



IPI INSTITUTO
NACIONAL
DA PROPRIEDADE
INDUSTRIAL
Assinado
Digitalmente

REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DA ECONOMIA
INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

CARTA PATENTE Nº BR 102013031330-0

O INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL concede a presente PATENTE DE INVENÇÃO, que outorga ao seu titular a propriedade da invenção caracterizada neste título, em todo o território nacional, garantindo os direitos dela decorrentes, previstos na legislação em vigor.

(21) Número do Depósito: BR 102013031330-0

(22) Data do Depósito: 05/12/2013

(43) Data da Publicação Nacional: 29/09/2015

(51) Classificação Internacional: C12N 5/0775; A61K 35/32; A61K 35/28; A61P 19/00.

(54) Título: PROCESSO DE CULTIVO DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS ADULTAS

(73) Titular: FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL. CGC/CPF: 88648761000103. Endereço: R. Francisco Getúlio Vargas 1130, Bloco A, Sala 301, Cid. Universitária - Petrópolis, Caxias do Sul, RS, BRASIL(BR), 95070-560; UNIÃO BRASILEIRA DE EDUCAÇÃO E ASSISTÊNCIA. CGC/CPF: 88630413000109. Endereço: Av. Ipiranga, 6681 prédio 96C, Porto Alegre, RS, BRASIL(BR), 90610-900

(72) Inventor: JOÃO ANTONIO PÊGAS HENRIQUES; ASDRUBAL FALAVIGNA; MANUELA FIGUEIRÓ; MARIANA ROESCH ELY; ISRAEL SILVEIRA DE AGUIAR; DENISE CANTARELLI MACHADO.

Prazo de Validade: 20 (vinte) anos contados a partir de 05/12/2013, observadas as condições legais

Expedida em: 03/03/2022

Assinado digitalmente por:

Liane Elizabeth Caldeira Lage

Diretora de Patentes, Programas de Computador e Topografias de Circuitos Integrados



Relatório Descritivo de Patente de Invenção

PROCESSO DE CULTIVO DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS ADULTAS

Campo da Invenção

[0001] A presente invenção descreve um processo de cultivo de células-tronco mesenquimais adultas, sendo que o dito processo compreende as etapas de: a) incubação de tecido *ex-vivo* degenerado em meio de cultura; b) isolamento das células-tronco mesenquimais adultas do meio obtido na etapa a); e c) cultura das células-tronco mesenquimais adultas isoladas na etapa b). A presente invenção provê também um kit para o cultivo de células-tronco mesenquimais adultas, que compreende: a) recipiente de material antiaderente; b) meio de cultura adequado; e c) recipiente adequado ao cultivo celular. A presente invenção também se refere a uma composição compreendendo as células-tronco mesenquimais adultas obtidas pelo referido processo e ao uso das células-tronco mesenquimais adultas obtidas pelo referido processo para a fabricação de uma composição para o tratamento de discopatias do disco intervertebral degenerado. A presente invenção se situa nos campos da embriologia, biologia celular e medicina regenerativa.

Antecedentes da Invenção

[0002] A doença degenerativa do disco (DDD) é um processo comum e natural da coluna vertebral humana. Esta degeneração ocorre progressivamente, podendo afetar a biomecânica, estabilidade e função neurológica da coluna (Roh et al., 2005).

[0003] Nos Estados Unidos (EUA), são realizadas cerca de 300.000 cirurgias por ano devido ao DDD, sendo que os custos relacionados com os procedimentos cirúrgicos sobem 50 bilhões de dólares a cada ano (Koebbe et al., 2002).

[0004] Dados estatísticos revelam a gravidade da dita doença, em que, no total,

1,5 milhões de cirurgias de disco são realizados em todo o mundo a cada ano (Peul et al., 2007). Anualmente, cerca de 5 mil pessoas apresentam ciatalgia (também conhecida como ciática), uma dor na perna devido à irritação ou compressão do nervo ciático, devido a distúrbios do disco (Bakhsh, 2010), que são a principal causa de dor lombar crônica no mundo moderno (Katz et al., 1999).

[0005] Atualmente, a degeneração do disco intervertebral (DIV) é considerada um fenômeno irreversível. As opções de tratamento envolvem basicamente o tratamento conservador (fisioterapia, bloqueio das raízes nervosas) e estratégias cirúrgicas (excisão do disco e artrodese), que são eficazes apenas no alívio sintomático e podem realmente acelerar o processo degenerativo em níveis adjacentes (Acosta et al., 2005).

[0006] Estudos recentes demonstraram o potencial do tratamento com células-tronco para regenerar ou repovoar o DIV degenerado (Haufe et al., 2006; Orozco et al., 2011; Yoshikawa et al., 2010).

Fisiopatologia da Degeneração do Disco

[0007] A coluna vertebral humana é composta por 23 DIVs que separam as vértebras e proporcionam flexibilidade. Eles são responsáveis por 20 a 30% do comprimento da coluna vertebral e aumento de tamanho em progressão desde o colo do útero para a coluna lombar. Além disso, a flexibilidade do DIV tem a função de fornecer estabilidade e suporte de cargas durante o exercício.

[0008] A estrutura do DIV consiste, basicamente, em uma parte central, chamado núcleo pulposo (NP), proveniente da notocorda, que é cercado por derivados de um anel fibroso (AF) do tecido mesenquimal (Roughley, 2004). O NP é rico em proteoglicanos e água, enquanto que o AF é rico em colágeno, especialmente dos tipos I, II, VI e IX (Feng et al., 2006; Risbud et al., 2004).

[0009] A composição da DIV varia com o nível da coluna vertebral: o teor de colágeno no núcleo sendo maior nos discos cervicais e menor nos discos lombares, enquanto o teor de proteoglicanos mostra tendência contrária (Scott et al., 1994).

[0010] Nos NPs maduros, os agregados de proteoglicanos são importantes para reter água, visto que restringir o fluxo de água influencia a resposta do tecido a cargas na coluna (Feng et al., 2006). Com o envelhecimento, principalmente no núcleo, existe uma diminuição dos agregados de proteoglicanos e um aumento de agrecano não agregado, devido à degradação proteolítica (Jahnke et al., 1988; Johnstone et al., 1995). Assim, com a idade, a capacidade de resistir à carga de compressão diminui.

[0011] No anel fibroso, as fibras de colágeno são orientadas em camadas ao redor do NP. A função principal desta estrutura é a de reter o NP, retendo e distribuindo a carga exercida sobre este tecido durante vários tipos de exercício (Feng et al., 2006).

