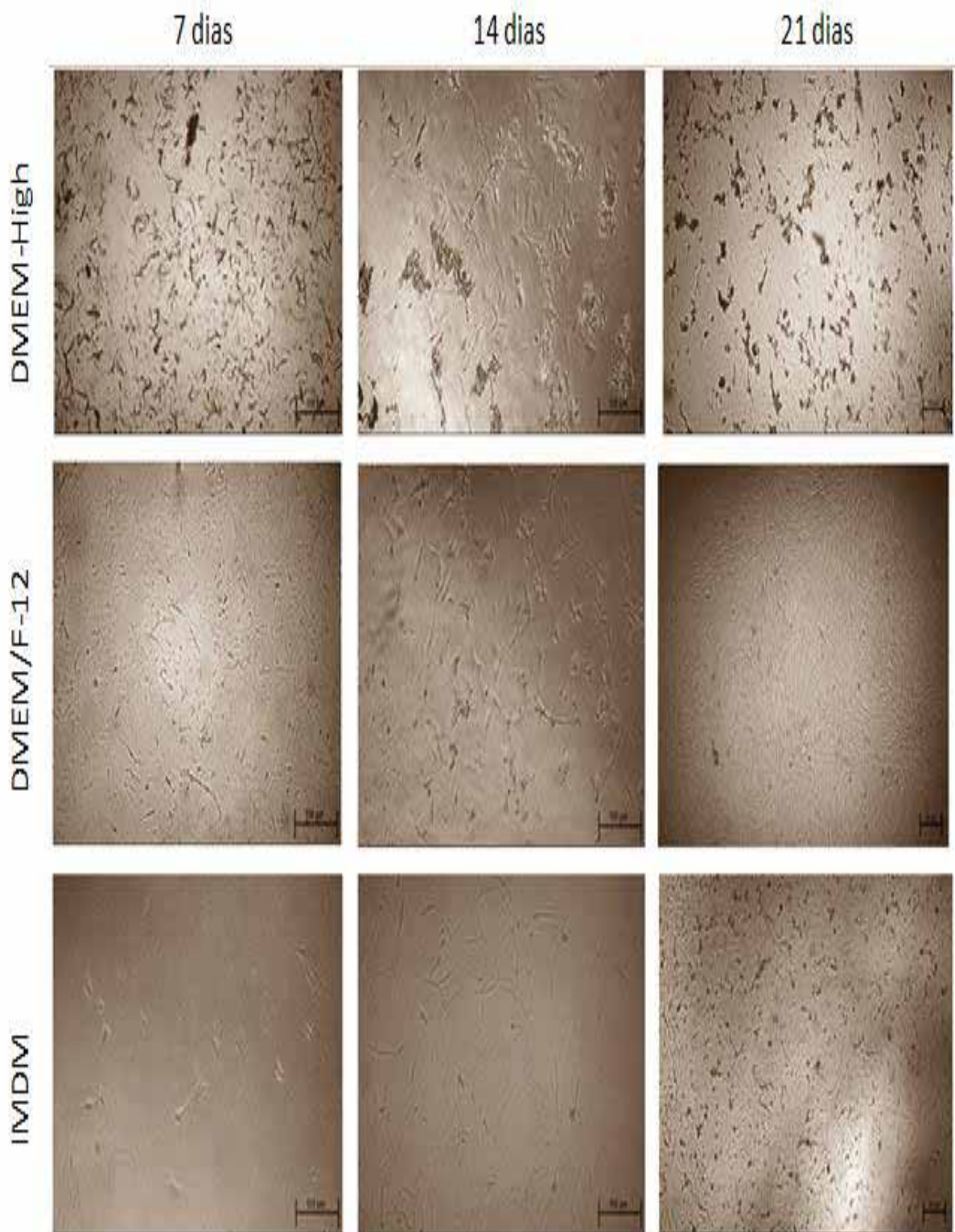
7. Usas, A, Huard, J. Muscle-derived stem cells for tissue engineering and regenerative therapy. *Biomaterials*. 2007; 28(36), 5401-5406.
8. Jackson, WM, Nesti, LJ, Tuan, RS. Potential therapeutic applications of muscle-derived mesenchymal stem and progenitor cells. *Expert opinion on biological therapy*. 2010; 10(4), 505-517.
9. Mannello, F, Tonti, GA. Concise Review: No Breakthroughs for Human Mesenchymal and Embryonic Stem Cell Culture: Conditioned Medium, Feeder Layer, or Feeder-Free; Medium with Fetal Calf Serum, Human Serum, or Enriched Plasma; Serum-Free, Serum Replacement Nonconditioned Medium, or Ad Hoc Formula? All That Glitters Is Not Gold!. *Stem Cells*. 2007; 25(7), 1603-1609.
10. Fernandez, M R, Carvalho, R V, Ogliari, F A, Beira, F A, Etges, A, Bueno, M. Cytotoxicity and genotoxicity of sodium percarbonate: a comparison with bleaching agents commonly used in discoloured pulpless teeth. *International endodontic journal*. 2010; 43(2), 102-108.
11. Isaac, C, Mattos, CND, Rêgo, FMPD, Cardim, LN, Altran, SC, Paggiaro, AO et al. Replacement of fetal calf serum by human serum as supplementation for human fibroblast culture. *Revista Brasileira de Cirurgia Plástica*. 2011; 26(3), 379-384.
12. Lavasani, M, Robinson, AR, Lu, A, Song, M, Feduska, JM, Ahani, B, Huard, J. Muscle-derived stem/progenitor cell dysfunction limits healthspan and lifespan in a murine progeria model. *Nature communications*. 2012; 3, 608.



