



FACULDADE DE MEDICINA
UNIVERSIDADE DO PORTO

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA

2009/2010

João Carlos Meirinho Ferreira dos Santos

Células estaminais em Ortopedia – Aplicações clínicas

Abril, 2010

FMUP



FACULDADE DE MEDICINA
UNIVERSIDADE DO PORTO

João Carlos Meirinho Ferreira dos Santos
Células estaminais em Ortopedia – Aplicações clínicas

Mestrado Integrado em Medicina

Área: Ortopedia e Traumatologia

Trabalho efectuado sobre a Orientação de:

Prof. Doutor Manuel Gutierres

Revista: Arquivos de Medicina

Abril, 2010

FMUP

Eu, João Carlos Meirinho Ferreira dos Santos, abaixo assinado, nº mecanográfico 040801146, aluno do 6º ano do Mestrado Integrado em Medicina, na Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, declaro ter actuado com absoluta integridade na elaboração deste projecto de opção.

Neste sentido, confirmo que NÃO incorri em plágio (acto pelo qual um indivíduo, mesmo por omissão, assume a autoria de um determinado trabalho intelectual, ou partes dele). Mais declaro que todas as frases que retirei de trabalhos anteriores pertencentes a outros autores, foram referenciadas, ou redigidas com novas palavras, tendo colocado, neste caso, a citação da fonte bibliográfica.

Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, 20/04/2010

Assinatura: João Carlos Meirinho Ferreira dos Santos

Nome: João Carlos Meirinho Ferreira dos Santos

Endereço electrónico: m04146@med.up.pt

Título da Dissertação/Monografia/Relatório de Estágio:

Células estaminais em Ortopedia – Aplicações Clínicas

Nome completo do Orientador:

Manuel António Pereira Gutierres

Ano de conclusão: 2010

Designação da área do projecto de opção:

Ortopedia e Traumatologia

É autorizada a reprodução integral desta ~~Dissertação/Monografia/Relatório de Estágio~~ (*cortar o que não interessar*) apenas para efeitos de investigação, mediante declaração escrita do interessado, que a tal se compromete.

Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, 20/04/2010

Assinatura: João Carlos Meirinho Ferreira dos Santos

CÉLULAS ESTAMINAIS EM ORTOPEDIA – APLICAÇÕES CLÍNICAS

Ferreira-Santos J*

*Faculdade de Medicina da Universidade do Porto

João Carlos Meirinho Ferreira dos Santos

Rua Júlio Brandão, nº 91

4150-444 Porto

Portugal

+351 917 431 376

m04146@med.up.pt

Agradecimentos

Agradeço ao Professor Doutor Manuel Gutierrez toda a sua dedicação e empenho tanto na revisão crítica como na orientação prestada durante a realização deste trabalho.

Ao Professor Doutor Luís de Almeida agradeço toda a sua atenção e disponibilidade.

Quero também agradecer ao Dr. João Torres o auxílio que me prestou durante as várias fases da elaboração do Projecto de Opção.

Resumo: 228 palavras

Abstract: 183 palavras

Testo principal: 4015 palavras

Resumo

As células estaminais tornaram-se alvo de grande atenção para a terapia regenerativa. Este tipo de células pode ter origem no embrião, no feto, no recém-nascido ou no adulto, existindo diversas fontes para a sua colheita.

No entanto, apesar da terapia regenerativa com células estaminais ser uma grande promessa no tratamento de várias enfermidades, há vários obstáculos que dificultam a sua utilização, quer para fins de investigação, quer para fins de tratamento clínico de doenças.

No âmbito da patologia ortopédica têm sido planeados e realizados diversos estudos e ensaios clínicos com o objectivo de regenerar os diferentes tecidos do aparelho locomotor (osso, cartilagem, discos intervertebrais, tendões, ligamentos e músculo).

O potencial das células estaminais de se diferenciarem para formar osso foi constatado em vários estudos. No entanto, é necessário um micro-ambiente propício, onde devem estar presentes factores de crescimento e outro tipo de proteínas. A pseudartrose e a osteogénese imperfeita são dois modelos de doenças tratadas por Ortopedia onde os resultados dos estudos foram entusiasmantes.

A regeneração de cartilagem articular e de fibrocartilagem, de discos intervertebrais, de tendões e ligamentos tem também demonstrado resultados promissores quando utilizadas células estaminais.

O tratamento da patologia muscular tem sido estudado fora do âmbito do espectro das patologias do foro ortopédico.

A presente revisão tem como objectivo reunir informação de publicações que abordem a temática da utilização clínica de células estaminais em Ortopedia.

Palavras-chave: Células estaminais, Ortopedia, osso, cartilagem

Abstract

Stem cells have become the subject of considerable interest for regenerative therapy. Such cells can originate from the embryo, fetus, newborn or adult, on several locations that provide the source for harvest.

In spite of its promising role in the treatment of several disorders, there are some limitations to the use of these cells in scientific research and clinical therapy.

In the context of orthopedic pathology, many studies and clinical trials have been conducted in order to regenerate the different tissues of the locomotor system (bone, cartilage, intervertebral disc, tendons, ligaments and muscles).

The potential of stem cells to differentiate into bone was found in several studies when a microenvironment with growth factors and other proteins was present. Pseudarthrosis and osteogenesis imperfecta are the two types of orthopedic disorders with promising results when stem cells are used as well as the regeneration of articular cartilage, fibrocartilage, intervertebral discs, tendons and ligaments.

The treatment of muscle disorders has been studied outside the spectrum of orthopedic pathologies.

This bibliographic review aims to gather information from publications concerning the clinical use of stem cells in Orthopedics.

Keywords: Stem cells, Orthopedics, Bone, Cartilage

Índice

	Página
- Lista de figuras	5
- Abreviaturas	6
- Introdução	7
- Métodos	8
- Tipos de células estaminais	9
- Fontes de células estaminais	9
- Obstáculos à utilização	10
- A utilização em Ortopedia	11
- Obtenção e identificação	11
- Células estaminais e osso	13
- Células estaminais e cartilagem	16
- Células estaminais e disco intervertebral	18
- Células estaminais, tendão e ligamento	19
- Células estaminais e músculo	20
- Perspectivas futuras	20
- Conclusão	22
- Referências	23
- Figuras	32

Lista de Figuras

	Página
Figura 1 – Fontes de células estaminais	32

Abreviaturas

EGFR – Receptor do factor de crescimento epidérmico

BMP – Proteína morfogenética óssea

IGF – Factor de crescimento semelhante à insulina

TAC – Tomografia axial computadorizada.

Introdução

Os novos avanços na terapia regenerativa incidem na utilização de células estaminais.

