

Artículo de Revisión

Células Madre de Tejido Adiposo y la Importancia de la Estandarización de un Modelo Animal para Experimentos Preclínicos

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

RESUMEN

Las células madre son células indiferenciadas, capaces de autorrenovarse y de diferenciarse en diversos tipos celulares, además de presentar propiedades inmunomoduladoras y efectos paracrinos mediante lesión tisular, pudiendo, de esa forma, tratar lesiones y enfermedades o aún substituir células dañadas o perdidas. Entre las fuentes de células madre adultas, el tejido adiposo es una fuente atractiva, pues el organismo humano posee gran reserva de ese tejido, que, a su vez, se obtiene en grandes cantidades por medio de métodos poco invasivos. El interés en esas células aumenta constantemente debido a sus propiedades y posibles aplicaciones en la medicina regenerativa y terapia celular. Gran parte de esas pesquisas están dirigidas a enfermedades cardiovasculares, que son la principal causa de morbilidad y mortalidad en todo el mundo. Aunque en los últimos años, los tratamientos en cardiología hayan avanzado, el desarrollo de nuevas terapias que recuperen el tejido dañado aún permanece como uno de los objetivos principales de las investigaciones cardíacas. Sin embargo, para obtener resultados eficaces, es necesaria la estandarización de modelos animales *in vivo* e *in vitro* para estudios preclínicos y, consecuentemente, la aplicación en humanos. El desarrollo de modelos preclínicos en animales de gran tamaño exige el uso bien caracterizado de linajes de células animales semejantes a las de sus equivalentes humanos. El modelo porcino representa una gran ventaja para la investigación traslacional preclínica.

DESCRIPTORES: Células madre. Tejido adiposo. Enfermedades cardiovasculares. Porcinos. Modelos animales.

ABSTRACT

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

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

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

¹ Post graduación (Doctorado) Departamento de Biología Estructural y Funcional de la Universidad Federal de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil.

² Post doctorado Departamento de Biología Estructural y Funcional de la Universidad Federal de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil.

³ Médico cardiólogo- Servicio de Hemodinámica del Instituto del Corazón- Hospital de Clínicas - Facultad de Medicina de la Universidad de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil.

⁴ Médico cardiólogo - Servicio de Hemodinámica - Instituto del Corazón - Hospital de Clínicas de la Facultad de Medicina de la Universidad de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil.

⁵ Directora del Laboratorio de Genética - Instituto Butantan. São Paulo, SP, Brasil.

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

Recibido : 28/3/2013 • Aceptado: 8/8/2013

Fuente de financiación: Marília Sanches Santos Rizzo Zuttion es becada por la Coordinación de Perfeccionamiento de Personal de Nivel Superior (CAPES).

Las células madre (CM) son células indiferenciadas y definidas por su capacidad de autorrenovación y diferenciación para diversos tipos celulares. En esos procesos de autorrenovación y diferenciación, las CM pueden seguir dos tipos diferentes de división: (1) división simétrica, en la cual la CM genera una nueva CM y una célula progenitora y (2) división asimétrica, en la cual la CM genera células diferenciadas.¹ Ese proceso ocurre manteniendo la homeostasis del tejido y el nicho de las CM activo. Los nichos son microambientes fisiológicos, que consisten en células especializadas, que señalizan y suministran moléculas de la superficie celular para controlar la tasa de proliferación de CM, determinando la diferenciación de las células progenitoras y protegiendo las CM de la apoptosis. Esa interacción recíproca entre las CM y el nicho ocurre en las fases iniciales del desarrollo embrionario y es mantenida durante la vida adulta, siendo esencial para la ontogénesis y reparación tisular.²

Las CM se dividen en dos tipos principales, de acuerdo con su origen y plasticidad: pueden ser de origen embrionario, es decir, aisladas del cigoto o de la masa celular interna del blastocito, o adultas que son derivadas del organismo adulto. En lo que se refiere a la capacidad de esas células de originar tejidos del organismo, las CM embrionarias (CME) se clasifican como pluripotentes, o sea, capaces de derivar todos los tipos celulares del organismo; sin embargo, ya las adultas poseen un potencial de diferenciación aún más restringido, siendo clasificadas como multipotentes.