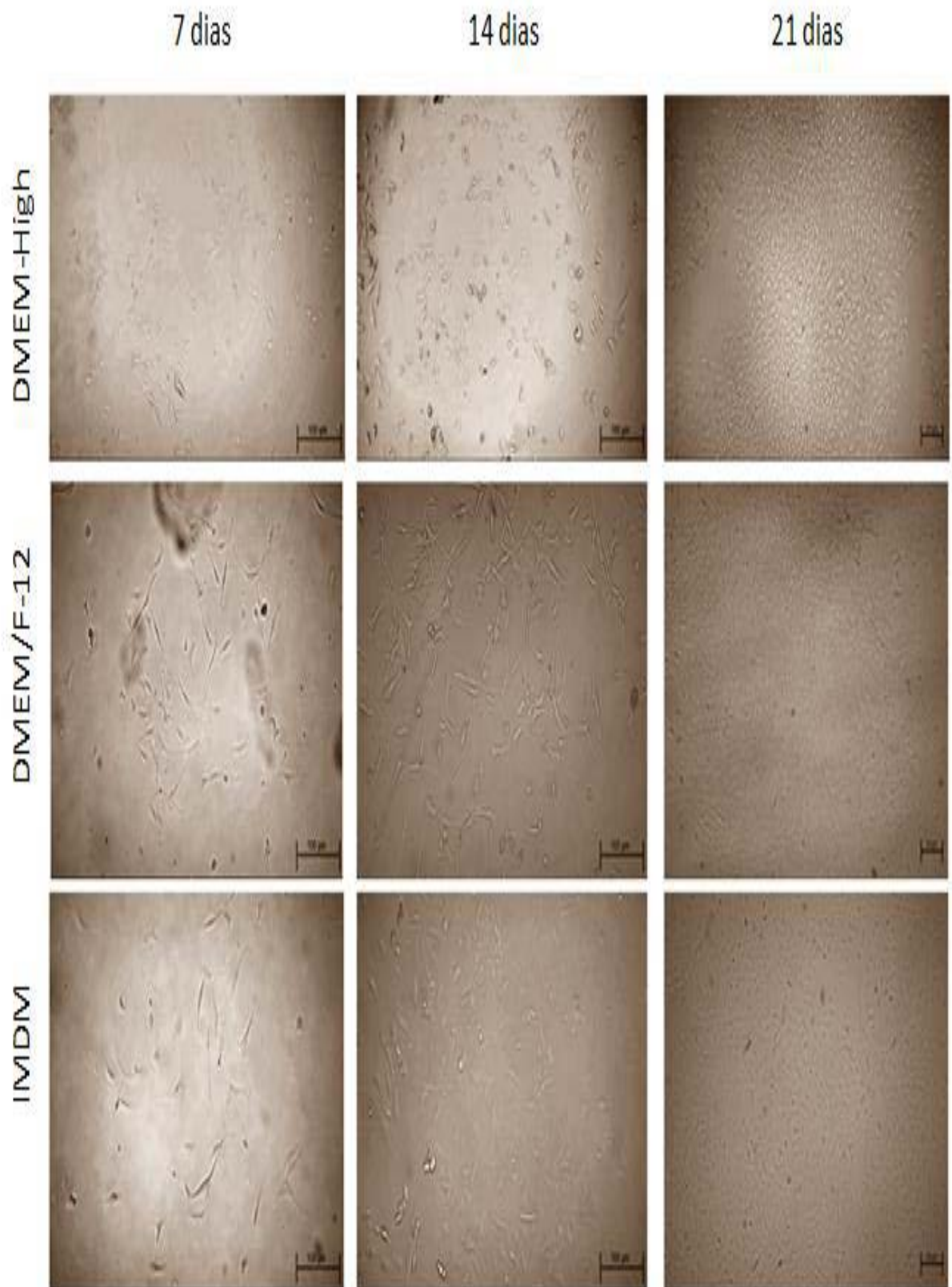
13. Jackson, WM, Nesti, LJ, Tuan, RS. Potential therapeutic applications of muscle-derived mesenchymal stem and progenitor cells. *Expert opinion on biological therapy*. 2010; 10(4), 505-517.
14. Girard, SD, Devéze, A, Nivet, E, Gepner, B, Roman, FS, Féron, F. Isolating nasal olfactory stem cells from rodents or humans. *Journal of visualized experiments: JoVE*. 2011; (54).
15. Pasut, A, Jones, A E, Rudnicki, MA. Isolation and culture of individual myofibers and their satellite cells from adult skeletal muscle. *Journal of visualized experiments: JoVE*. 2013; (73).
16. Guolo, MK. Influência da intensidade e intervalos recuperação em exercícios contra resistidos sobre o desempenho muscular e a produção do lactato salivar. 2013.
17. Powers, SK, Howley, ET, Ikeda, M, Navarro, F, Bacurau, RFP. *Fisiologia do exercício: teoria e aplicação ao condicionamento e ao desempenho*. 2000.
18. Lizier NF, Kerkis A, Gomes CM, Hebling J, Oliveira CF, et al. Scaling-Up of Dental Pulp Stem Cells Isolated from Multiple Niches. *PLoS ONE* 7(6): e39885. doi:10.1371/journal.pone.0039885. 2012.

19. Bianchi, F, Maioli, M, Leonardi, E, Olivi, E, Pasquinelli, G, Valente, S, et al. A new nonenzymatic method and device to obtain a fat tissue derivative highly enriched in pericyte-like elements by mild mechanical forces from human lipoaspirates. *Cell transplantation*. 2013; 22(11), 2063-2077.
  
20. Shah, FS, Wu, X, Dietrich, M, Rood, J, Gimble, JM. A non-enzymatic method for isolating human adipose tissue-derived stromal stem cells. *Cytotherapy*. 2013; 15(8), 979-985.
  