Células estaminais são células pluripotentes ou multipotentes com capacidade de se dividirem inúmeras vezes e, quando sob determinadas condições do ambiente em que se encontram, têm a capacidade de se diferenciar nos diversos tipos que constituem o organismo. Após este processo apresentam características morfológicas e funcionais do tipo celular em que se diferenciaram (1, 2).

A utilização de células estaminais em Ortopedia tem ganhado uma importância crescente nos últimos anos de forma a promover a sua diferenciação para formar osso, cartilagem, discos intervertebrais, tendões, ligamentos e músculo.

O objectivo desta revisão é reunir informação de publicações onde foram utilizadas células estaminais na aplicação clínica em Ortopedia.

Métodos

Foi usada a Pubmed (www.pubmed.com) para pesquisar publicações sobre a utilização de células estaminais em Ortopedia e suas aplicações clínicas. Para tal, utilizou-se as palavras-chave (MeSH terms): Stem Cells, Orthopedics, Bone, Cartilage, Tendons, Ligaments e Muscles.

Limitou-se a pesquisa a artigos escritos em inglês, português e espanhol.

Por fim, elaborou-se esta revisão com base em 83 publicações.

Tipos de células estaminais

As células estaminais podem ser pluripotentes ou multipotentes. As primeiras são as de origem embrionária, visto que são as únicas que se podem diferenciar em diversos tipos de tecidos (3). São definidas como embrionárias devido à sua origem na massa celular interna do blastocisto (4). Quanto às células multipotentes, são células indiferenciadas encontradas num tecido maduro e têm um espectro de diferenciação mais limitado (geralmente restrito ao tecido onde residem) (3). Sob determinadas condições estas podem-se diferenciar em múltiplas linhagens celulares (5).

Actualmente existem duas linhas principais de células estaminais do adulto com potencial uso clínico, as hematopoiéticas e as mesenquimatosas. As de origem hematopoiética são já utilizadas no tratamento da leucemia, talassemia e mieloma múltiplo. As células estaminais de origem mesenquimatosa são encontradas depois do nascimento no estroma da medula óssea, compreendendo uma população que inclui células reticulares, células adiposas, células osteogénicas, células musculares lisas, células endoteliais e macrófagos (6). A pele, o tecido adiposo e o periósseo são também uma fonte de células estaminais mesenquimatosas. Estas têm capacidade de se diferenciarem em cartilagem, osso, músculo tendão e ligamento (7).

As células estaminais do recém-nascido são colhidas a partir do sangue do cordão umbilical. As suas características são idênticas às do adulto, com a excepção da origem e da sua maior concentração no sangue do cordão umbilical. Deve referir-se que a sua utilização em Ortopedia está numa fase muito inicial. A maioria dos estudos actuais centra-se na aplicação de células estaminais do adulto (8).

Fontes de células estaminais

As células estaminais humanas podem ter origem no embrião, no feto, no recém-nascido ou no adulto (figura 1).

As primeiras podem ser obtidas a partir do blastocisto entre o quinto e o sétimo dia (células estaminais embrionárias) e a partir da crista gonádica às seis semanas de gestação (células germinativas embrionárias).

Relativamente às de origem fetal, são encontradas nos tecidos do feto.

A fonte das células estaminais do recém-nascido é o sangue do cordão umbilical.

No adulto existem fontes germinativas e somáticas. As espermatogónias e as oogónias representam a fonte de células estaminais com origem germinativa. As de origem somática podem ser obtidas a partir diversos tecidos, tal como a medula óssea e sangue periférico (células estaminais hematopoiéticas), estroma da medula óssea (células estaminais mesenquimatosas), fígado, pâncreas, intestino, epiderme (pêlos e pele), olho e neurónios (3).

Obstáculos à utilização

A utilização de células estaminais encontra-se muitas vezes confrontada com obstáculos de natureza ética ou até mesmo legislativa. Além disso, deve ter-se em conta as limitações do conhecimento nesta área e os problemas que podem surgir com uma incorrecta utilização destas células.

A obtenção de células estaminais embrionárias significa obrigatoriamente a destruição de um embrião, especificamente um blastocisto. Muitas culturas/religiões atribuem ao embrião humano, desde o momento da fecundação, o estatuto de ser humano, tornando a sua destruição um acto eticamente inaceitável.

Além das questões éticas envolvidas, existem também questões de ordem política e legislativa que variam consoante os países. Desta forma, as células estaminais embrionárias são um tema de grande polémica em todo mundo. No entanto, muitos países permitem a sua utilização quando estas são derivadas de embriões excedentários obtidos na fertilização *in vitro* (9).

Um outro obstáculo também associado à utilização de células estaminais de origem embrionária é a sua predisposição, após aplicação, para originar teratomas (10) (tumores mistos com elementos originados a partir das três camadas de células germinativas: endoderme, mesoderme e ectoderme).

A utilização em Ortopedia

Actualmente as células estaminais com mais interesse no tratamento clínico de patologias do foro ortopédico e traumatológico são as de origem mesenquimatosa. Estas são caracterizadas pela presença de determinados marcadores na superfície celular e pela sua capacidade de se diferenciarem em osso, cartilagem, músculo e gordura (7).

As células estaminais mesenquimatosas com origem na medula óssea são caracterizadas por uma variedade de marcadores de superfície. Estas células são negativas para CD34, CD45, CD14, CD11b, CD19, CD79 α e HLA-DR. No entanto mostraram-se positivas para Stro-1, CD73, CD90, CD10, CD13, CD105 (SH2), CD166, CD63, CD29, CD49e, CD49d, CD44, CD98, CD59, CD51, CD107b, CD107a, CD91, CD99, CD71, CD47 e CD108. A fibronectina, o colagénio tipo IV, o receptor do factor de crescimento epidérmico (EGFR) e moléculas da família das integrinas, tais como a integrina α -11, a integrina α -2, a integrina α -6, a integrina α -V, a integrina α -3 e a integrina β -5 também estão presentes (11, 12).

Obtenção e identificação

As células estaminais podem ser colhidas de várias formas: punção da crista ilíaca (forma mais comum), colheita de sangue periférico, extracção de tecido adiposo ou muscular, entre outros métodos. As de origem muscular estão a receber maior atenção como fonte de células osteogénicas (13).