[0012] Durante a vida, muitas alterações ocorrem na composição da matriz extracelular, incluindo: perda notocordal celular, senescência das células mesenquimais, perda de vascularização e calcificação das placas vertebrais, que altera ou diminui a capacidade de síntese das células do disco (Roughley, 2004). A densidade celular nuclear diminui com a idade durante a vida, enquanto que a celularidade anelar atinge um patamar após a idade de 50 anos (Vernon-Roberts et al., 2008). A capacidade de rotatividade normal é prejudicada na matriz do disco e os produtos da degeneração se acumulam (Roughley, 2004).

[0013] A degeneração do DIV e suas alterações estruturais resultam deste catabolismo contínuo, ocorrendo na matriz extracelular e estando associadas à incapacidade de substituir fibras de colágeno danificadas e agrecano com novas moléculas durante a vida. O DIV parece incapaz de uma reparação intrínseca em adultos, mas a capacidade de indução de tais reparos biológicos é objetivo de muitos médicos (Guyer et al., 2003).

Medicina Regenerativa no Tratamento da Degeneração do Disco Intervertebral

[0014] Atualmente, as terapias cirúrgicas e não cirúrgicas para controlar a degeneração do DIV se concentram apenas no alívio dos sintomas. Nos últimos anos, como houve melhora na compreensão dos eventos celulares e moleculares envolvidos na degeneração do disco, a ideia de se manipular o

conteúdo celular do disco para alcançar um resultado benéfico tem crescido (Freemont et al., 2002).

[0015] Uma opção de tratamento é o uso de substâncias objetivando-se estimular as células do disco existente para aumentar a produção de proteoglicanos. No entanto, devido à acelularidade relativa do disco degenerado, pode não ser suficiente para se conseguir um bom resultado. Uma opção para esse problema consiste em introduzir nas células que sejam capazes de produzir a matriz apropriada nos discos degenerados, representando uma tentativa de recuperar as propriedades biomecânicas do disco (Acosta et al., 2005).

[0016] Nishimura et al. (1998) realizaram o transplante de tecido de NP autólogo em discos anucleados de rato, onde foi demonstrado que se retardou a progressão da degeneração (Nishimura et al., 1998). No entanto, esta fonte celular tem limitações práticas na clínica, devido à necessidade de danificar o disco adjacente, provavelmente induzindo degeneração neste nível. Em contraste, as células-tronco mesenquimais (CTMs) adultas são adquiridas por aspiração da medula óssea, e são mais capazes de se adaptar com sucesso ao meio ambiente do disco e, conseqüentemente, alcançar um estado diferenciado adequado para a síntese de matriz por um período maior (Acosta et al., 2005).

Características das células-tronco mesenquimais

[0017] As células-tronco mesenquimais (CTMs) são células multipotentes indiferenciadas que têm a capacidade de se diferenciar em uma série de tipos de células, incluindo células dos tecidos ósseo, cartilaginoso, adiposo, muscular e dos tendões, dependendo dos sinais fornecidos ao ambiente biológico.

[0018] Estabeleceu-se que a CTM pode ser inserida em vias condrogênicas ou talvez vias discogênicas, e são capazes de expressar agrecano e colágeno do tipo II em grandes quantidades (Anderson et al., 2005). Outra vantagem é o fato da CTM poder ser obtida a partir de muitas fontes, incluindo medula óssea e gordura, sem significativa morbidade ou resposta imunogênica, podendo ser facilmente expandida em culturas (Bartholomew et al., 2002).

Os estudos in vitro com células-tronco e Degeneração do disco

[0019] Sabe-se que as CTMs são capazes de se diferenciar em células do tipo condrócitos (Wakitani et al., 2002). Assim, devido ao fato do NP e dos condrócitos terem características semelhantes, é razoável assumir que as CTMs também podem ser capazes de se diferenciar em células do tipo NP (Horner et al., 1976; Gruber et al., 1997).

[0020] Risbud et al. (2004) demonstraram que CTM de ratos, quando expostas à hipoxia e fator de transformação do crescimento beta são capazes de se diferenciar em um fenótipo compatível com o do NP através da sinalização da proteína cinase ativada por mitógeno (Risbud et al., 2004).

[0021] Usando métodos diferentes, outros autores também demonstraram que as CTMs são capazes de se diferenciar em células semelhantes ao NP que poderiam ser utilizadas em terapias de engenharia de tecidos à base de células para regeneração do DIV (Yamamoto et al., 2004; Richardson et al., 2006; Vadala et al., 2008; Le Visage et al., 2006; Gruber et al., 2010; Sobajima et al., 2008; Svanvik et al., 2010; Yang et al., 2008).

[0022] Blanco et al. (2010) realizaram o isolamento e caracterização de CTMs a partir de disco humano degenerado. Eles verificaram que o NP degenerado contém CTMs e que estas células são extremamente semelhantes às encontradas na medula óssea. Estes achados sugerem que a DDD poderia ser tratada por terapia celular, injetando CTMs diferenciadas cultivadas em células similares ao NP, e estimulando as CTMs já presentes no NP (Blanco et al., 2010).

[0023] Uma das possibilidades para explicar por que alguns pacientes com DDD apresentam mais dor do que os outros é o desenvolvimento da inflamação intradiscal. Bertolo et al. (2011) estudaram o efeito imunossupressor das CTMs em fragmentos de DIV de pacientes com DDD. Eles verificaram que 70% dos pacientes tiveram uma redução na produção de IgG e que a proliferação de linfócitos do sangue periférico também foi diminuída quando CTMs estavam presentes (Bertolo et al., 2011). Este efeito na redução da inflamação mostra que o papel potencial das CTMs para DDD vai além da capacidade de repovoar o DIV.

Estudos experimentais com células-tronco e Degeneração do disco

[0024] Depois de demonstrar que CTM são capazes de se diferenciar em células de disco semelhantes ao NP, estudos *in vivo* eram necessários para avaliar a eficácia e segurança desta opção terapêutica em discos degenerados.

[0025] Crevensten et al. (2004) estudaram a viabilidade de CTMs injetadas em discos cocárdios de ratos, sendo que 14 dias após a injeção foi observada uma diminuição no número de CTMs marcadas com fluorescência. No entanto, 28 dias após a injeção, o número de CTM subiu para o número inicial de células com 100% de viabilidade (Crevensten et al., 2004).

[0026] Bendtsen et al. (2011) induziram a degeneração do disco em miniporcocos e injetaram hidrogéis sem CTM e hidrogéis carregados com CTM autóloga. Constataram, então, que a CTM e terapia hidrogel são capazes de regenerar parcialmente o DIV e manter a perfusão e permeabilidade da placa terminal vertebral e do osso subcondral (Bendtsen et al., 2011).

[0027] Outro autor realizou o transplante de CTMa humanas em miniporcocos com DDD e verificaram que as células sobreviveram no disco porcino durante pelo menos 6 meses e expressaram marcadores típicos de diferenciação de condrócitos, sugerindo diferenciação para células similares às do disco, o que demonstra a possibilidade de xenotransplante (Henriksson et al., 2009).