21. Diretoria colegiada BRASIL. Resolução RDC nº 9, 14 de março de 2011. Dispõe sobre o funcionamento dos Centros de Tecnologia Celular para fins de pesquisa clínica e terapia e dá outras providências. D.O.U. - Diário Oficial da União; Poder Executivo, de 16 de março de 2011.

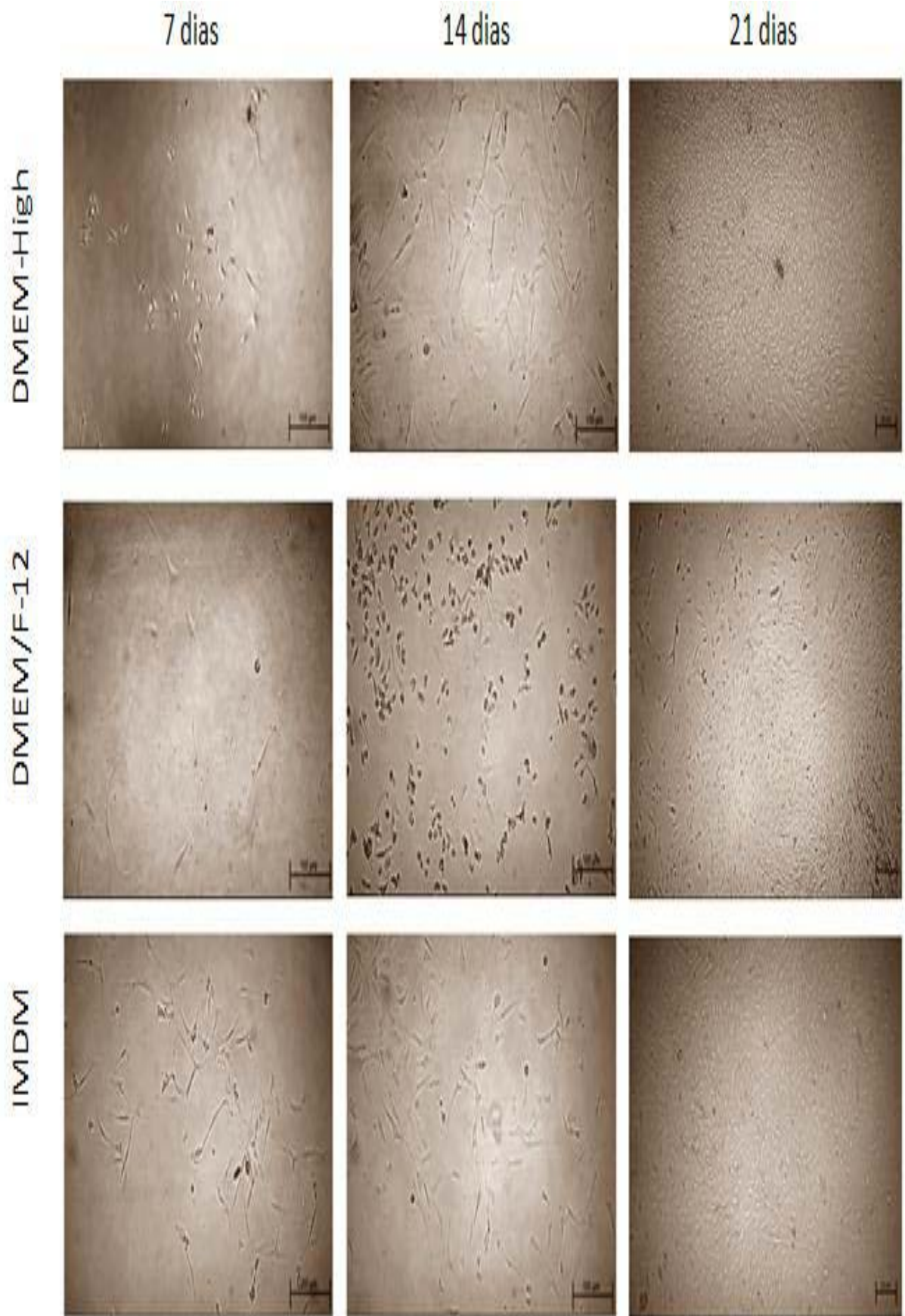
## Anexo 1 - Figuras e Tabela



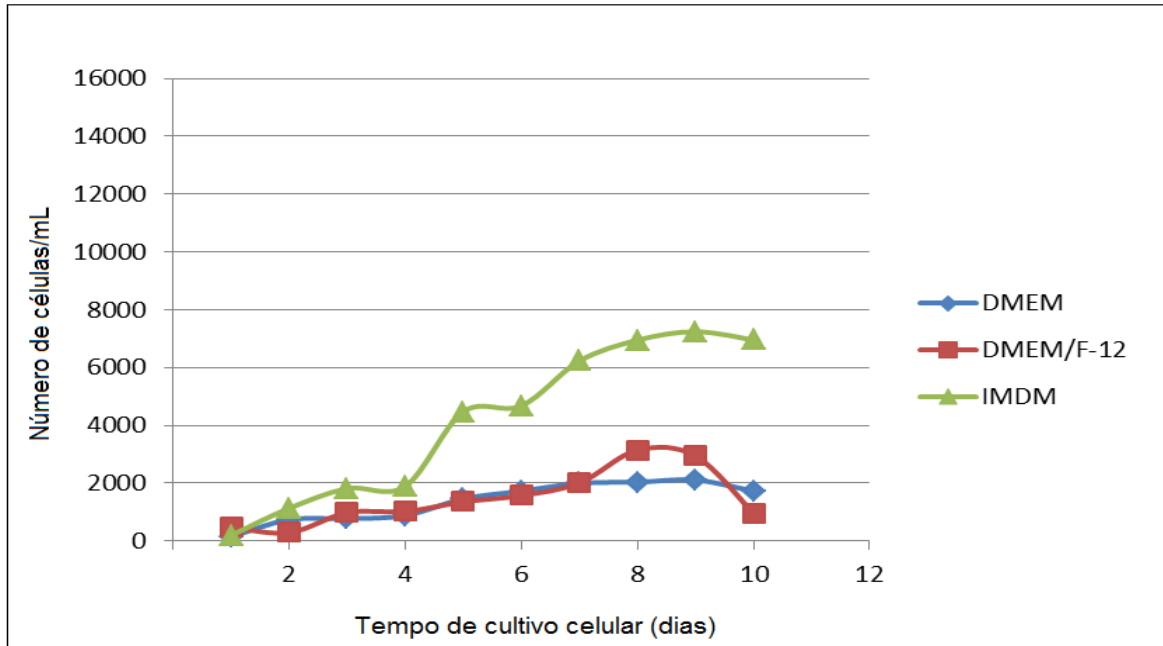
**Figura 1** – Desenvolvimento da cultura primária de células obtidas pelo método de dissociação mecânica (Objetiva de 4x nos dias 7° e 14° e, 10x dia 21°).