Las CM adultas (CMA) fueron primeramente descritas por Friedenstein, en 1970, que aisló, *in vitro*, células estromales de la médula ósea del ratón. En su estudio, demostró sus características morfológicas, de expansión y de diferenciación celular.³ Más tarde, en diferentes condiciones de cultivo, se observó que las CMA de la médula ósea fueron capaces de diferenciarse en osteoblastos, condrocitos y adipocitos.⁴ Con base en esa capacidad de diferenciación en diversos tipos celulares, Caplan propuso, en 1991, el término "célula madre mesenquimal" (CMM), del inglés *mesenchymal stem cell* (MSC).⁵

La fuente de CMM más estudiada es la médula ósea. Las CMM de la médula ósea, que representan una rara subpoblación (<0,01% de las células mononucleares de la médula ósea), son un grupo de células clonogénicas, presentes en el estroma medular y capaces de diferenciarse no solamente en células de origen mesodérmico, sino también en otros tipos celulares no mesodérmicos, como los neurales y los hepatocitos.⁶

Las CMA se denominan multipotentes y, al contrario de lo que se creía inicialmente, no sólo están involucradas en el proceso de reparación y homeostasis de los tejidos de los cuales son aisladas, sino que también poseen diversos efectos paracrinos, que contribuyen en la recuperación y la regeneración de otros tipos celulares y tejidos del organismo,⁷ pues esas células producen y segregan una amplia variedad de cito-

quinas, quimiocinas y factores de crecimiento que actúan de forma paracrina en la regeneración del tejido *in vivo*.⁸

CARACTERIZACIÓN CELULAR

Para que una población de células sea considerada CM debe obedecer a como mínimo tres prerequisites según la *International Society for Cellular Therapy*:

1. Plástico-adherentes cuando mantenidas en condiciones de cultivo;

2. Positivas para CD105, CD73 y CD90, y negativas para CD45, CD34, CD14, CD11b, CD79 o CD19 y HLA-DR.⁹ No obstante, dependiendo de la fuente de la cual se obtienen, métodos de aislamiento celular y características del cultivo, la expresión de esos marcadores puede ocurrir de forma variada. Las CMA también pueden expresar otras proteínas de superficie como: CD44, CD71 (receptor de transferrina), Stro-1, fibronectina, vimentina, CD73 (ecto-5'-nucleotidasa, SH3 y SH4), entre otras.^{10,11} Aún son necesarios más estudios para dilucidar la variabilidad de expresión de diversos marcadores;

3. Esas células deben ser capaces de diferenciarse en osteoblastos, condrocitos y adipocitos.⁹

FUENTES DE CMM

Como se ha visto anteriormente, la médula ósea es la fuente más común de CMM,¹² pero poblaciones similares también fueron obtenidas de otras fuentes, como la sangre del cordón umbilical, placenta, líquido amniótico, dermis, hígado, bazo,¹³ pulpa dentaria¹⁴ y tejido adiposo.¹⁵

Entre esas fuentes, se destaca el tejido adiposo, que ofrece más ventajas, en comparación con las otras fuentes, por presentar bajo riesgo para donadores, elevado número de CMM (es posible coleccionar de 100 mL hasta 1 L de tejido adiposo) y por ser capaz de mantener su potencial proliferativo de ocho a diez pasajes sin ningún deterioro detectable en su capacidad de autorrenovación, además de la ausencia de rechazo inmunológico.¹⁶