[0028] Alguns autores também relataram o aumento da altura do disco com o uso de CTM, em relação aos grupos controle (Yang et al., 2010; Feng et al., 2011; Sakai et al., 2006).

[0029] Os estudos *in vivo* realizados em ratos e miniporcocos foram capazes de demonstrar que as CTM são capazes de sobreviver e se diferenciar quando injetadas no DIV degenerado, além de ter potencial para restaurar sua função normal e sua estrutura. No entanto, estes resultados estão limitados pelos seus modelos de degeneração que desencadeiam rápida degeneração do DIV, que não são equivalentes à degeneração lenta que ocorre na degeneração do disco humano (Rousseau et al., 2007). Além disso, o disco da cauda de ratos e porcocos não é submetido à mesma carga estática e dinâmica que os discos humanos (Na

et al., 2006; Lotz et al., 2006).

Estudos clínicos com células-tronco e Degeneração do disco

[0030] Existem alguns estudos clínicos com células-tronco em DDD na literatura. Haufe e Mork (2006) não encontraram melhoria na parte inferior das costas, após um ano, em 10 pacientes com DDD submetidos à injeção de células-tronco hematopoiéticas obtidas a partir de precursores da medula óssea do paciente. No entanto, estes autores não executaram qualquer cultura ou expansão das células-tronco, antes da injeção. Além disso, eles também submeteram os pacientes a um curso de 2 semanas de terapia hiperbárica com oxigênio após a injeção das células (Haufe et al., 2006).

[0031] Yoshikawa et al. (2010) estudaram o efeito da CTM em dois pacientes com DDD, constatando que 2 anos após o procedimento inicial, os sintomas melhoraram em ambos os pacientes e os índices de pontuação na Escala Visual Analógica para dor lombar diminuíram 38% em um caso, e 18% no segundo paciente. Em ambos os pacientes, após 2 anos, radiografia e tomografia computadorizada confirmaram que o fenômeno de vácuo intervertebral melhorou (Yoshikawa et al., 2010).

[0032] Orozco et al. (2011) injetaram CTM autóloga em 10 pacientes com DDD confirmada, sendo que eles observaram que, após a injeção da CTM, o paciente teve uma rápida melhora na dor e incapacidade em 3 meses, seguido por uma melhora modesta no prazo de 6 a 12 meses após a injeção. Não parecia haver nenhuma melhoria na altura do disco. No entanto, o conteúdo de água do disco foi significativamente elevado após 12 meses. Este autor também apontou que os resultados são importantes, uma vez que a intervenção é mais simples, mais conservador, preserva a biomecânica normal e não necessita de cirurgia ou hospitalização do paciente (Orozco et al., 2011).

Protocolos de Cultivo de Células-tronco Mesenquimais Disponíveis Atualmente

[0033] Um ponto que merece destaque é a quantidade de células-tronco mesenquimais viáveis presentes em uma amostra de tecido degenerado, que é muito menor em comparação a um tecido sadio. Os processos para o cultivo de

CTM atualmente disponíveis são onerosos e trabalhosos, uma vez que envolvem etapas de dissociação mecânica e enzimática, que por muitas vezes tendem a destruir as células do tecido pela agressividade da ação das enzimas, diminuindo consideravelmente o rendimento do processo quando empregado no cultivo de células-tronco mesenquimais obtidas a partir de um tecido degenerado.

[0034] Somado ao fato de que o rendimento celular obtido é muito pequeno, o percentual de células-tronco mesenquimais devidamente caracterizadas reduz ainda mais este número. Estes fatores prejudicam a aplicação das CTM na Medicina Regenerativa para o tratamento, por exemplo, de Doenças Degenerativas do Disco Intervertebral.

[0035] O trabalho de Vadalà et al., 2008, descreve a metodologia atualmente empregada para o cultivo de CTM a partir de um tecido proveniente de disco intervertebral degenerado, sendo descrito a seguir.

[0036] Após retirada do disco intervertebral degenerado (DID), o mesmo é lavado por 3x em solução fisiológica esterilizada e colocado em meio de cultura DMEM/F12 suplementado com 10% SFB e 1% P/S (a escolha por esse meio pode variar de acordo com a literatura, sempre correlacionando com a maior quantidade de nutrientes).

[0037] O material é transportado para o Laboratório de Genômica, Proteômica e Reparo de DNA. No laboratório o DID passa por uma etapa de dissociação mecânica, onde o material é seccionado em duas etapas: uma mecânica, onde o mesmo é cortado em pequenas porções utilizando um bisturi de número 10, e outra enzimática, em que a dissociação ocorre através da atuação de enzimas. Sendo assim, o material é dissociado através da incubação por 2 horas com 0,2mg/mL de Pronase (Sigma-Aldrich) sob agitação em estufa umidificada a 37°C com 5% de CO₂. Após esse período o material é incubado ON com 1mg/mL de Collagenase Type IA (Sigma-Aldrich) também sob agitação em estufa umidificada a 37°C com 5% de CO₂.

[0038] É importante reportar que a literatura relata a dissociação utilizando uma ou mais enzimas e em concentrações variadas. Além disso, o tipo da Colagenase pode ser diferente na literatura.

[0039] Passado esse período as enzimas são inativadas com meio de cultivo DMEM/F12 suplementado com 10% de SFB e 1% de P/S. Nesse momento o material é colocado através de pipetas Pasteur esterilizadas para falcons passando por uma filtragem através de filtros adaptados aos tubos falcon de 40µm com membrana de nylon (para retirada dos *debris* teciduais). O material filtrado é centrifugado a 1200rpm durante 10 minutos. O precipitado é ressuspenso com 1mL de DMEM/F12 suplementado com 10% de SFB e 1% de P/S. Em seguida, as células obtidas são plaqueadas em 1 poço de uma placa de 24 poços com 0,02ng/µL de EGF (Epidermal Growth factor) e 0,02 ng/µL de FGF (Fibroblast Growth Factor) e a cultura é incubada em estufa umidificada a 37°C com 5% de CO₂.

[0040] A tentativa de estabelecimento de cultivo ocorre com a manutenção da cultura de 3 em 3 dias com adição de mais 500µL de meio DMEM/F12 suplementado com 10% de SFB e 1% de P/S e 0,02ng/µL de EGF (Epidermal Growth factor) e 0,02 ng/µL de FGF (Fibroblast Growth Factor).

[0041] Em suma, este processo de isolamento convencional de células-tronco do DID permite obter um cultivo por mais ou menos 8 meses, permitindo obter uma confluência de apenas 40% de 1 poço de uma placa de 24 poços (Figura 08 – A e B).

Busca patentária no escopo de cultivo de células-tronco

[0042] A busca na literatura patentária apontou alguns documentos do estado da técnica que serão descritos a seguir.