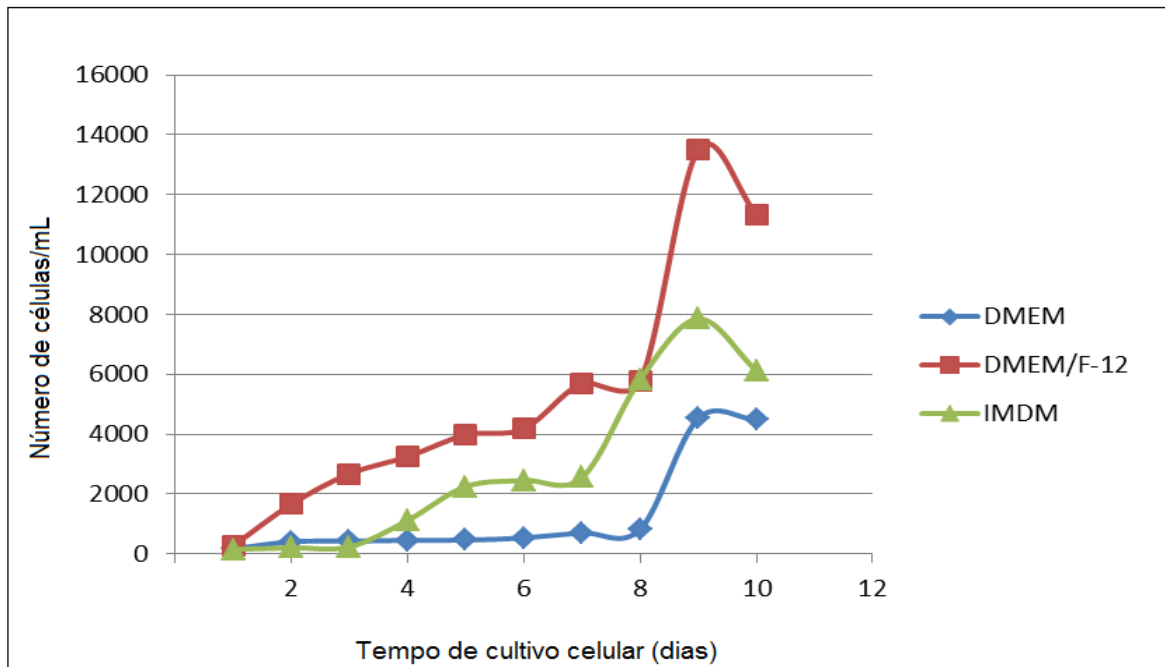
**Figura 2** – Desenvolvimento da cultura primária de células-tronco obtidas pelo método de digestão enzimática (Objetiva de 4x nos dias 7° e 14° e, 10x dia 21°).



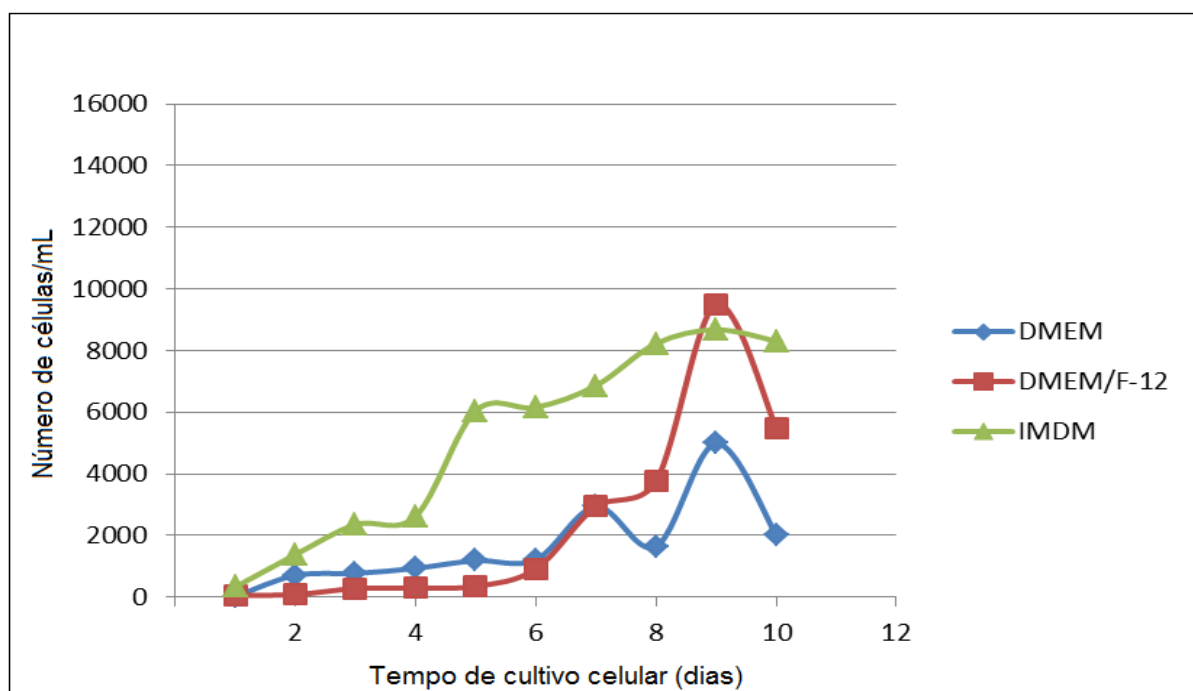
**Figura 3** - Desenvolvimento da cultura primária de células obtidas pelo método de explante (Objetiva de 4x nos dias 7° e 14° e, 10x dia 21°).