EL TEJIDO ADIPOSEO

El tejido adiposo es de origen mesodérmico y contiene una población celular estromal heterogénea. El mesodermo surge durante la gastrulación como una camada intermedia, entre el endodermo y ectodermo. El mesodermo embrionario origina varios tipos de músculos - incluyendo el cardíaco, todo el tejido conjuntivo, los vasos sanguíneos, la sangre y los vasos linfáticos.¹⁵ Históricamente, el tejido adiposo era considerado un reservorio metabólico de almacenamiento y liberación de substratos de energía en forma de triglicéridos y colesterol, bien como las vitaminas liposolubles. A mediados de los años 1980, ese concepto fue modificado, a partir de la identificación

de su actuación en la fisiología sexual por medio de los esteroides sexuales.¹⁷ El tejido adiposo es uno de los componentes del tejido conjuntivo con importantes funciones, como dar rigidez y resistencia a los tejidos, mantener la homeostasis térmica y auxiliar en la estática visceral. En mamíferos, el tipo de tejido adiposo predominante es el blanco, seguido del tejido adiposo marrón, que está presente en recién nacidos, pero prácticamente ausente en adultos.¹⁸ Ese tejido se distribuye en el organismo como tejido adiposo blanco subcutáneo y tejido adiposo blanco visceral, consistiendo en adipocitos maduros, preadipocitos, fibroblastos, células musculares lisas vasculares, células endoteliales, monocitos, macrófagos residentes y linfocitos.¹⁹

Según Zannettino et al.², el nicho de las CMM del tejido adiposo se localiza en la región perivascular, siendo compuesto por los vasos sanguíneos en asociación con células de tejido conjuntivo, adiposas, estromales, diversos progenitores y CM (Figura 1). Es posible decir que el nicho de las CM del tejido adiposo es perivascular. Aunque el término "perivascular" signifique "alrededor de los vasos sanguíneos", las CM del tejido adiposo también fueron encontradas en el interior de los vasos, formando parte de los componentes de la pared de los vasos sanguíneos. Mientras tanto, debido a la falta de marcadores específicos, la exacta localización y la identidad celular aún son imprecisas.

La red vascular desempeña un papel en la adipogénesis. Durante el desarrollo embrionario, la formación de capilares es una fase decisiva y específica en el desarrollo de los lóbulos de grasa y se necesita una vascularización adecuada para un óptimo funcionamiento del tejido adiposo, como un órgano metabólico y endocrino. Además, las células del linaje adipogénico segregan potentes factores angiogénicos, como

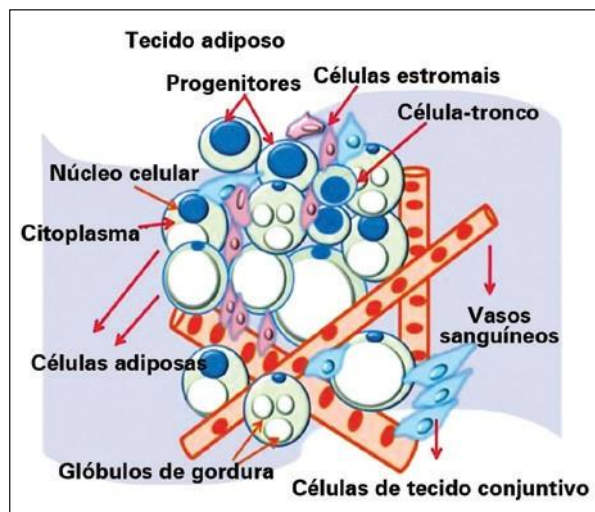


Figura 1. Ilustración del nicho de las células madre adultas del tejido adiposo. Fuente: Irina Kerkis.

la monobutirina o factor de crecimiento endotelial vascular, la leptina y la adiponectina. Y, finalmente, los factores antiangiogénicos promueven la pérdida del tejido adiposo, demostrando así la importancia de la angiogénesis para el mantenimiento de la adipogénesis.²⁰⁻²² Sin embargo, se pueden aislar grandes cantidades de CM de esa fracción vascular con el método de digestión enzimática.

AISLAMIENTO DE LAS CMM DE TEJIDO ADIPOSO

En 1964, Martin Rodbell,²³ estableció el método de aislamiento *in vitro* de adipocitos maduros y progenitores adipogénicos del tejido adiposo de ratones. En su protocolo, ese tejido fue fragmentado y digerido con la enzima colagenasa tipo I a 37°C y, en seguida, el material fue centrifugado. El sobrenadante contenía adipocitos maduros y el *pellet* contenía componentes de la fracción del estroma vascular, incluyendo las células progenitoras de los adipocitos, además de células de linaje hematopoyético.