Depois da colheita faz-se uma centrifugação para concentrar as células estaminais que existem na medula óssea na proporção de 1 por 50000 células nucleadas (14), aumentando

deste modo a sua eficácia. Tem sido realizada investigação com o intuito de obter métodos mais eficientes de aquisição de um concentrado celular enriquecido em células estaminais mesenquimatosas. Uma técnica com sucesso consiste no isolamento de células que expressam moléculas na sua superfície, através da utilização de anticorpos monoclonais e tecnologias de triagem celular. Deste modo é possível isolar uma população homogénea de células osteoprogenitoras na medula óssea. Long (15, 16, 17) identificou, na medula óssea humana, células com potencial osteogénico através da triagem de proteínas relacionadas com o osso, tal como a osteocalcina e a fosfatase alcalina óssea. Quando positivas para a osteocalcina demonstraram capacidade de diferenciação em osteoblastos se cultivadas com TGF- β . Evidências adicionais sobre este facto foram demonstradas por Falla e seus colaboradores (18).

Simmons e Torok-Storb (19) foram os primeiros investigadores a utilizarem o anticorpo monoclonal Stro-1. Este último identifica um epítoto desconhecido expresso na superfície das células estaminais mesenquimatosas e células da linhagem eritroblastóide. O anticorpo Stro-1 é capaz de identificar células com potencial osteogénico através da presença de 3 marcadores independentes de osteoblastos diferenciados: expressão de fosfatase alcalina, 1,25-diidroxitamina D (indução dependente da osteocalcina osso-específica) e produção de matriz mineralizada (hidroxiapatite) (20).

Recentemente foi identificado um novo anticorpo monoclonal, o Stro-3 (21). Ele é expresso numa grande proporção de células do estroma da medula óssea humana, as quais detêm grande capacidade proliferativa e de diferenciação em diversas linhagens celulares. Além disso, determinou-se que o Stro-3 se dirige à fosfatase alcalina de tecido não especificado, uma glicoproteína de superfície geralmente associada a células da linhagem osteoblástica. Além de expressa nos osteoblastos, a fosfatase alcalina de tecido não especificado pode representar um marcador de células imaturas da medula óssea *in vivo*.

Estudos mais recentes reconheceram um novo marcador, CD146, que caracteriza uma população de células estaminais com capacidade osteoprogenitora localizada no interior da medula óssea humana (22, 23).

Células estaminais e osso

As grandes perdas ósseas decorrentes de episódios traumatológicos e algumas patologias ortopédicas requerem a utilização de enxertos ósseos ou materiais substitutos que permitam a regeneração do osso.

Para a formação de tecido ósseo é necessária a existência de osteogénese, osteoindução, osteocondução e estimulação mecânica (24).

A osteogénese é a capacidade da célula produzir osso.

A osteoindução consiste na capacidade dos factores de crescimento promoverem a estimulação e a diferenciação fenotípica de células em osteoblastos. Nos últimos anos, o isolamento de factores tal como TGF- β 3, seus análogos e a proteína morfogenética óssea (BMPs), possibilitou a sua utilização clínica. Foram realizados estudos que demonstraram o potencial da BMP-2, BMP-3 e BMP-4 no processo de consolidação de fracturas ou correcção de defeitos ósseos segmentares e na fixação de próteses (25, 26). As BMPs regulam a quimiotaxia, a mitose e a diferenciação, sendo fundamentais na iniciação da reparação da fractura (27). Para a obtenção de sucesso terapêutico é necessária uma dose de BMPs com um limiar mínimo de concentração durante um sustentado período de tempo, o que levou à aplicação da terapia genética de forma a ultrapassar este obstáculo (28). As células estaminais derivadas do músculo demonstraram sucesso pela sua capacidade de produzir níveis suficientes de proteínas osteoindutoras, tal como BMP-2, após a transdução com um vector viral. A injeção sistémica do factor de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-1) permite a repopulação da medula óssea por células estaminais mesenquimatosas, que ao localizarem-se no local de fractura, aceleram a consolidação do osso (29).

A osteocondução é a capacidade de uma estrutura suportar as células, fazendo-as aderir, crescer e atravessar todo o material. O sucesso da utilização de materiais osteocondutores foi descrito por Myoui (30), tendo sido realizados estudos, posteriormente, de forma a otimizar o seu comportamento biológico (31).

A estimulação mecânica foi relatada como um componente fundamental na proliferação e diferenciação de células ósseas e na formação de uma estrutura óssea mineralizada (32).

Diversos estudos realizados no âmbito da capacidade osteogénica das células estaminais revelaram que estas células no rato, no cão, no coelho e nos humanos têm a capacidade de formar osso quando implantadas ectopicamente com uma hidroxiapatite ou outro material osteocondutor (33, 34, 35).

Tratamento da pseudartrose: Esta situação ocorre quando não há consolidação (regra geral de 4 a 6 meses), e consoante o local de fractura a sua incidência varia de 5% a 20% (36, 37, 38). O diagnóstico é feito com base nos sintomas clínicos e no exame físico (dor, mobilidade no local de fractura) com evidência radiográfica de falha de consolidação. A terapêutica deste tipo de complicação de fracturas baseada na utilização de células estaminais é encarada pelos especialistas com grande entusiasmo, levando à crescente realização de novos trabalhos em modelos animais (39, 40, 41, 42, 43). Num destes estudos realizou-se uma aplicação clínica de uma cultura de células osteogénicas, em conjunto com um *scaffold* de hidroxiapatite para tratar quatro pacientes com defeitos segmentares diafisários que variavam de 3 a 26,3cm³ na tíbia, úmero e em duas fracturas cubitais (44, 45). Células mesenquimatosas autólogas derivadas da medula óssea foram cultivadas *in vitro* e depositadas num *scaffold* cerâmico 100% composto por hidroxiapatite macroporosa. Os implantes com células estaminais mesenquimatosas e as fracturas foram estabilizadas com um fixador externo. Verificou-se uma progressiva integração dos implantes no osso circundante com formação óssea no interior dos poros biocerâmicos e crescimento vascular. Na radiografia e na tomografia axial computadorizada (TAC) constatou-se que a formação óssea foi muito mais proeminente na face externa e no canal interno dos implantes. Este

facto deve-se à maior densidade e/ou viabilidade das células na superfície da biocerâmica. Todos os pacientes recuperaram a função do membro tratado. Com o decorrer do tempo, ocorreram fissuras indicadoras de desintegração da biocerâmica ao passo que a formação óssea progredia e os implantes eram completamente integrados no osso circundante. No seguimento realizado 6-7 anos após a cirurgia verificou-se boa integração dos implantes.

Hernigou e seus colaboradores (46) realizaram um trabalho notável onde demonstraram que a injeção percutânea de células extraídas da medula óssea é um método eficaz e seguro para tratar uma pseudartrose da diáfise da tíbia. Porém, o sucesso desta técnica parece depender da concentração de células estaminais na injeção.