**Figura 4** – Curva de crescimento de células-tronco musculares obtidas pela técnica de dissociação mecânica.



**Figura 5** – Curva de crescimento de células-tronco musculares obtidas pela técnica de digestão enzimática



**Figura 6** – Crescimento de células-tronco musculares obtidas pela técnica de explante.

**Tabela 1** – Comparação da proliferação de células-tronco derivadas de tecido muscular obtidas pelos métodos de digestão enzimática (DE), dissociação mecânica (DM) e explante (E), em diferentes meios de cultura.

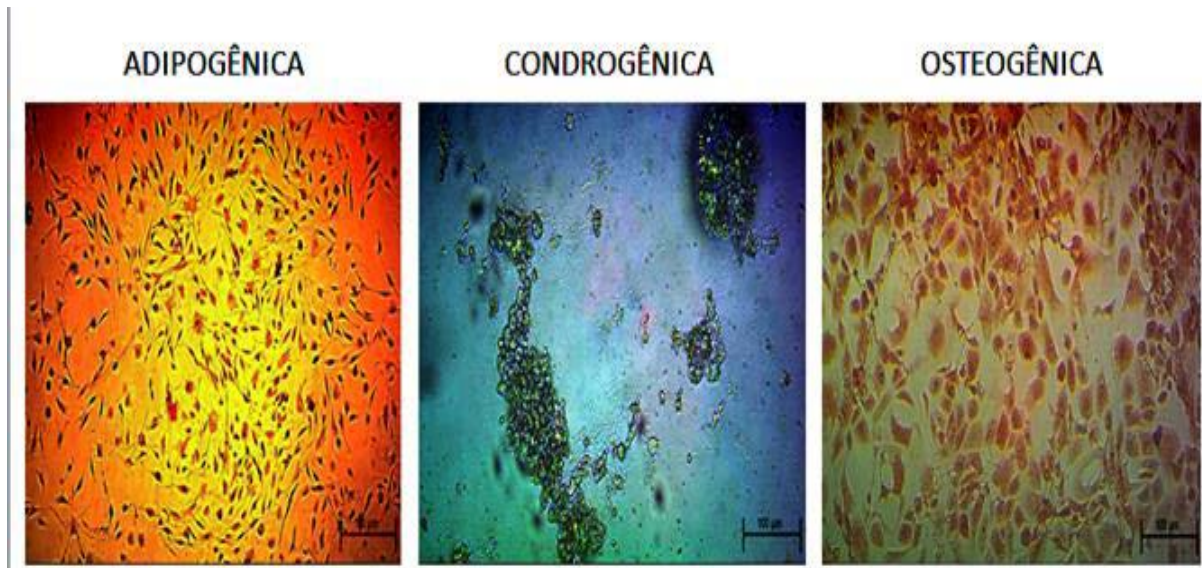
Método	DMEM-High	DMEM/Ham's-F12	IMDM
DE	502,5 ± 292,6 a*	5533,3 ± 4840,7 b	3207 ± 2713 ab
DM	1370,8 ± 901,6 a	1908 ± 1707,6 ab	4150 ± 2640,9 b
E	1634 ± 1431 a	2285,8 ± 3739,9 a	5100,8 ± 3292,0 b

\*Valores seguidos de letras iguais indicam diferenças não significativas ( $p > 0,05\%$ )

DMEM-High - Dulbecco's Modified Eagle Medium High Glucose Modificado;

DMEM/Ham's- F12 - Dulbecco's Modified Eagle Medium High Glucose Modificado- Ham's F-12;

IMDM - Iscove's Modified Dulbecco's Medium



**Figura 7** – Células-tronco mesenquimais derivadas de tecido muscular submetidas à diferenciação adipogênica, condrogênica e osteogênica.



## **Anexo 2 - Normas para Publicação na Revista Brasileira de Ortopedia**

### **Instruções aos Autores**

A Revista Brasileira de Ortopedia (RBO) é o órgão de publicação científica da Sociedade Brasileira de Ortopedia e Traumatologia (SBOT) e se propõe a divulgar artigos que contribuam para o aperfeiçoamento e o desenvolvimento da prática, da pesquisa e do ensino da Ortopedia e de especialidades afins. Publicada bimestralmente nos meses de fevereiro, abril, junho, agosto, outubro e dezembro com absoluta regularidade desde sua primeira edição, em 1965. A revista recebe para publicação artigos para as seguintes seções: Artigos Originais, Artigo de Revisão, Artigo de Atualização, Relatos de casos, Notas Prévias, Notas Técnicas e Cartas ao Editor. Os artigos poderão ser escritos em Português, Espanhol ou Inglês de acordo com os seus países de origem. A revista é destinada a Ortopedistas vinculados à SBOT, profissionais da área da saúde que se dedicam a atividades afins e ortopedistas de outros países. Seu título abreviado é Rev Bras Ortop. e deve ser usado em bibliografias, notas de rodapé e em referências e legendas bibliográficas.