[0043] O documento PI0514387 “ISOLAMENTO, CULTIVO E USOS DE CÉLULAS-TRONCO/PROGENITORAS” revela um método para isolar células-tronco/progenitoras da membrana amniótica do cordão umbilical, compreendendo separar a membrana amniótica dos outros componentes do cordão umbilical *in vitro*, cultivar tecido de membrana amniótica sob condições

que permitem proliferação de célula e isolar as células-tronco/progenitoras das culturas de tecido. As células-tronco isoladas podem ter propriedades semelhantes às células-tronco embrionárias e podem ser usadas para vários propósitos terapêuticos.

[0044] O documento PI0706373 “USO DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS PARA O TRATAMENTO DE DOENÇAS E DISTÚRBIOS GENÉTICOS” revela um método de tratamento de uma doença ou um distúrbio genético, que compreende a administração de células-tronco mesenquimais em uma quantidade eficaz para tratar a doença ou o distúrbio genético no animal.

[0045] O documento PI0706070 “MÉTODO DE CULTIVO DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS” revela métodos de expandir células-tronco mesenquimais *ex vivo*, em que o método compreende: (a) semear células contendo as células-tronco mesenquimais num substrato de modo que uma baixa densidade de células-tronco mesenquimais fique aderida ao substrato; (b) cultivar as células-tronco mesenquimais no dito substrato; (c) remover as células-tronco mesenquimais expandidas a partir do substrato; (d) repicar as células-tronco mesenquimais removidas sobre o mesmo substrato ou um substrato diferente; e (e) repetir as etapas (b)-(d) até que o número pretendido de células-tronco mesenquimais expandidas seja atingido.

[0046] O documento PI0802241 “CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS E SEUS USOS” revela um método para o tratamento de doenças autoimunes, respostas alérgicas, câncer, doenças inflamatórias ou fibrose, sendo que o dito método promove cura de ferida, reparo de dano epitelial e angiogênese em um órgão ou tecido de um animal ao administrar células-tronco mesenquimais em uma quantidade eficaz.

[0047] O documento US 2013/108593 revela um sistema e um método para o transplante de células-tronco mesenquimais, em particular um sistema e um método para o transplante percutâneo autólogo de células auxiliares mesenquimais e progenitoras da medula óssea para discos intervertebrais degenerados ou articulações.

[0048] O documento US 2005/118228 revela materiais e métodos para aumentar e/ou reparar discos intervertebrais por meio de material de células-tronco.

[0049] A presente invenção apresenta inúmeras vantagens frente à literatura anteriormente citada, pois verificou-se que a substituição das etapas de dissociação mecânica e enzimática pela etapa de incubação do tecido *ex-vivo* degenerado em meio de cultura em material anti-aderente proporciona efeitos técnicos desejáveis para processos de cultivo de células-tronco mesenquimais adultas. As vantagens compreendem: obtenção de um número muito maior de células-tronco mesenquimais adultas em um período de tempo menor; redução nos custos do processo oriundos da dispensação da necessidade de aplicar enzimas no processo; metodologia simplificada e eficaz; redução na interferência de outros tipos celulares na cultura de células-tronco mesenquimais adultas à medida em que o processo aqui descrito permite a obtenção prevalente de células-tronco mesenquimais adultas, com alto poder de diferenciação e renovação celular; viabilização do emprego de células-tronco mesenquimais adultas na medicina regenerativa para o tratamento de patologias que envolvem por exemplo a degeneração do disco intervertebral.

[0050] Do que se depreende da literatura pesquisada, não foram encontrados documentos antecipando ou sugerindo os ensinamentos da presente invenção, de forma que a solução aqui proposta possui novidade e atividade inventiva frente ao estado da técnica.

[0051] Apesar de muitos avanços terem sido feitos e muitos modelos experimentais terem mostrado que CTMs são um ponto-chave na terapia celular e na medicina regenerativa, sua aplicação em larga escala na prática clínica é inviabilizada por conta dos processos de isolamento e cultivo de células-tronco mesenquimais adultas requererem tempo e investimentos elevados para atingir uma quantidade satisfatória de células-tronco mesenquimais adultas que surtam efeitos desejáveis na terapia celular.

[0052] Resta na técnica, então, a necessidade de um processo de cultivo de células-tronco mesenquimais adultas que resulte em um número maior de

células-tronco mesenquimais adultas, ao mesmo tempo em que não demande grande quantidade de amostra de tecido biológico.

Sumário da Invenção

[0053] A invenção aqui descrita apresenta, em um de seus aspectos, um processo de cultivo de células-tronco mesenquimais adultas provenientes de tecido degenerado que compreende as etapas de:

a) incubação de tecido *ex-vivo* degenerado em meio de cultura adequado em recipiente antiaderente;

b) isolamento das células-tronco mesenquimais adultas do meio obtido na etapa a); e

c) cultura das células-tronco mesenquimais adultas isoladas na etapa b).

[0054] Em uma realização preferencial, o tecido *ex-vivo* degenerado é proveniente de pelo menos um tecido escolhido do grupo que consiste em: disco intervertebral, tecido adiposo, medula óssea, perióstio, tecido muscular ou órgãos parenquimatosos.

[0055] Em uma realização mais preferencial, o tecido *ex-vivo* degenerado é proveniente preferencialmente de disco intervertebral, tecido adiposo ou medula óssea.

[0056] Em uma realização mais preferencial, o tecido *ex-vivo* degenerado é proveniente preferencialmente do disco intervertebral degenerado (DID).

[0057] Em uma realização preferencial, a etapa a) compreende um período mínimo de incubação em meio de cultura adequado até confluência de 80%.

[0058] Em uma realização preferencial, a etapa c) compreende cultura das células em meio de cultura adequado por um período de pelo menos 3 dias.

[0059] Em uma realização preferencial, o meio de cultura empregado em pelo menos uma das etapas a) e/ou c) é do tipo Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), suplementado com soro fetal bovino (SFB) em uma concentração que varia de 5% v/v a 15% v/v; e pelo menos um antibiótico escolhido do grupo que

consiste em: estreptomicina e penicilina , numa concentração que varia de 0,1% p/v a 2% p/v.

[0060] Em uma realização preferencial, o meio de cultura empregado em pelo menos uma das etapas a) e/ou b) é adicionalmente suplementado com pelo menos um fator de crescimento escolhido do grupo que consiste em: EGF e FGF, numa concentração que varia de 0,01ng/ μ L a 0,1ng/ μ L.

[0061] Em uma realização preferencial, o referido processo compreende adicionalmente a etapa d) de diferenciação das células-tronco mesenquimais adultas obtidas na etapa c) em células de tecido ósseo e/ou adiposo.

[0062] Em um outro aspecto, a presente invenção proporciona um kit para cultivo de células-tronco mesenquimais adultas provenientes de tecido degenerado, que compreende:

- a) recipiente de material antiaderente;
- b) meio de cultura adequado; e
- c) recipiente adequado ao cultivo celular.