Osteogénese imperfeita: Esta patologia representa um grupo de perturbações do tecido conjuntivo caracterizadas por fragilidade óssea e outras evidências de defeitos na sua função (47). O defeito genético da osteogénese imperfeita resulta na produção anormal de colagénio tipo I pelos ostoblastos, levando a: osteopenia, múltiplas fracturas, deformações ósseas severas e baixa estatura. Existe grande heterogeneidade clínica nesta patologia, que pode ser ou morte no período perinatal, ou baixa estatura marcada com deformidades ósseas severas, ou uma vida normal. Esta última forma de apresentação poderá variar de apenas alguma fragilidade do osso e ligeira diminuição da massa óssea a uma apresentação que pode mascarar a doença de modo que não é detectada clinicamente (47). Uma vez que o defeito genético não pode ser corrigido, as opções terapêuticas incluem uma vertente farmacológica (administração de bifosfonatos para aumentar a massa óssea) e uma vertente cirúrgica.

A utilização de células estaminais mesenquimatosas poderia, em princípio, atenuar ou até mesmo anular o defeito genético do osso, da cartilagem, do músculo e dos outros tecidos conjuntivos (48, 49). Um ensaio realizado em que se transplantaram células estaminais mesenquimatosas de um rato saudável (geneticamente não-manipulado) para um outro transgénico com um fenótipo de patologia óssea semelhante à osteogénese imperfeita, permitiu constatar que estas células servem de fonte de renovação celular

contínua em diversos tecidos não-hematopoiéticos (50). Outro estudo (51) avaliou o transplante intra-uterino de células adultas da medula óssea para um modelo geneticamente manipulado de osteogénese imperfeita do tipo dominante. A medula óssea de dadores adultos reforçada com proteína verde fluorescente de rato transgénico, aplicada em tecidos hematopoiéticos e não-hematopoiéticos, diferenciou-se em osso cortical e trabecular, sintetizou mais de 20% de colagénio tipo 1 no osso receptor e eliminou o risco de morte perinatal do rato com osteogénese imperfeita do tipo dominante.

Horwitz e seus colaboradores (52) verificaram formação de osso trabecular após três meses da data do transplante alogénico de células estaminais em três crianças com osteogénese imperfeita. Todos os pacientes apresentaram um aumento de 21 para 29 gramas na massa mineral óssea total, sendo este superior às 4 gramas esperadas para crianças com incrementos similares de peso. Estes resultados foram associados aos aumentos na velocidade de crescimento e à reduzida ocorrência de fracturas. Além disso, este estudo demonstrou que as células estaminais mesenquimatosas da medula óssea transplantada podem migrar para o osso em crianças com esta patologia e diferenciarem-se em osteoblastos, os quais optimizam a estrutura e a função óssea. Os investigadores concluíram que o transplante alogénico de medula óssea é um método eficaz no tratamento da osteogénese imperfeita. Porém, algumas lacunas foram assinaladas no estudo, nomeadamente o curto período de seguimento da amostra (apenas 6 meses) e a carência de uma comparação com casos de controlo.

Células estaminais e cartilagem

A cartilagem articular é uma estrutura vulnerável com pouca capacidade regenerativa e sujeita a lesões de vária ordem, as quais podem levar a inflamações crónicas das articulações (53). Diversas técnicas têm sido desenvolvidas para tratamento de lesões cartilagueas, nomeadamente a técnica de microfractura, furagem e *shaving*. No entanto, a fribrocartilagem resultante não possui as propriedades mecânicas da cartilagem articular

original (53). A utilização dessas técnicas forneceu bons resultados a curto-médio prazo para o tratamento da osteocondrite dissecante ou osteocondrite traumática (54, 55). Mais recentemente as tentativas de regenerar a cartilagem articular levaram a implantação autóloga de condrócitos. Estes podem ser transplantados para corrigir defeitos da cartilagem articular, conferindo uma taxa de cura maior quando comparados com os controlos (56). Para além dos condrócitos (57), também as células estaminais envolvidas ou não por periósseo (58, 59), os precursores dos condrócitos ou qualquer combinação destes podem ser utilizados (60).

Hui *et al* (61) procuraram apurar a eficácia do transplante de enxerto de periósseo, enxerto osteocondral autólogo, condrócitos autólogos e células estaminais mesenquimatosas no tratamento de lesões da cartilagem em animais. A avaliação histológica e mecânica após 36 semanas demonstrou que os condrócitos de cultura e as células estaminais mesenquimatosas têm resultados idênticos no tratamento de defeitos cartilagíneos na osteocondrite dissecante avançada. O enxerto osteocondral autólogo revelou-se uma má opção a longo prazo, tal como o enxerto de periósseo (61).

Wakitani (62) utilizou células estaminais mesenquimatosas provenientes da medula óssea e do periósseo dispersas num gel de colagénio tipo I para regenerar a espessura total de uma lesão de cartilagem. Duas semanas após a transplantação das células, estas tinham-se diferenciado uniformemente em condrócitos no local da lesão. As células estaminais mesenquimatosas tanto com origem na medula óssea como no periósseo demonstraram resultados idênticos na regeneração da cartilagem.

No que diz respeito à osteoartrose, o tratamento com células estaminais mesenquimatosas revelaram-se promissoras no atraso do seu desenvolvimento. Neste projecto de investigação (63) concluiu-se que, para tratamento de lesões articulares, o depósito local deste tipo celular estimula a regeneração de cartilagem meniscal e atrasa a progressiva destruição articular observada na osteoartrose. Estas células são, portanto, uma promessa no tratamento desta patologia.

O terço interno do menisco é uma estrutura avascular, tornando por isto difícil a sua regeneração. A sua composição é a base de fibrocartilagem. A menistectomia como opção terapêutica para as lesões desta estrutura evidenciou grande probabilidade de, posteriormente, desenvolver osteoartrose (64, 65). Um estudo, tendo o porco como modelo experimental, foi planejado para avaliar a capacidade de regeneração do menisco utilizando células estaminais derivadas da medula óssea (66). Os resultados foram promissores para o futuro aproveitamento do potencial destas células para regenerar a fibrocartilagem do terço interno avascular do menisco.

Células estaminais e disco intervertebral

Os discos intervertebrais possuem três tecidos histológica, química e fisiologicamente diferentes: núcleo pulposo, anel fibroso e cartilagem.

Estudos histológicos prévios mostraram que a degeneração dos discos intervertebrais era devida à perda de células no núcleo pulposo (67, 68). Estas células sintetizam uma matriz de proteoglicanos que, juntamente com a água, permitem a manutenção da integridade do disco intervertebral. Uma diminuição da função e do número das células do núcleo pulposo resulta numa desorientação da estrutura lamelar na parte interna do anel fibroso (67).