Como en muchos campos de rápido desarrollo, una serie de denominaciones han sido utilizadas para describir la población de células adherentes, aisladas a partir de la digestión enzimática por colagenasa del tejido adiposo, tales como lipoblasto, pericito, preadipocito, procesado del lipoaspirado, CM estromal derivada del tejido adiposo, CMA derivada del tejido adiposo, célula estromal adulta derivada del tejido adiposo, CM multipotente derivada del tejido adiposo y CMM del tejido adiposo (Figuras 2A a 2C). En 2004, la *International Fat Applied Technology Society* (IFATS) propuso, en Pittsburgh, una nomenclatura estandarizada, adoptando el término "ASC" del inglés "*adipose stem cells*", para referirse a la población de células multipotentes adherentes aisladas de la fracción del estroma vascular.²⁴ Las CMM de tejido adiposo fueron aisladas y caracterizadas en humanos y en especies animales.^{13,25-30}

CMM DE TEJIDO ADIPOSO

Como la médula ósea, las CM de tejido adiposo tienen un amplio potencial de diferenciación en los variados tipos celulares, como adipogénica, condrogénica, osteogénica (Figuras 2D a 2F), angiogénica, neurogénica, miogénica y cardio-miogénica.³¹ Mientras tanto, la tasa de éxito de aislamiento es de 100% y el rendimiento del tejido adiposo es 40 veces mayor que la médula ósea.³² Además, la cantidad de células no parece disminuir con la edad, haciendo que ese tipo de célula sea atractivo para el aislamiento de CMM y progenitores.³³

Las CMM poseen la capacidad de acumularse alrededor de procesos inflamatorios cuando administradas *in vivo*, debido a sus propiedades quimiotácticas. Por ese motivo, esas células pueden ser utilizadas en diversas áreas como, por ejemplo, en la terapia regenerativa.⁷ Actualmente, células con características semejantes a las CMM de humanos