### **Peer-Review**

O peer-review é um dos fatores que sustentam a qualidade de um veículo científico. No caso da RBO, a constituição de um corpo editorial formado, em sua maioria, por professores universitários, permitiu um peer-review criterioso. Depois de recebidos, os artigos são remetidos a um técnico especializado em metodologia de trabalho científico e a três membros do conselho editorial que atuam na mesma área. Esses profissionais avaliam os trabalhos e os devolvem com seus pareceres. A avaliação é feita sob cinco aspectos: Grau de Prioridade para Publicação; Relevância do Trabalho; Qualidade Científica, Apresentação e Recomendação.

Todos os manuscritos, após aprovação pelos Editores, serão avaliados por revisores qualificados, sendo o anonimato garantido em todo o processo de julgamento (blinded peer review, revisão por pares cega). Os artigos que não apresentarem mérito, que contenham erros significativos de metodologia, ou não se enquadrem à política editorial da revista serão rejeitados, não cabendo recurso. Os comentários dos revisores serão devolvidos aos autores para modificações no texto ou justificativa de sua conservação. Somente após aprovação final dos revisores e editores, os manuscritos serão encaminhados para publicação.

### Copyright

Todas as declarações publicadas nos artigos são de inteira responsabilidade dos autores. Entretanto, todo material publicado se torna propriedade da Revista Brasileira de Ortopedia (RBO), que passa a reservar os direitos autorais. Os autores devem encaminhar à RBO por Fax (+55-011-2137-5418) ou correio a declaração de transferência de direitos autorais, assinada por todos os coautores, assim que o manuscrito é submetido.

<b>Tipo de Artigo</b>	<b>Resumo</b>	<b>Número de palavras***</b>	<b>Referências</b>	<b>Figuras</b>	<b>Tabelas</b>
Original	Estruturado máx. 250 palavras	2.500	30	10	6
Revisão	Não estruturado máx. 250 palavras	4.000	60	3	2

Atualização	Não estruturado máx. 250 palavras	4.000	60	3	2
Relato de Caso	Não estruturado máx. 250 palavras	1.000	10	5	0
Nota Técnica	Não estruturado máx. 250 palavras	1.500	8	5	2
Carta ao Editor*	0	500	4	2	0
Editorial**	0	500	0	0	0

\*publicadas ao critério dos Editores com réplica quando pertinente;

\*\*a convite dos Editores;

\*\*\* excluindo resumo, referências, tabelas e figuras.

### **Apresentação e submissão de manuscritos**

A Revista Brasileira de Ortopedia (Rev Bras Ortop. - ISSN 0102-3616) é uma publicação bimestral da Sociedade Brasileira de Ortopedia e Traumatologia, com a finalidade publicar trabalhos originais de todas as especialidades da ortopedia. Os conceitos e declarações contidos nos trabalhos são de total responsabilidade dos autores.

Os artigos publicados na revista seguem os requisitos uniformes propostos pelo Comitê Internacional de Editores de Revistas Médicas, atualizados em outubro de 2004 e disponíveis no endereço eletrônico [www.icmje.org](http://www.icmje.org). Os artigos que envolvam seres humanos ou animais de laboratório devem apresentar claramente a adesão às diretrizes apropriadas e a aprovação de seus protocolos pelos comitês institucionais. O artigo enviado deverá ser submetido, acompanhado de:

### **Author Agreement**

Carta assinada por todos os autores (máximo seis), autorizando sua publicação, declarando que o mesmo é inédito e que não foi, ou está submetido para publicação em outro periódico.

### **Cover Letter**

Carta de apresentação do estudo destinada exclusivamente ao Editor.

### **Manuscript**

Arquivo completo do artigo com referências, preferencialmente com resumo e palavras-chave.

### **Figuras, Tabelas e Gráficos**

Arquivos individuais enviados a parte.

### **Ao Author Agreement devem ser anexados**

Declaração de Conflito de Interesse, quando pertinente, que, segundo Resolução do Conselho Federal de Medicina nº 1595/2000, veda que em artigo científico seja feita

promoção ou propaganda de quaisquer produtos ou equipamentos comerciais.

Certificado de Aprovação do Trabalho pela Comissão de Ética em Pesquisa da Instituição em que o mesmo foi realizado.

Informações sobre eventuais fontes de financiamento da pesquisa.

Declaração de que os investigadores assinam documento de Consentimento Informado, quando o artigo tratar de pesquisa clínica com seres humanos. Toda pesquisa clínica ou experimental em humanos ou animais deve ser executada de acordo com a Declaração de Helsinki da Associação Médica Mundial (J Bone Joint Surg Am.1997;79(7):1089-98).

Os artigos devem ser escritos em português, espanhol ou inglês de acordo com os seus países de origem.

### **Tipo de Artigo**

A Revista Brasileira de Ortopedia recebe para publicação os seguintes tipos de manuscritos: Artigo Original, Atualização, Revisão, Relatos de Caso, Nota Técnica, Resenhas e Resumos, Cartas e Editoriais.

### **Artigo Original**

Descreve pesquisa experimental ou investigação clínica - prospectiva ou retrospectiva, randomizada ou duplo cego. Deve ter: Título em português e inglês, Resumo em português e inglês estruturado em (Objetivo, Métodos, Resultados e Conclusão), Palavras-chave, Introdução, Materiais e Métodos, Resultados, Discussão, Conclusões e Referências.