A capacidade regenerativa das células do núcleo pulposo e do anel fibroso é muito fraca. Recentemente reconheceu-se a capacidade das células estaminais mesenquimatosas se diferenciarem em células semelhantes às do núcleo pulposo capazes de produzirem uma matriz extracelular rica em proteoglicanos, quando submetidas a condições propícias (69, 70).

Crevensten e seus colaboradores (71) realizaram um estudo em ratos que confirmou a capacidade regenerativa do disco intervertebral com a aplicação de células estaminais mesenquimatosas e demonstrou a viabilidade da proliferação no seu interior.

Células estaminais, tendão e ligamento

As lesões tendinosas e ligamentares resultam numa cicatrização com formação de um tecido de qualidade inferior em termos de resistência à tracção. Autoenxertos, aloenxertos e biomateriais reabsorvíveis foram utilizados no tratamento de lesões destas estruturas (72, 73, 74, 75). Os obstáculos à aplicação de enxertos biológicos prendem-se com a morbidade que envolve o dador, a escassez e a rejeição do enxerto.

As células estaminais mesenquimatosas são alvo de diversos estudos levados a cabo para tratar lesões tendinosas e ligamentares. Young (76) demonstrou que, quando células estaminais mesenquimatosas são utilizadas para tratar uma lesão no tendão de Aquiles do coelho com uma dimensão inferior a 1cm, as fibras de colagénio apresentam-se com um padrão de alinhamento melhorado relativamente aos controlos e uma área, transversal, maior de cicatrização. Num outro trabalho (77), as células estaminais mesenquimatosas foram aplicadas juntamente com depósitos de colagénio numa lesão provocada no tendão rotuliano de animais. Os resultados foram comparados com os controlos numa lesão idêntica contralateral. A cicatrização obtida pela aplicação destas células mais o colagénio demonstraram tensões máximas às 12 e 26 semanas significativamente superiores aos controlos. No entanto, concentrações maiores de células estaminais mesenquimatosas não demonstraram melhorias histológicas e biomecânicas (77). Ouyand e seus colaboradores (78) observaram que a utilização de ácido poliglicólico como *scaffold* juntamente com células estaminais mesenquimatosas para tratar lesões do tendão de Aquiles de coelhos é um método com potencial para regenerar tais lesões e para recuperar a estrutura e função.

Relativamente às plastias do ligamento cruzado anterior, um estudo (79) concluiu que a utilização de células estaminais mesenquimatosas na junção do enxerto de tendão com o osso resultava na formação de uma fibrocartilagem mais semelhante à original. O tratamento da lesão no cruzado anterior obteve resultados mais favoráveis do que os controlos em termos biomecânicos nas primeiras oito semanas após a reconstrução (79).

Células estaminais e músculo

Com a pesquisa realizada no âmbito desta revisão bibliográfica, foram encontrados diversas publicações sobre a aplicação de células estaminais para tratar patologias musculares. No entanto, todos eles se referiam ao tratamento de distrofias musculares, estando este tipo de doenças afastadas do espectro de patologias do foro ortopédico.

Perspectivas futuras

Terapia genética e células estaminais: a combinação destes dois métodos possibilitaria a modificação molecular das células estaminais, transitória ou permanentemente. As patologias ortopédicas poderiam ser tratadas pela substituição de células osteogénicas patológicas ou mutadas, por células modificadas geneticamente com potencial terapêutico específico. A terapia genética pode ser realizada de duas formas: transferência *ex vivo* de genes para uma célula ou tecido em cultura ou transferência *in vivo*, onde o gene é transferido directamente para o doente. Um exemplo de transferência *in vivo* de genes consiste na implantação de um vector do adenovírus com o factor de crescimento BMP-2, o qual demonstra a capacidade de induzir a cura de defeitos ósseos do fémur de ratos (80). No entanto, a transferência *in vivo* de vectores virais induz uma resposta imune, a qual limita a duração e a eficácia do tratamento (81). Uma possível alternativa será a modificação genética de células estaminais mesenquimatosas autólogas *ex vivo* e o fornecimento do gene ou das proteínas necessárias aos locais afectados. Alguns estudos pré-clínicos foram realizados e demonstraram que a terapia genética pode induzir a formação óssea *in vivo* (81). As células estaminais modificadas geneticamente possibilitariam, por um lado, a implantação de um menor número de células no local da lesão e, por outro, eliminar a necessidade de cultura *in vitro* para promover a multiplicação celular. Porém, a utilização clínica desta nova técnica terapêutica necessita de mais trabalhos de investigação.

Indução de células estaminais pluripotentes: esta técnica representa possivelmente o futuro da terapia com células estaminais uma vez que estas revelariam capacidades

genéticas e funcionais semelhantes a células estaminais embrionárias humanas, mas sem as implicações éticas e sem as questões imunológicas que as envolvem. Estas células são criadas a partir de células somáticas, ou com a introdução de 4 genes ou com a combinação de 2 genes e a indução química dos outros, ultrapassando assim a necessidade de destruição de embriões humanos. A expressão ectópica de marcadores de pluripotência celular nos fibroblastos, tal como Oct4, Sox2, c-myc e Klf4 é suficiente para considerar que as células estaminais pluripotentes induzidas possuem características morfológicas, de expressão genética e com capacidade para formar teratomas em ratos imunodeficientes, tal como as células estaminais embrionárias (82, 83). A grande maioria das tentativas para formar células estaminais pluripotentes envolve a integração de genes nos vectores virais, os quais podem possibilitar o aparecimento de mutações e limitar a utilidade destas células na aplicação clínica.

Conclusão

As células estaminais com origem mesenquimatosa revelaram-se uma grande promessa no tratamento de várias doenças dos diversos tipos de tecidos que constituem o aparelho locomotor (osso, cartilagem, discos intervertebrais, tendões, ligamentos e músculos). Todavia a sua utilização na prática clínica ainda é muito escassa e de certa forma muito pouco reconhecida como método terapêutico por parte dos especialistas. Apesar disto, os diversos estudos já realizados no âmbito da terapia regenerativa demonstraram que as células estaminais mesenquimatosas são uma grande promessa para, no futuro, tratar diversas patologias em Ortopedia com uma maior eficácia comparativamente aos métodos da actualidade.