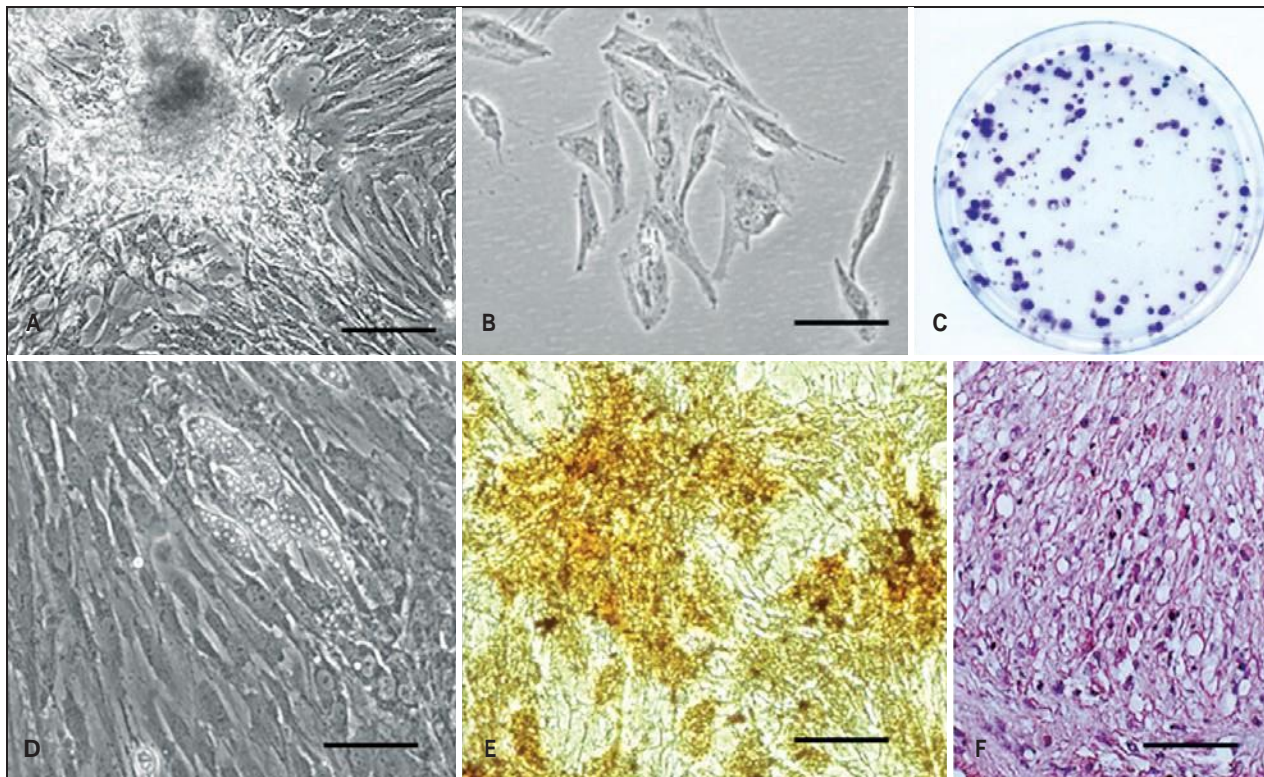


Figura 2. Células madre de tejido adiposo de porcinos. (A) Aislamiento de las células madre de tejido adiposo. (B) Morfología de las células madre de tejido adiposo. (C) Ensayo de unidad formadora de colonias en las células madre de tejido adiposo. (D) Diferenciación adipogénica. Se notan las células con gotas de lípidos. (E) Diferenciación osteogénica (coloración de Von Kossa); se puede observar mineralización. (F) Coloración con hematoxilina y eosina demostrando la diferenciación condrogénica. Escala de barras: A = 20 μm ; B a F = 10 μm . A, B y D = contraste de fase. C, E y F = microscopía de luz. Fuente: Zuttion et al., 2013 (datos no publicados).

fueron aisladas *in vitro* a partir de diversos animales (porcinos,³⁴⁻³⁸ perro³⁹ y ovinos⁴⁰). Esos animales son frecuentemente utilizados en las pesquisas de medicina regenerativa como modelo animal para las enfermedades osteoarticulares,⁴¹ lesión de la médula espinal⁴² e infarto de miocardio.³⁷

MEDICINA REGENERATIVA

Como comprobado anteriormente, las CMM de tejido adiposo exhiben abundante capacidad de expansión *in vitro* y, aún más importante que eso, pueden derivar células de diversos linajes celulares y hasta cardiomiocitos,^{32,43} además de no haber cuestionamiento ético sobre su utilización. Por eso, el tejido adiposo se convirtió en una fuente de CMM muy atractiva para la medicina regenerativa y una de las áreas en que esas células están siendo muy empleadas es en Cardiología.⁶

El mayor porcentaje de muertes en el mundo por enfermedades no transmisibles es causado por enfermedad cardiovascular (48%), como por ejemplo, el infarto de miocardio y la insuficiencia cardíaca congestiva.⁴⁴ Otras enfermedades también son causas de disfunción miocárdica, como el mal de Chagas y otras cardiomiopatías.⁴⁵

Los avances en los tratamientos de enfermedades cardiovasculares son resultado, en parte, de un perfeccionamiento de las técnicas de revascularización coronaria, desarrollo de marcapasos cardíacos e implante de desfibriladores. Con excepción del trasplante cardíaco, esas opciones de tratamiento son limitadas por su incapacidad de substituir cardiomiocitos perdidos y cicatrices del miocardio, esto se agrava por la incapacidad del corazón de substituir su masa celular por medio de la autorrenovación. Se necesitan nuevos abordajes de tratamiento⁴⁶, y como alternativa ha sido propuesto el uso de terapia con CM, para generar nuevos cardiomiocitos.⁴⁷ Algunos estudios demostraron la capacidad de las CMM de tejido adiposo y médula ósea para diferenciarse en cardiomiocitos⁴⁸⁻⁵⁰. A pesar de todo, en ciertos estudios se observó que la diferenciación de las CMM en cardiomiocitos cuando inyectadas en el músculo cardíaco, es un evento raro, constatando que las CMM no son capaces de generar cardiomiocitos en cantidad suficiente para reparar una lesión en el miocardio.⁵¹ Mientras tanto las CMM poseen una propiedad no solo autocrina, sino también paracrina: cuando son inyectadas, segregan factores (factor de crecimiento vascular endotelial, factor de crecimiento de fibroblasto básico, factor de crecimiento de los hepatocitos, factor de crecimiento *insulina-like* I y adrenomedulina) que de desempeñan un papel an-

tiapoptótico, proangiogénico y reparador endógeno, además de ejercer una acción paracrina directamente en los cardiomiocitos, aumentando su tasa de sobrevivencia.⁵²