[0063] Em uma realização preferencial, o kit compreende adicionalmente pelo menos um reagente contendo fatores de crescimento.

[0064] Em outro aspecto, a presente invenção proporciona uma composição que compreende células-tronco mesenquimais adultas obtidas por processo conforme definido anteriormente e veículo farmacêuticamente aceitável.

[0065] Em outro aspecto, a presente invenção proporciona o uso das células-tronco-mesenquimais adultas obtidas por processo conforme definido anteriormente, na fabricação de uma composição para a fabricação de uma composição para regeneração de tecidos biológicos.

[0066] Em uma realização preferencial, o tecido biológico é preferencialmente disco intervertebral degenerado, tecido adiposo ou medula óssea.

Breve Descrição das Figuras

[0067] Figura 1 - imagem do cultivo do disco intervertebral degenerado em placas de Petri com meio DMEM suplementado com 10% SFB e 1% de P/S acrescido de fatores de crescimento após 4 dias de cultivo (Aumento 10X).

[0068] Figura 2 - imagens do cultivo do disco intervertebral degenerado em placas de Petri com meio DMEM suplementado com 10% SFB e 1% de P/S acrescidos de fatores de crescimento como citado no texto acima. (A) e (B) mostram o cultivo de duas semanas com muitas células-tronco mesenquimais aderidas (Aumento de 4x). (C) mostra o cultivo após 1 semana; e (D) mostra o cultivo de duas semanas com muitas células-tronco mesenquimais aderidas com imagem do tecido. Embaixo do material biológico, o número de células aderidas é bem maior (Aumento 10X). Seta azul: células-tronco ainda não aderidas; Seta vermelha: células-tronco aderidas (com morfologia fibroblástica); Seta preta: material biológico (disco intervertebral degenerado).

[0069] Figura 3 - imagens do cultivo das células-tronco mesenquimais isoladas do disco intervertebral degenerado em garrafas (comprovação da aderência ao plástico e da característica fibroblástica típicas das células-tronco mesenquimais) (Aumento de 10X).

[0070] Figura 4 - imagens do cultivo do disco intervertebral degenerado após três dias do plaqueamento em garrafas (para que a cultura tivesse alta confluência celular para caracterização – cerca de 90%) (Aumento de 10X).

[0071] Figura 5 - resultados da citometria de fluxo obtidos.

[0072] Figura 6 - diferenciação das células-tronco mesenquimais obtidas do disco intervertebral degenerado para adipócitos corados com Oil Red O (Sigma-Aldrich). (A) e (B) demonstram células-tronco mesenquimais diferenciadas em adipócitos. (C) e (D) exprimem o controle negativo das células-tronco mesenquimais quanto à coloração (Aumento de 10X).

[0073] Figura 7 - diferenciação das células-tronco mesenquimais obtidas do disco intervertebral degenerado para osteócitos corados com Alizarin Red S (Sigma-Aldrich). (A) e (B) são células-tronco mesenquimais diferenciadas em osteócitos. (C) e (D) mostram o controle negativo das células-tronco mesenquimais quanto à coloração (Aumento de 10X).

[0074] Figura 8 - células isoladas pelo método convencional plaqueada em 1 poço de uma placa de 24 poços com meio DMEM/F12 suplementado com 10%

SFB e 1% de P/S. Em seguida, as células obtidas são plaqueadas em 1 poço de uma placa de 24 poços com 0,02ng/ μ L de EGF (Epidermal Growth Factor) e 0,02 ng/ μ L de FGF (Fibroblast Growth Factor). (A) consiste em célula isolada pelo método convencional em destaque, e (B) são células isoladas pelo método convencional com maior confluência obtida após 8 meses de manutenção do cultivo na mesma placa (Aumento de 20X).

Descrição Detalhada da Invenção

[0075] Conforme já previamente descrito, a presente invenção provê um processo de cultivo de células-tronco mesenquimais adultas que compreende as etapas de:

- a) incubação de tecido *ex-vivo* degenerado em meio de cultura;
- b) isolamento das células-tronco mesenquimais adultas do meio obtido na etapa a); e
- c) cultura das células-tronco mesenquimais adultas isoladas na etapa b).

[0076] Tal processo dispensa a aplicação das etapas de dissociação mecânica e enzimática, usualmente empregadas no estado da técnica, de forma que a obtenção de grande quantidade de células-tronco mesenquimais adultas para cultivo a partir de tecido *ex-vivo* degenerado é possível através das etapas a) e b). A incubação do dito tecido *ex-vivo* degenerado em meio de cultura promove a liberação das ditas células-tronco mesenquimais adultas do tecido degenerado para o meio de cultura em que o dito tecido está contido. Um tecido degenerado apresenta baixa quantidade de células viáveis, de modo que a modificação realizada nas etapas do processo resulta em efeitos técnicos desejáveis e superiores frente ao estado da técnica, que consistem na obtenção de uma quantidade muito superior de células a partir de uma pequena amostra, com grau de pureza muito maior em relação às técnicas usualmente empregadas.

[0077] A presente invenção também provê um kit para cultivo de células-tronco mesenquimais adultas provenientes de tecido degenerado, que compreende:

recipiente de material antiaderente; meio de cultura adequado; e recipiente adequado ao cultivo celular.

[0078] Em uma realização preferencial, o kit compreende adicionalmente pelo menos um reagente contendo fatores de crescimento.

[0079] Em outro aspecto, a presente invenção proporciona uma composição que compreende células-tronco mesenquimais adultas obtidas por processo conforme definido anteriormente e veículo farmacologicamente aceitável.

[0080] Em outro aspecto, a presente invenção proporciona o uso das células-tronco-mesenquimais adultas obtidas por processo conforme definido anteriormente, na fabricação de uma composição para a fabricação de uma composição para regeneração de tecidos biológicos.

[0081] Em uma realização preferencial, o tecido biológico é preferencialmente disco intervertebral degenerado, tecido adiposo, medula óssea ou cartilagem do joelho.

[0082] A seguir são definidos alguns dos termos que são apresentados ao longo do pedido de patente.

Células-tronco mesenquimais adultas (CTM)

[0083] No contexto do presente pedido de patente, o termo “células-tronco mesenquimais adultas (CTM)” deve ser entendido como células multipotentes indiferenciadas que têm a capacidade de se diferenciar em uma série de tipos de células, incluindo osso, cartilagem, gordura, músculos e tendões, dependendo dos sinais fornecidos ao ambiente biológico ou de cultura.