Sublinha-se a necessidade constante de promover uma avaliação mais rigorosa do seu sucesso terapêutico, realizando um maior número de estudos devidamente planeados e estruturados com o intuito de reduzir as limitações de cada um. Os trabalhos devem conter uma amostra representativa de pacientes e comparar os resultados com grupos de controlo antes que se possa reconhecer efectivamente a sua capacidade terapêutica na prática clínica de doenças do foro ortopédico. O período de seguimento é outro aspecto a ter em conta, uma vez que quanto mais alargados, mais e melhores conclusões podem ser deduzidas.

Referências

1. Harley CB, Gearhart J, Jaenisch R, Rossant J, Thomson J. Pluripotent stem cells: Biology and applications. Durango Publisher Co: 2001.
2. Leblond CP. Classification of cell populations on the basis of their proliferative behavior. *Nat Cancer Inst Pub* 1964;14:119-50.
3. Bongso A, Lee EH. Stem cells: their definition, classification and sources. In: Bongso A, Lee EH, eds. *Stem cells: from bench to bedside*. Singapore: World Scientific Publishing, 2005:1.
4. Odorico JS, Kaufman DS, Thomson JA. Multilineage differentiation from human embryonic stem cell lines. *Stem Cells* 2001;19:193-204.
5. Caplan AI. The mesengenic process. *Clin Plast Surg* 1994;21:429-35.
6. Bianco P, Riminucci M. The bone marrow stroma in vivo: ontogeny, structure, cellular composition and changes in disease. In: Beresford JN, Cambridge ME, eds. *Marrow stromal cell culture: handbooks in practical animal cell biology*. Cambridge: Cambridge University Press, 1998:10-25.
7. Pittenger MF, Flake AM, Deans RJ. Stem cell culture: mesenchymal stem cells from bone marrow. In: Atala A, Lanza RP, eds. *Methods of tissue engineering*. San Diego: Academic Press, 2002:461-9.
8. Tse W, Laughlin MJ. Umbilical cord blood transplantation: A new alternative option. *Hematology (Am Soc Hematol Educ Program)* 2005;377-83.
9. Burley J. Stem cells and translation medicine ethics, law and policy. In: Bongso A, Lee EH, eds. *Stem cells: from bench to bedside*. Singapore: World Scientific Publishing, 2005;10:187-210.
10. Lauffenburger DA, Schaffer DV. 1999; The matrix delivers. *Nat Med* 5: 733–734.
11. Dominici M, Le Blanc K, Mueller 1, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells: the International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8(4):315-317.

12. Foster LJ, Zeemann PA, Li C, Mann M, Jensen ON, Kassem M. Differential expression profiling of membrane proteins by quantitative proteomics in a human mesenchymal stem cell line undergoing osteoblast differentiation. *Stem Cells*. 2005;23(9): 1367-1377.
13. Young BH, Peng H, Huard J. Muscle-based gene therapy and tissue engineering to improve bone healing. *Clin Orthop* 2002;403(Suppl):243-51.
14. Connolly J, Guse R, Lippiello L. Development of an osteogenic bone marrow preparation. *J Bone Joint Surg Am* 1989;71:684-91.
15. Long MW, Williams JL, Mann KG. Expression of human bonerelated proteins in the hematopoietic microenvironment. *J Clin Invest*. 1990;86(5):1387-1395.
16. Long MW, Robinson JA, Ashcraft EA, Mann KG. Regulation of human bone marrow-derived osteoprogenitor cells by osteogenic growth factors [published correction appears in *J Clin Invest*. 1995;96(5):2541], *J Clin Invest*. 1995;95(2):881-887,
17. Long MW, Ashcraft EK, Normalle D, Mann KG, Age-related phenotypic alterations in populations of purified human bone precursor cells. *J Gerontol A Biol Sei Med Sei*. 1999;54(2)A:B54-B62.
18. Falla N, Van Vlasselaer P, Bierkens J, Borremans B, Schoeters G, Van Gorp U. Characterization of a 5-fluorouracil-enriched osteoprogenitora population of the murine bone marrow. *Blood*. 1993;82(12):3580-3591.
19. Simmons PJ, Torok-Storb B. Identification of stromal cell precursors in human bone marrow by a novel monoclonal antibody, STRO-1. *Blood*. 1991;78(1):55-62.
20. Gronthos S, Graves SE, Ohta S, Simmons PJ. The STRO-1-H fraction of adult human bone marrow contains the osteogenic precursors. *Blood*. 1994;84(12):4164-4173.
21. Gronthos S, Fitter S, Diamond P, Simmons PJ, Itescu S, Zannettino ACW. A Novel monoclonal antibody (STRO-3) identifies an isoform of tissue nonspecific alkaline phosphatase expressed by multipotent bone marrow stromal stem cells. *Stem Cells Dev*. 2007;16(6):953-963.

22. Baksh D, Yao R, Tuan RS. Comparison of proliferative and multilineage differentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from umbilical cord and bone marrow. *Stem Cells*. 2007 Jun;25(6):1384-1392. Epub 2007 Marl.
23. Sacchetti B, Funari A, Michienzi S, et al. Self-renewing osteoprogenitors in bone marrow sinusoids can organize a hematopoietic microenvironment [published correction appears in *Cell*. 2008;133(5):928]. *Cell*. 2007;131(2):324-336.
24. Vaccaro AR, Chiba K, Heller JG. Bone grafting alternatives in spinal surgery. *The Spine Journal* 2002;2:206-15.
25. Ripamonti U, Ma SS, van den Heever B, Reddi AH. Osteogenin, a bone morphogenetic protein, adsorbed on porous hydroxyapatite substrata, induces rapid bone differentiation in calvarial defects of adult primates. *Plast Reconstr Surg* 1992;90: 382-93.
26. Yasko AW, Lane JM, Fellingner EJ et al. The healing of segmental bone defects, induced by recombinant human bone morphogenetic protein (rhBMP-2): a radiographic, histological, and biomechanical study in rats. *J Bone Joint Surg [Am]* 1992; 74-A:659-70.
27. Jaiswal N, Haynesworth SE, Caplan AI, Bruder SP. Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro. *J Cell Biochem* 1997;64:295-312
28. Niyibizi C, Baltzer A, Latterman C, et al. Potential role for gene therapy in the enhancement of fracture healing. *Clin Orthop* 1998;355(Suppl):148-53.
29. Shen FH, Visger JM, Balian G, Hurwitz SR, Diduch DR. Systemically administered mesenchymal stromal cells transduced with insulin-like growth factor-I localize to a fracture site and potentiate healing. *J Orthop Trauma* 2002;16:651-9.
30. Yoshikawa H, Myoui A. Bone tissue engineering with porous hydroxyapatite ceramics. *J Artif Organs* 2005;8:131-6.
31. Gutierrez M, Lopes MA, Sooraj Hussain N, Lemos AF, Ferreira JMF, Afonso A, Cabral AT, Almeida L, Santos JD. Bone ingrowth in macroporous Bonelike[®] for orthopaedic applications. *Acta Biomaterialia* 2008;4(2):370-377