### **Artigo de Atualização**

Revisões do estado-da-arte sobre determinado tema, escrito por especialista a convite dos Editores. Deve ter Resumo em português e inglês com Palavras-chave, Título e Referências.

### **Relato de Caso**

Deve ser informativo e não deve conter detalhes irrelevantes. Só serão aceitos os relatos de casos clínicos de interesse, quer pela raridade como entidade nosológica, ou ainda pela não usual forma de apresentação. Deve ter Resumo em português e inglês com Palavras-chave, Título e Referências.

### **Artigo de Revisão**

Tem como finalidade examinar a bibliografia publicada sobre determinado assunto fazendo avaliação crítica e sistematizada da literatura sobre certo tema, além de apresentar conclusões importantes baseadas nessa literatura. Somente serão aceitos para publicação quando solicitado pelos Editores. Deve ter Resumo em português e inglês com Palavras-chave, Título e Referências.

### **Nota Técnica**

Destina-se à divulgação de método de diagnóstico ou técnica cirúrgica experimental, novo instrumental cirúrgico, implante ortopédico, etc. Deve ter: Resumo em português e inglês com Título, Palavras-chave, Introdução Explicativa, Descrição do Método, do Material ou da Técnica, Comentários Finais e Referências.

### **Cartas ao Editor**

Têm por objetivo comentar ou discutir trabalhos publicados na revista ou relatar pesquisas

originais em andamento. Serão publicadas a critério dos Editores, com a respectiva réplica quando pertinente.

## **Editorial**

Escritos a convite, apresentando comentários de trabalhos relevantes da própria revista, pesquisas importantes publicadas ou comunicações dos editores de interesse para a especialidade.

## **Preparo dos manuscritos**

A) Folha de Rosto (Title Page):

Título do artigo, em português e inglês, redigido com dez ou doze palavras, sem considerar artigos e preposições. O Título deve ser motivador e deve dar ideia dos objetivos e do conteúdo do trabalho;

Nome completo de cada autor (máximo seis), sem abreviaturas;

Indicação da afiliação institucional de cada autor, separadamente com cidade, estado e país; com indicação numérica e sequencial, utilizando letras minúsculas sobrescritas. Se houver mais de uma afiliação institucional, indicar apenas a mais relevante;

Indicação da Instituição onde o trabalho foi realizado com cidade, estado e país;

Nome, endereço e e-mail do autor correspondente;

Fontes de auxílio à pesquisa (se houver);

Declaração de inexistência de conflitos de interesse.

**Resumo e palavras-chave:** Resumo e Palavras-chave, em português e inglês, com no máximo 250 palavras. Nos artigos originais, o Resumo deverá ser estruturado ressaltando os dados mais significativos do trabalho (Objetivo: informar o porque da pesquisa, ressaltando a sua motivação;

**Métodos:** Descrever sucintamente o material avaliado e o método empregado em sua avaliação; **Resultados:** descrever os achados relevantes com dados estatísticos e com a respectiva significância;

**Conclusões:** Relatar exclusivamente as principais conclusões). Para Relatos de Caso, Revisões ou Atualizações e Nota Prévia, o Resumo dispensa estruturação, mas exige Palavras-chave. Abaixo do resumo, especificar no mínimo três e no máximo dez Palavras-chave que definam o assunto do trabalho. As palavras-chave ou descritores devem ser baseadas no DECS (Descritores em Ciências da Saúde) disponível no endereço eletrônico <http://decs.bvs.br/>; ou MeSH (Medical Subject Headings) em ou MeSH - [www.nlm.nih.gov/mesh/MBrowser.html](http://www.nlm.nih.gov/mesh/MBrowser.html).

## **B) Texto (Manuscript)**

Deverá obedecer rigorosamente a estrutura para cada categoria de manuscrito. Em todas as categorias de manuscrito, a citação dos autores no texto deverá ser numérica e sequencial, utilizando algarismos arábicos entre colchetes. Preferencialmente com Resumo e palavras-chave repetidas.

**Introdução:** Os autores devem justificar o porquê da realização do trabalho, descrevendo a relevância e o interesse do estudo. Poderá utilizar poucas (duas ou três) referências bibliográficas quando julgá-las necessárias para esclarecer a importância do trabalho.

O objetivo do trabalho deve estar explícito ao final da introdução, podendo o autor colocá-lo como título à parte.

**Material:** Trata-se do objeto do estudo e, portanto, deve ser descrito com detalhes; neste item será apontada a origem dos pacientes, sua identificação, sua qualificação, os critérios



de inclusão e exclusão. Enfim, o autor deverá definir, de forma clara, o grupo com o qual estará ou esteve trabalhando.

**Métodos:** O autor descreverá o procedimento que foi aplicado ou analisado no seu material, com detalhes. A descrição deve ser clara e suficiente para que outro pesquisador possa reproduzir ou dar continuidade ao estudo. Descrever a metodologia estatística empregada com detalhes suficientes para permitir que qualquer leitor com razoável conhecimento sobre o tema e o acesso aos dados originais possa verificar os resultados apresentados. Evitar o uso de termos imprecisos tais como: aleatório, normal, significativo, importante, aceitável, sem defini-los. A forma de aferir os resultados será descrevendo os parâmetros da literatura ou parâmetros próprios, ou seja, o que é bom, o que é regular etc., no conceito proposto pelos autores. A utilização da palavra correlação deve ser acompanhada do respectivo coeficiente.