[0084] As CTMs utilizadas na presente invenção não têm qualquer limitação quanto a herança genética e/ou de sua origem. As CTMs estão presentes, por exemplo, em pequenas quantidades em regiões perivasculares de todos os tecidos adultos, incluindo o disco intervertebral, a medula óssea (MO), o tecido adiposo, o periósteo, o tecido muscular, os órgãos parenquimatosos, cordão umbilical, tecido sinovial, entre outros. Os marcadores característicos das CTMs incluem, mas não estão limitados a, SH2, SH3, SH4, CD10, CD13, CD29, CD44,

CD54, CD73, CD90, CD105 e CD166; sendo as CTMs negativas para os marcadores CD11b, CD14, CD19, CD31, CD34, CD38, CD40 ou CD45.

Tecido *ex-vivo* degenerado

[0085] No contexto do presente pedido de patente, a expressão “Tecido *ex-vivo* degenerado” deve ser entendida como a secção ou amostra de um tecido biológico, obtida por meio de método cirúrgico como por exemplo biopsia. A degeneração corresponde a mudanças na morfologia e composição do tecido que resultam em perda de função, celularidade e/ou integridade do tecido acometido. É importante ressaltar que o tecido *ex-vivo* degenerado não passa por nenhum processo de dissociação mecânica ou enzimática antes de ser submetido a etapa a) de incubação. Exemplos não limitantes de tecidos biológicos, em qualquer grau de degeneração, compatíveis com a realização da presente invenção consistem em: disco intervertebral, tecido adiposo, medula óssea, periósteo, tecido muscular e órgãos parenquimatosos.

[0086] Em uma realização preferencial, o tecido *ex-vivo* degenerado é proveniente de disco intervertebral degenerado.

Incubação de tecido *ex-vivo* degenerado

[0087] No contexto do presente pedido de patente, a expressão “Incubação de tecido *ex-vivo* degenerado” deve ser entendida como o acondicionamento do tecido *ex-vivo* degenerado em um recipiente contendo meio de cultura, em condições usuais, conhecidas no estado da técnica. Por “condições usuais de incubação” entende-se como as condições usualmente empregadas em incubação/cultivo de células-tronco mesenquimais, como por exemplo, estufa umidificada com 5% de CO₂, a 37°C.

[0088] Em uma realização preferencial, a incubação do tecido *ex-vivo* degenerado ocorre por um período de tempo compreender período mínimo de incubação em meio de cultura adequado até confluência de pelo menos 80%.

Recipiente de material antiaderente

[0089] No contexto do presente pedido de patente, o termo “recipiente de material antiaderente” deve ser entendido como sendo um recipiente adequado

à incubação do tecido *ex-vivo* degenerado que é desfavorável à aderência das células-tronco mesenquimais adultas, sendo essencialmente inerte e biologicamente inativo. O recipiente antiaderente deve permitir que as ditas células permaneçam em suspensão, contidas no meio de cultura empregado na etapa de incubação. Um exemplo não limitante de material antiaderente às células-tronco mesenquimais adultas de que o recipiente antiaderente pode ser feito é o vidro.

Meio de cultura adequado

[0090] No contexto do presente pedido de patente, o termo “meio de cultura adequado” deve ser entendido como um meio que fornece as substâncias essenciais para o crescimento celular, além de controlar o crescimento *in vitro* das culturas celulares de células-tronco mesenquimais adultas. Meios de cultura e os reagentes empregados na cultura de células são bem conhecidos na técnica.

[0091] Exemplos não limitantes de meios de cultura adequados para a incubação ou transporte de amostras de tecido *ex-vivo* degenerado incluem Meio de Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM), meio DMEM/F12.

[0092] Exemplos não limitantes de meios de cultura adequados para o cultivo de células-tronco mesenquimais adultas consistem em: meio Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM), meio DMEM/F12, meio RPMI. Os meios podem ser suplementados com soro fetal, assim como antibióticos, fatores de crescimento, aminoácidos, inibidores e semelhantes, usuais no estado da técnica.

Soro fetal

[0093] No contexto do presente pedido de patente, o termo “soro fetal” deve ser entendido como um fluido animal empregado com a função de suprir as necessidades das células em cultura por fatores de crescimento, hormônios, proteínas e peptídeos, nucleosídeos, lipídeos e inibidores. Exemplos não limitantes de soros fetais que podem ser empregados são: soro fetal de origem bovina, de cavalo e humano.

Fator de crescimento

[0094] No contexto do presente pedido de patente, o termo “fator de crescimento” deve ser entendido como substância capaz de estimular o crescimento, proliferação e/ou diferenciação celular. Exemplos de fatores de crescimento adequados ao cultivo de células-tronco mesenquimais adultas incluem, mas não se limitam a, EGF e FGF. Deve-se entender que os fatores de crescimento EGF e FGF foram utilizados na realização preferencial pelo fato de, baseado em experiências prévias do grupo de pesquisa, apresentar-se adequado para auxiliar cultivos de células-tronco mesenquimais. Além disso, ambos são coerentes para esse tipo de células (característica fibroblástica e epidérmica – elevada replicação celular).

[0095] Em uma realização preferencial, os fatores de crescimento são empregados numa concentração que varia de 0,01ng/μL a 0,1ng/μL.

Isolamento das células-tronco mesenquimais adultas

[0096] No contexto do presente pedido de patente, a expressão “isolamento das células-tronco mesenquimais adultas” deve ser entendida como a extração das células em suspensão no meio de cultura, resultantes da etapa a). O isolamento pode ser realizado, por exemplo, com o auxílio de uma pipeta Pasteur esterilizada, capaz de coletar uma alíquota do meio de cultura contendo as células-tronco mesenquimais adultas suspensas.

[0097] É importante ressaltar que, no contexto da presente invenção, a etapa de “isolamento das células-tronco mesenquimais adultas do meio obtido na etapa de incubação de tecido *ex-vivo* degenerado” não inclui qualquer procedimento de dissociação mecânica (como, por exemplo, cortes no tecido *ex-vivo* degenerado que foi incubado; centrifugação, entre outras) e/ou dissociação enzimática (utilização de enzimas, como por exemplo, colagenases).

[0098] A exclusão das etapas de dissociação mecânica e enzimática promove vantagens significativas no rendimento do processo de cultivo de células-tronco mesenquimais adultas obtidas a partir de tecido degenerado, uma vez que parte-se de um número muito restrito de células para obtenção de um número maior de células-tronco mesenquimais adultas, devidamente caracterizadas,

viabilizando a aplicação de terapia celular na recuperação de tecidos degenerados.

Cultura de células-tronco mesenquimais adultas

[0099] O termo “cultura” é bem conhecido na técnica, de modo que no entendimento da presente invenção, corresponde a incubação das células-tronco mesenquimais adultas isoladas em b) em meio de cultura, podendo o meio de cultura ser suplementado com soro fetal, assim como antibióticos e fatores de crescimento, em condições usuais de cultura. Por “condições usuais de cultura” entende-se como as condições usualmente empregadas em incubação/cultivo de células-tronco mesenquimais, como por exemplo, estufa umidificada com 5% de CO₂, a 37°C.