32. Wiesmann HP, Joos U, Meyer U. Biological and biophysical principles in extracorporal bone tissue engineering: part II. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2004;33:523-30.
33. Goshima J, Goldberg VM, Caplan AI. Osteogenic potential of culture-expanded rat marrow cells as assayed in vivo with porous calcium phosphate ceramic. *Biomaterials* 1991;12:253-8.
34. Gundle R, Joyner CJ, Triffitt JT. Human bone tissue formation in diffusion chamber culture in vivo by bone-derived cells and marrow stromal fibroblastic cells. *Bone* 1995; 16:597-601.
35. Bruder SP, Kurth AA, Shea M, et al. Bone regeneratuion by implantation of purified culture-expanded human mesenchymal stem cells. *J Orthop Res* 1998;16:155-62.
36. Einhorn TA. Enhancement of fracture-healing. *J Bone Joint Surg Am.* 1995;77(6):940-956.
37. Hayda RA, Brighton CT, Esterhai JL Jr. Pathophysiology of delayed healing. *Clin Orthop Relat Res.* 1998;355(suppl):S31-S40.
38. Marsh D. Concepts of fracture union, delayed union, and nonunion. *Clin Orthop Relat Res.* 1998;355(suppl):S22-S30.
39. Arinzeh TL, Peter SJ, Archambault MP, et al, Allogeneic mesenchymal stem cells regenerate bone in a critical-sized canine segmental defect, *J Bone Joint Surg Am.* 2003;i5-A(\0):I9n-I935.
40. Bruder SP, Kraus KH, Goldberg VM, Kadiyala S. The effect of implants loaded with autologous mesenchymal stem cells on the healing of canine segmentai bone defects. *J Bone Joint Surg Am.* 1998;80(7):985-996.
41. Kon E, Muraglia A, Corsi A, et al. Autologous bone marrow stromal cells loaded onto porous hydroxyapatite ceramic accelerate bone repair in criticalsize defects of sheep long bones. *J Biomed Mater Res.* 2000;49(3):328-337.
42. Petite H, Viateau V, Bensaid W, et al. Tissue-engineered bone regeneration. *Nat Biotechnol.* 2000;18(9):959-963.

43. Viateau V, Guillemain G, Bousson V, et al. Long-bone critical-size defects treated with tissue-engineered grafts: a study on sheep. *J Orthop Res.* 2007;25(6):741-749.
44. Quarto R, Mastrogiacomo M, Cancedda R, et al. Repair of large bone defects with the use of autologous bone marrow stromal cells [letter]. *WEng/7 Wed.* 2001;344(5):385-386.
45. Marcacci M, Kon E, Moukhachev V, et al. Stem cells associated with macroporous bioceramics for long bone repair: 6- to 7-year outcome of a pilot clinical study. *Tissue Eng.* 2007;13(6):947-955.
46. Hemigou P, Poignard A, Beaujean F, Rouard H, Percutaneous autologous bone-marrow grafting for nonunions: influence of the number and concentration of progenitor cells. *J Bone Joint Surg Am.* 2005;87(7): 1430-1437.
47. Byers PH. Osteogenesis imperfecta. In: Royce PM, Steinmann B, eds. *Connective Tissue and Its Heritable Disorders: Molecular, Genetic and Medical Aspects.* New York, NY: Wiley-Liss Inc; 1993:137-350.
48. Mashiba T, Hirano T, Turner CH, Forwood MR, Johnston CC, Burr DB. Suppressed bone turnover by bisphosphonates increases microdamage accumulation and reduces some biomechanical properties in dog rib. *J Bone Miner Res.* 2000;15(4):613-620.
49. Prockop DJ. What holds us together? Why do some of us fall apart? What can we do about it? *Matrix Biol.* 1998; 16(7):519-528.
50. Pereira RF, O'Hara MD, Laptev AV, et al. Marrow stromal cells as a source of progenitor cells for nonhematopoietic tissues in transgenic mice with a phenotype of osteogenesis imperfecta. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998; 95(3):1142-1147.
51. Panaroni C, Gioia R, Lupi A, et al. In utero transplantation of adult bone marrow decreases perinatal lethality and rescues the bone phenotype in the knockin murine model for classical, dominant osteogenesis imperfecta. *Blood.* 2009 Jul;n4(2):459-468. Epub 2009 May 4.

52. Horwitz EM, Prockop DJ, Fitzpatrick LA, et al. Transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta. *Nat Med*. 1999;5(3):309-313.
53. Hunziker EB. Articular cartilage repair: basic science and clinical progress: a review of the current status and prospects. *Osteoarthritis Cartilage* 2002;10:432-63.
54. Blevins FT, Steadman JR, Rodrigo JJ, Silliman J. Treatment of articular cartilage defects in athletes: an analysis of functional outcome and lesion appearance. *Orthopedics* 1998;21:761-7.
55. Knutsen G, Engrehtsen L, Ludvigsen TC, et al. Autologous chondrocyte implantation compared with microfracture in the knee: a randomized trial. *J Bone Joint Surg [Am]* 2004;86-A:455-64.
56. Bentley G, Greer RB 3rd. Homotransplantation of isolated epiphyseal and articular cartilage chondrocytes into joint surfaces of rabbits. *Nature* 1971;230:385-8.
57. Hendrickson DA, Nixon AJ, Grande DA, et al. Chondrocyte-fibrin matrix transplants for resurfacing extensive articular cartilage defects. *J Orthop Res* 1994;12: 485-97.
58. Gallay SH, Miura Y, Commisso CN, Fitzsimmons JS, O'Driscoll SW. Relationship of donor site to chondrogenic potential of periosteum in vitro. *J Orthop Res* 1994; 12:515-25.
59. Wakitani S, Imoto K, Yamamoto T, et al. Human autologous culture expanded bone marrow mesenchymal cell transplantation for repair of cartilage defects in osteoarthritic knees. *Osteoarthritis Cartilage* 2002;10:199-206.
60. Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A, et al. Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *N Engl J Med* 1994;331:889-95.
61. Hui JH, Chen F, Thambyah A, Lee EH. Treatment of chondral lesions in advanced osteochondritis dissecans: a comparative study of the efficacy of chondrocytes, mesenchymal stem cells, periosteal graft, and mosaicplasty (osteochondral autograft) in animal models. *J Pediatr Orthop* 2004;24:427-33.