La neovascularización es otro proceso biológico importante influenciado por las CMM por medio de sus efectos paracrinos. Recientes estudios preclínicos en ratas con fracturas en el fémur demostraron el potencial angiogénico de las CM derivadas del tejido adiposo de humanos. Después del trasplante de CMA, ocurrió un aumento de la angiogénesis y de la neovascularización alrededor del área de osificación endocondral y un significativo aumento de la densidad capilar.⁵³ En otro estudio utilizando el cerdo como modelo animal, fue demostrado que, 8 semanas después del trasplante intramiocárdico de CMM, hubo una mejoría de la función ventricular izquierda. Los investigadores observaron que, después de la primera semana del trasplante, hubo mejoría del flujo sanguíneo miocárdico durante la diástole, lo que fue directamente relacionado al aumento del tamaño de los vasos sanguíneos. Esos resultados apuntaron el proceso de neovascularización como consecuencia de una significativa cardiomiogénesis.⁵⁴ Esto ocurre debido a la producción y secreción por parte de las CMM, de factores como el óxido nítrico, factor de crecimiento vascular endotelial, factor de crecimiento de fibroblasto básico, factor de crecimiento de los hepatocitos angiopoyetina, entre otros. La acción de esos factores acarrea: migración y proliferación de las células endoteliales, y de células musculares lisas vasculares; aumento y maduración de los vasos; y síntesis de matriz extracelular. De ese modo, las CMM actuarían en la mejoría de la densidad capilar y en la formación de vasos colaterales.⁷ Sin embargo, a pesar de muchas pesquisas sobre el potencial de diferenciación de esas células en cardiomiocitos, aun son necesarios estudios para la comprensión de esos mecanismos.

MODELO ANIMAL UTILIZADO EN INVESTIGACIONES CON CM

Desde hace muchos años atrás y hasta el día de hoy, las más variadas especies de animales han sido usadas en experimentos de investigaciones científicas, con el fin de descubrir medidas profilácticas o tratamiento de innumerables enfermedades que afectan a los seres vivos.^{55,56} Alrededor de 1865, Claude Bernard⁵⁷ introdujo el uso de animales como modelo de estudio y transposición de los conocimientos adquiridos para la comprensión de la fisiología humana. En su estudio, Bernard⁵⁷ realizó modificaciones físicas y químicas que ocasionaban alteraciones en los animales semejantes a enfermedades en humanos. Animales de pequeño porte (ratón, *hamster* o jerbo) comprenden más de 90% del total de especies usadas en laboratorios,⁴⁸ pero el modelo ideal para uso en investigaciones científicas sería aquel que se asemejase al ser humano en sus características fisiológicas, anatómicas y orgánicas; lo que conduce a una a d e c u a d a eficiencia de las conclusiones obtenidas.⁵⁷