Informação sobre o manejo da dor pós-operatório, tanto em humanos como em animais, deve ser relatada no texto (Resolução nº 196/96, do Ministério da Saúde e Normas Internacionais de Proteção aos Animais)

**Resultados:** Apresentar os resultados em sequência lógica do texto, usando tabelas e ilustrações, se necessário. Não repetir no texto todos os dados constantes das tabelas e ou ilustrações. No texto, enfatizar ou resumir somente os dados importantes

**Discussão:** todos os itens do trabalho (introdução, material, métodos, resultados) devem ser discutidos e comparados com a literatura pertinente.

**Conclusões:** devem ser baseadas nos resultados obtidos.

**Agradecimentos:** podem ser mencionadas colaborações de pessoas, instituições ou

agradecimento por apoio financeiro, auxílios técnicos, que mereçam reconhecimento, mas não justificam a sua inclusão entre os autores.

**Conflitos de interesse:** Devem ser reproduzidos objetivamente quando houver, e quando não houver, apresentar a declaração: "Os autores declaram inexistência de conflito de interesses na realização deste trabalho."

**Referências:** Devem ser atualizadas contendo, preferencialmente, os trabalhos mais relevantes publicados nos últimos cinco anos, sobre o tema. Deve conter apenas trabalhos referidos no texto. Se pertinente, é recomendável incluir trabalhos publicados na RBO. As referências deverão ser numeradas consecutivamente, na ordem em que são citadas no texto e identificadas com algarismos arábicos entre colchetes. A apresentação deverá seguir o formato denominado "Vancouver Style", conforme modelos abaixo. Os títulos dos periódicos deverão ser abreviados de acordo com o estilo apresentado pela National Library of Medicine, disponível em "List of Journal Indexed in Index Medicus" no endereço eletrônico: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=journals> Para todas as referências, citar todos os autores até seis. Quando em número maior, citar os seis primeiros autores seguidos da expressão "et al."

#### **Artigos de Periódicos ou Revistas:**

1) Borges JLP, Milani C, Kuwajima SS, Laredo Filho J. Tratamento da luxação congênita de quadril com suspensório de Pavlik e monitorização ultra-sonográfica. Rev Bras Ortop. 2002;37(1/2):5-12.

2) Bridwell KH, Anderson PA, Boden SD, Vaccaro AR, Wang JC. What's new in spine surgery. J Bone Joint Surg Am. 2005;87(8):1892-901.

Schreurs BW, Zengerink M, Welten ML, van Kampen A, Slooff TJ. Bone impaction grafting

and a cemented cup after acetabular fracture at 3-18 years. Clin Orthop Relat Res. 2005;(437):145-51

**Livros:** Baxter D. The foot and ankle in sport. St Louis: Mosby; 1995.

**Capítulos de Livro:** Johnson KA. Posterior tibial tendon . In: Baxter D. The foot and ankle in sport. St Louis: Mosby; 1995. p. 43-51.

**Dissertações e Teses:** Laredo Filho J. Contribuição ao estudo clínico-estatístico e genealógico-estatístico do pé torto congênito equinovaro [tese]. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina; 1968.

#### **Publicações eletrônicas:**

1) Lino Junior W, Belangero WD. Efeito do Hólmio YAG laser (Ho: YAG) sobre o tendão patelar de ratos após 12 e 24 semanas de seguimento. Acta Ortop Bras [periódico na Internet]. 2005 [citado 2005 Ago 27];13(2):[about 5p.]. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo>

2) Feller J. Anterior cruciate ligament rupture: is osteoarthritis inevitable? Br J Sports Med [serial on the Internet]. 2004 [cited 2005 Ago 27]; 38(4): [about 2 p.]. Available at: <http://bjsm.bmjournals.com/cgi/content/full/38/4/383>

#### **C) Tabelas e Figuras:**

**Tabelas:** As tabelas devem ser numeradas por ordem de aparecimento no texto com números arábicos. Cada tabela deve ter um título e, se necessário, uma legenda explicativa. Os quadros e tabelas deverão ser enviados através de arquivos individuais (preferencialmente em Excel).

**Figuras:** A apresentação desse material pode ser em cores, sendo impresso em preto e branco, com legendas e respectivas numerações. As figuras deverão ser enviadas através de arquivos individuais (300 dpi). Maiores detalhes em: <http://www.elsevier.com/author-schemas/artwork-and-media-instructions>. Enviar cada figura individual para o sistema. A(s) legenda(s) deve(m) ser incorporada(s) no final do texto no manuscrito após a listagem de referências. Não incluir figuras no texto. As figuras incluem todas as ilustrações, tais como fotografias, desenhos, mapas, gráficos, etc. e devem ser numeradas consecutivamente em algarismos arábicos. Fotos em preto e branco serão reproduzidas gratuitamente, mas o editor reserva o direito de estabelecer o limite razoável, quanto ao número delas ou cobrar do autor, a despesa decorrente do excesso. Fotos coloridas serão cobradas do autor. Abreviaturas e Siglas: Devem sempre ser precedidas do nome completo quando citadas pela primeira vez no texto. No rodapé das figuras e tabelas devem sempre ser discriminados o significado das

**Abreviaturas, símbolos, outros sinais e informada fonte:** local onde a pesquisa foi realizada. Se as ilustrações já tiverem sido publicadas, deverão vir acompanhadas de autorização por escrito do autor ou editor, constando a fonte de referência onde foi publicada. A RBO reserva o direito de não aceitar para avaliação os artigos que não preenchem os critérios acima formulados. **Envio dos manuscritos:** As submissões devem ser feitas on-line pelo link <http://ees.elsevier.com/rbo>. É imprescindível o envio por fax ou correio da permissão para reprodução do material e as cartas com a aprovação de um Comitê de Ética da Instituição onde foi realizado o trabalho - quando referente a intervenções (diagnósticas ou terapêuticas) em seres humanos - e o Author Agreement, aquela assinada por todos os autores em que se afirme o ineditismo do trabalho (fax: +55 11 2137-5418).