[0100] Em uma realização preferencial, a cultura ocorre por um período de pelo menos 3 dias. Em tempos de cultura superiores a 3 dias, o processo preferencialmente compreende a renovação do meio de cultura, que consiste na retirada do meio de cultura primeiramente empregado e adição de um meio de cultura novo.

Recipiente adequado ao cultivo celular

[0101] Recipientes adequados ao cultivo celular são bem conhecidos na técnica. Um exemplo não limitante de recipiente adequado ao cultivo de células-tronco mesenquimais adultas é um recipiente feito de material polimérico, como plástico.

Veículo farmacologicamente aceitável

[0102] No contexto do presente pedido de patente, o termo “veículo farmacologicamente aceitável” deve ser entendido como um veículo capaz de não alterar a viabilidade celular das células-tronco mesenquimais adultas obtidas pelo referido processo em uma composição.

Exemplo 1. Realização Preferencial

[0103] Os exemplos aqui mostrados têm o intuito somente de exemplificar uma das inúmeras maneiras de se realizar a invenção, contudo, sem limitar o escopo da mesma.

[0104] O método de isolamento de células-tronco mesenquimais adultas da presente invenção envolve o disco intervertebral degenerado (DID) de pacientes que sofrem de DDD. Tais discos são obtidos durante a cirurgia de coluna destes pacientes com DDD e com sintomas dolorosos e deficitários refratários ao tratamento clínico.

[0105] Uma vez retirado o DID, é realizada lavagem do mesmo em cuba com solução fisiológica esterilizada por 3 vezes e coletado em tubo Falcon contendo 15mL de meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium/Sigma-Aldrich) suplementado com 5-20% de Soro Fetal Bovino (SFB), preferencialmente 10% SFB, e 1% de Penicilina/Estreptomicina (P/S). Esse recipiente foi mantido a 37°C em estufa umidificada com 5% de CO₂ até o início da coleta no centro cirúrgico.

[0106] Todo DID é mantido em meio DMEM (suplementado com 5-20% SFB, preferencialmente 10% SFB, e 1% de P/S) e, em seguida, o material coletado foi armazenado em placa de Petri esterilizada. A esse material foram acrescentados 15mL de meio DMEM suplementado com 5-20% SFB, preferencialmente 10% SFB, 1% de P/S e fatores de crescimento nas concentrações de 0,02ng/μL (EGF e FGF- Sigma-Aldrich).

[0107] Posteriormente, este material foi incubado por pelo menos 4 dias em estufa umidificada a 37°C com 5% de CO₂. Após o dito período, a placa de Petri foi analisada utilizando microscópio invertido. Neste momento, se observou grande quantidade de células dispersas no meio de cultura (Figuras 1 e 2). Estas células foram plaqueadas em garrafas pequenas ou grandes para a obtenção de uma grande quantidade de células-tronco mesenquimais.

[0108] Nas garrafas pequenas, o plaqueamento ocorreu com adição de 1mL de meio DMEM, suplementado com 5-20% SFB, preferencialmente 10% SFB, e 1% de P/S, acrescido de 3mL do meio contendo as células que estavam na placa de Petri (garrafas pequenas), e fatores de crescimento nas concentrações de

0,02ng/ μ L (EGF e FGF- Sigma-Aldrich). Em seguida, essas garrafas foram incubadas por 3 dias em estufa umidificada a 37°C com 5% de CO₂.

[0109] Para as garrafas grandes, o plaqueamento ocorreu com a adição de 3mL de meio DMEM, suplementado com 5-20% SFB, preferencialmente 10% SFB, e 1% de P/S, com 9mL do meio com presença de células que estavam na placa de Petri, e fatores de crescimento nas concentrações de 0,02ng/ μ L (EGF e FGF- Sigma-Aldrich). Em seguida, as garrafas plaqueadas foram incubadas por 3 dias em estufa umidificada a 37°C com 5% de CO₂.

[0110] Após esse período de incubação, foi observada uma confluência de 80 a 90% de células-tronco nas garrafas de cultivo (Figuras 3 e 4). Assim sendo, após o tempo de 7 dias de retirada da amostra do paciente de DID, já pode-se obter uma aderência de inúmeras células fibroblásticas.

[0111] As mencionadas células-tronco mesenquimais possuem alta confluência celular, principalmente abaixo do tecido adicionado no cultivo em placa de Petri. No método convencional, este número de células seria alcançado somente após meses de cultivo, em confluências inferiores e com grande quantidade de *debris* teciduais.

[0112] É interessante e importante ressaltar que, na presente realização preferencial, a confluência estimada de 4 (quatro) dias para as células em suspensão é de 100 % e que, nesse período de tempo, não há nenhuma célula aderida.

[0113] Foi comprovado que as células isoladas do DID são células-tronco mesenquimais obtidas por uma técnica menos oneroso, extremamente mais rápida e com rendimento muito superior, segundo comprovado pelo artigo de Dominici et al., 2006 (Figuras 1-4), sendo que a confluência celular obtida foi de 80% após a incubação de 3 dias das garrafas, e 106 células foram caracterizadas pela expressão de antígenos de superfície específicos (Figura 5 e Tabela 1).

Tabela 1. Resultados da Citometria de Fluxo em relação aos antígenos de superfície específicos citados por Dominici et al., 2006

Anticorpo CD	Resultados obtidos	Dominici et al., 2006
CD11b	0,51 (Negativo)	Negativo
CD14	1,36 (Negativo)	Negativo
CD19	1,28 (Negativo)	Negativo
CD34	0,66 (Negativo)	Negativo
CD45	7,97 (Negativo)	Negativo
CD73	98,13 (Positivo)	Positivo
CD90	98,45 (Positivo)	Positivo
CD105	70,9 (Positivo)	Positivo
HLA DR	0,21 (Negativo)	Negativo

[0114] Dessa maneira, a caracterização celular foi realizada por FACScalibur (Becton Dickison Immunocytometry Systems, San Jose, USA) utilizando anticorpos citados por Dominici et al., 2006.

[0115] Os parâmetros das citometrias não foram descritos detalhadamente por seguirem os padrões convencionais de caracterização de células-tronco mesenquimais.

[0116] A diferenciação celular em dois tecidos diferenciados foi outra comprovação realizada no trabalho proposta por Dominici et al., 2006. Assim, as células-tronco mesenquimais foram diferenciadas para o tecido ósseo e adiposo. As células foram cultivadas em três diferentes condições de cultivo:

[0117] Meio controle: DMEM e 10% SFB e 1% de P/S.

[0118] Meio osteogênico: DMEM suplementado com 85mg/mL 2- fosfato L-ácido ascórbico (Wako Chemicals, Germany) e 5mM de b-glicerolfosfato (Sigma–Aldrich, Denmark).