Frente a ese hecho, muchos resultados en investigaciones con CM no son concluyentes debido a la práctica del xenotrasplante (trasplante de órgano o células entre especies diferentes), pues esas células son normalmente aisladas de seres humanos^{58,59} y transplantadas en otra especie, lo que dificulta el estudio y la comprensión de la acción de dichas células en el organismo. Además, pocos animales son semejantes al organismo humano, lo que perjudica aun más la comprensión de las CM. De ese modo, sería ideal un modelo animal que fuera semejante en anatomía, fisiología y fisiopatología a los seres humanos. Según Bustard y McClellan⁶⁰, el cerdo (*Sus scrofa domesticus*) presenta similitudes con el hombre en lo que respecta a la odontología, morfología y fisiología renal, agudeza visual, estructura del ojo, fisiología y morfología de la piel, fisiología y anatomía cardiovascular, fisiología y anatomía digestiva e inmunología. Esas semejanzas son menos evidentes cuando se comparan otros modelos, como el de perro, la rata, los ratones y otras especies utilizadas en investigaciones científicas.⁵⁶ Según Tumbleson,⁶¹ el cerdo es un modelo eficaz para estudios en investigaciones biomédicas, pues, además de presentar estructura y funciones semejantes al ser humano, presenta similitud con el tamaño, patrón de alimentación, fisiología digestiva, hábitos dietéticos, estructura y funciones del riñón, estructura vascular del pulmón, distribución de las arterias coronarias, propensión para la obesidad, frecuencia respiratoria y comportamiento social, siendo un modelo animal flexible para determinar las exposiciones crónicas y agudas al alcohol, cafeína, tabaco, aditivos alimenticios y poluentes del ambiente.

En relación a las CMM del tejido adiposo, el modelo porcino sería ideal, pues, además de todas las semejanzas encontradas con el humano, el mismo presenta una gran reserva de grasa,⁶¹ facilitando el aislamiento de las CMM de tejido adiposo y el trasplante autólogo o heterólogo (trasplantes de órganos o células entre la misma especie), con el fin de evaluar el mecanismo de acción de esas células y de las CMM de humanos.

CM DE TEJIDO ADIPOSEO PORCINO

Diversos autores realizaron el aislamiento de CM del tejido adiposo de puercos. Tales células demostraron potencial de diferenciación en diferentes linajes mesodermales como hueso, cartílago, grasa, músculo y cardiomiocitos, y expresaron diferentes marcadores de CM, presentando semejanzas con CMM de tejido adiposo de humanos.³⁴⁻³⁸ Es interesante el hecho de que el puerco ya es bastante utilizado en esta área en lo que se refiere al implante de dispositivos endovasculares, como los stents.^{62,63} Mientras tanto es un óptimo modelo preclínico para probar el efecto de las CM específicamente en el área de CM aplicadas a enfermedades cardiovasculares.

Además, estas células aisladas de puercos fueron parcialmente caracterizadas con relación a la expresión de los marcadores de CMM, siendo difícil, comparar los beneficios

de esas células en un organismo que no sea semejante al organismo humano.

CONSIDERACIONES FINALES

Las CMM aisladas del tejido adiposo presentan un amplio potencial de diferenciación y pueden ser fácilmente obtenidas y en grandes cantidades por medio de métodos poco invasivos y dolorosos. Además, esas células son capaces de promover la inmunomodulación del sistema inmunológico y poseen un efecto paracrino capaz de movilizar moléculas, a fin de regenerar un tejido lesionado. Aun así, gran parte de las pesquisas que estudian CM es limitada, debido al uso de xenotrasplantes y de la escasez de estandarización de un modelo animal que sea anatómica y fisiológicamente parecido al organismo humano, como por ejemplo, el cerdo. Por lo tanto, se necesita un mayor conocimiento del mecanismo de acción de esas células en un ambiente fisiológico, que reproduzca el organismo humano. Ese hecho hace que algunas aplicaciones clínicas y terapéuticas de las CM todavía sean inciertas. En resumen, la expectativa de la medicina regenerativa basada en la aplicación de CM depende del conocimiento del mecanismo de esas células y de sus efectos en el organismo, así como de las moléculas, de los factores y de las cascadas de señalización que controlan la sobrevivencia y la proliferación celular - mediante el contacto con las CM. Por lo tanto, la aplicabilidad de ellas depende, en gran parte, del uso de los modelos adecuados y de CM bien caracterizadas. Deberán surgir múltiples soluciones, a partir de las tecnologías crecientes en el área de CM y de la medicina regenerativa. Diversas innovaciones cambiarán la práctica de la medicina por el reconocimiento de que las células vivas son capaces de ejecutar una serie de funciones que los fármacos no pueden proporcionar.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran no haber conflicto de intereses relacionado a este manuscrito.

REFERENCIAS

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

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