62. Wakitani S, Goto T, Pineda SJ, Young RG, Mansour JM, Caplan AI, et al. Mesenchymal cell-based repair of large, full-thickness defects of articular cartilage. *J Bone Joint Surg Am* 1994;76:579-92.
63. Murphy JM, Fink DJ, Hunziker EB, Barry FP. Stem cell therapy in a caprine model of osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 2003;48:3464-74.
64. Northmore-Ball MD, Dandy DJ. Long-term results of arthroscopic partial meniscectomy. *Clin Orthop* 1982;167:34-42.
65. Allen PR, Denham RA, Swan AV. Late degenerative changes after meniscectomy: factors affecting the knee after operation. *J Bone Joint Surg [Br]* 1984;66-B:666-71.
66. Dutton A, Hui JPP, Lee EH, Goh J. Enhancement of meniscal repair using mesenchymal stem cells in a porcine model. *Procs 5th Combined Meeting of the Orthopaedic Research Societies of USA, Canada, Japan & Europe, 2004.*
67. Antoniou J, Steffen T, Nelson F, Winterbottom N, Hollander AP, Poole RA, Aebi M, Alini M. (1996) The human lumbar intervertebral disc: evidence for changes in the biosynthesis and denaturation of the extracellular matrix with growth, maturation, ageing, and degeneration. *J Clin Invest* 98:996–1003
68. Alini M, Roughley PJ, Antoniou J, Stoll T, Aebi M (2002) A biological approach to treating disc degeneration: not for today, but may be for tomorrow. *Eur Spine J* 11:S215–S220.
69. Sakai D, Mochida J, Iwashina T, Watanabe T, Nakai T, Ando K, et al. Differentiation of mesenchymal stem cells transplanted to a rabbit degenerative disc model: potential and limitations for stem cell therapy in disc regeneration. *Spine* 2005;30:2379-87.
70. Sakai D, Mochida J, Iwashina T, Hiyama A, Omi H, Imai M, et al. Regenerative effects of transplanting mesenchymal stem cells embedded in atelocollagen to the degenerated intervertebral disc. *Biomaterials* 2006;27:335-45.

71. Crevensten G, Walsh AJ, Ananthakrishnan D, et al. Intervertebral disc cell therapy for regeneration: mesenchymal stem cell implantation in rat intervertebral discs. *Ann Biomed Eng* 2004;32:430-4.
72. Brown TD, Fu FH, Hanley EN Jr. Comparative assessment of the early mechanical integrity of repaired tendon achillis ruptures in the rabbit. *J Trauma* 1981;21:951-7.
73. Badylak SF, Tullius R, Kokini K, et al. The use of xenogeneic small intestinal submucosa as a biomaterial for achilles tendon repair in a dog model. *J Biomed Mater Res* 1995;29:977-85.
74. Lieberman JR, Lozman J, Czajka J, Dougherty J. Repair of achilles tendon ruptures with Dacron vascular graft. *Clin Orthop* 1988;234:204-8.
75. Ozaki J, Fujiki J, Sugimoto K, Tamai S, Masuhara K. Reconstruction of neglected Achilles tendon rupture with Marlex mesh. *Clin Orthop* 1989;238:204-8.
76. Young RG, Butler DL, Weber W, et al. Use of mesenchymal stem cells in a collagen matrix for Achilles tendon repair. *J Orthop Res* 1998;16:406-13.
77. Awad HA, Boivin GP, Dressler MR, et al. Repair of patellar tendon injuries using a cell-collagen composite. *J Orthop Res* 2003;21:420-31.
78. Ouyang HW, Goh JC, Thambyah A, Teoh SH, Lee EH. Knitted poly-lactide-co-glycolide scaffold loaded with bone marrow stromal cells in repair and regeneration of rabbit achilles tendon. *Tissue Eng* 2003;9:431-9.
79. Lim JK, Hui J, Li L, et al. Enhancement of tendon graft osteointegration using mesenchymal stem cells in a rabbit model of anterior cruciate ligament reconstruction. *Arthroscopy* 2004;20:899-910.
80. Baltzer AW, Lattermann C, Whalen JD, et al. Genetic enhancement of fracture repair: healing of an experimental segmental defect by adenoviral transfer of the BMP-2 gene. *Gene Ther.* 2000;7(9):734-739.
81. Lind M, Büniger C. Orthopaedic applications of gene therapy. *Int Orthop.* 2005 Aug;29(4):205-209. Epub 2005 May 18.

82. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*. 2007;131(5):861-872.
83. Nakagawa M, Koyanagi M, Tanabe K, et al. Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nat Biotechnol*. 2008 Jan;26(1):101-106. Epub 2007 Nov 30.

FIGURAS

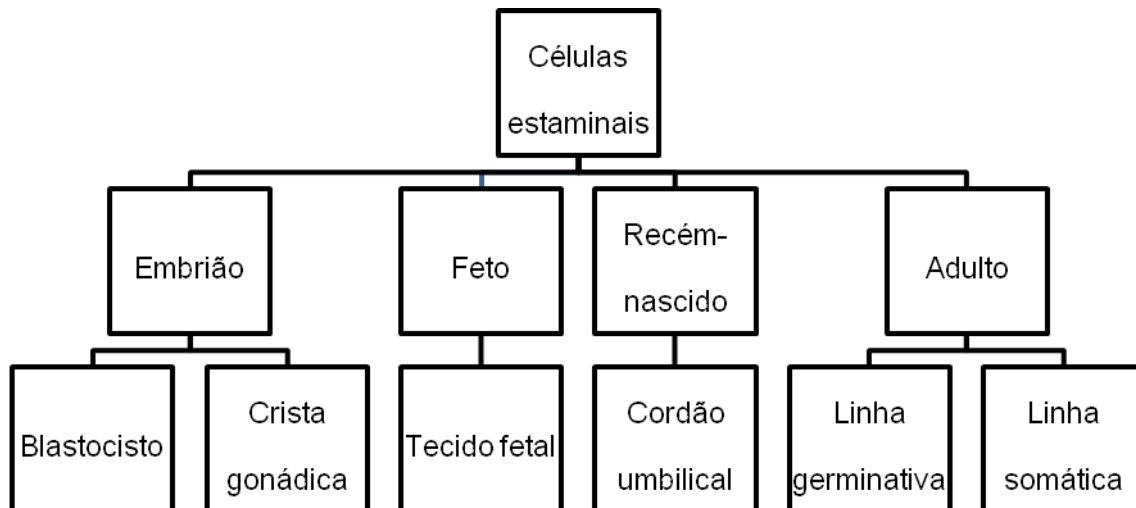


Figura 1 – Fontes de células estaminais.