[0119] Meio adipogênico: DMEM suplementado com 15% SFB e 1% P/S e 100 nM dexametasoma (Sigma–Aldrich, Denmark).

[0120] Cada condição de cultivo foi plaqueada em 8 poços de placas de 24 poços, para que a diferenciação e o controle pudessem ser avaliados em mais

que triplicata. Esse cultivo foi realizado durante 1 mês. E foi acrescentado meio nas células de 3 em 3 dias sem adição de fatores de crescimento. Após esse período os adipócitos e osteócitos foram devidamente corados para visualização da diferenciação (Figuras 6 e 7).

[0121] A coloração dos adipócitos ocorreu com a fixação das células por paraformaldeído 4% por 40 minutos, lavadas uma vez com PBS e coradas por 5 minutos com o corante Oil Red O (Sigma-Aldrich).

[0122] A coloração dos osteócitos, por sua vez, ocorreu com a lavagem (uma vez) do cultivo com PBS e adição do corante Alizarin Red S (Sigma-Aldrich) por 5 minutos, conforme protocolos já estabelecidos.

[0123] As imagens de diferenciação celular são válidas somente se houver identificação de células-tronco mesenquimais com coloração negativa, comprovando, dessa forma, um verdadeiro poder de diferenciação celular (Dominici et al., 2006).

[0124] Os versados na arte valorizarão os conhecimentos aqui apresentados e poderão reproduzir a invenção nas modalidades apresentadas e em outros variantes, abrangidos no escopo das reivindicações anexas.

Reivindicações

1. Processo de cultivo de células-tronco mesenquimais adultas provenientes de tecido degenerado **caracterizado por** compreender as etapas de:

a) incubação de tecido *ex-vivo* degenerado em um meio de cultura adequado em recipiente antiaderente até atingir confluência de pelo menos 80%, em que o tecido *ex-vivo* degenerado é incubado sem ter sofrido dissociação mecânica e/ou enzimática;

b) isolamento das células-tronco mesenquimais adultas do meio obtido na etapa a); e

c) cultura das células-tronco mesenquimais adultas isoladas na etapa b), em que o meio de cultura empregado em pelo menos uma das etapas a) e/ou b) ser adicionalmente suplementado com pelo menos um fator de crescimento escolhido do grupo que consiste em: EGF e FGF, numa concentração que varia de 0,01 ng/ μ L a 0,1 ng/ μ L

2. Processo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelo** tecido *ex-vivo* degenerado ser escolhido do grupo que consiste em: disco intervertebral, tecido adiposo, medula óssea, periósteo, tecido muscular ou órgãos parenquimatosos.

3. Processo, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, **caracterizado pelo** tecido *ex-vivo* degenerado ser proveniente de disco intervertebral, tecido adiposo ou medula óssea.

4. Processo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, **caracterizado pela** etapa c) compreender cultura das células em meio de cultura adequado por um período de pelo menos 3 dias.

5. Processo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, **caracterizado pelo** meio de cultura empregado em pelo menos uma das etapas a) e/ou c) ser do tipo Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), suplementado com soro fetal bovino (SFB) em uma concentração que varia de 5% v/v a 15%

v/v; e pelo menos um antibiótico escolhido do grupo que consiste em: estreptomicina ou penicilina , numa concentração que varia de 0,1% p/v a 5% p/v.

6. Processo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, **caracterizado por** compreender adicionalmente a etapa d) de diferenciação das células-tronco mesenquimais adultas obtidas na etapa c) em células de tecido ósseo e/ou adiposo.

FIGURAS

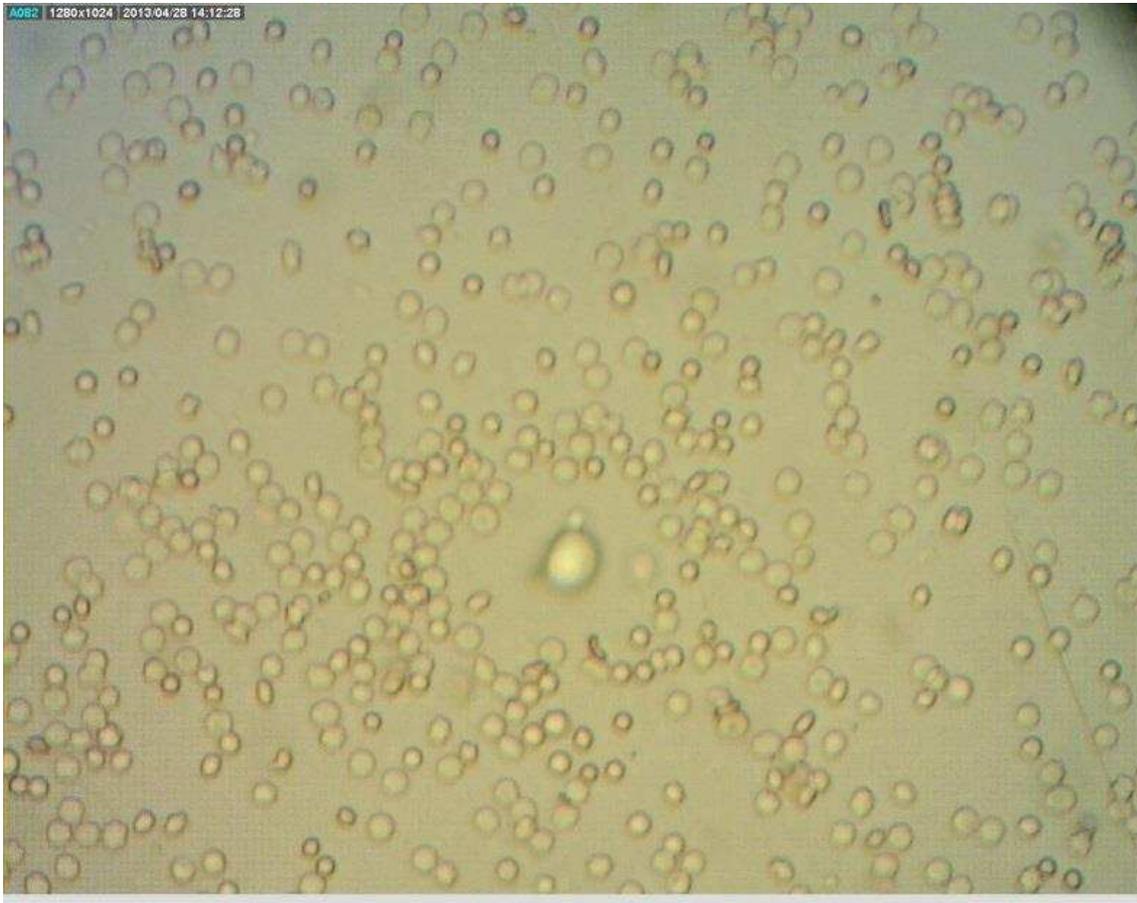


Figura 1

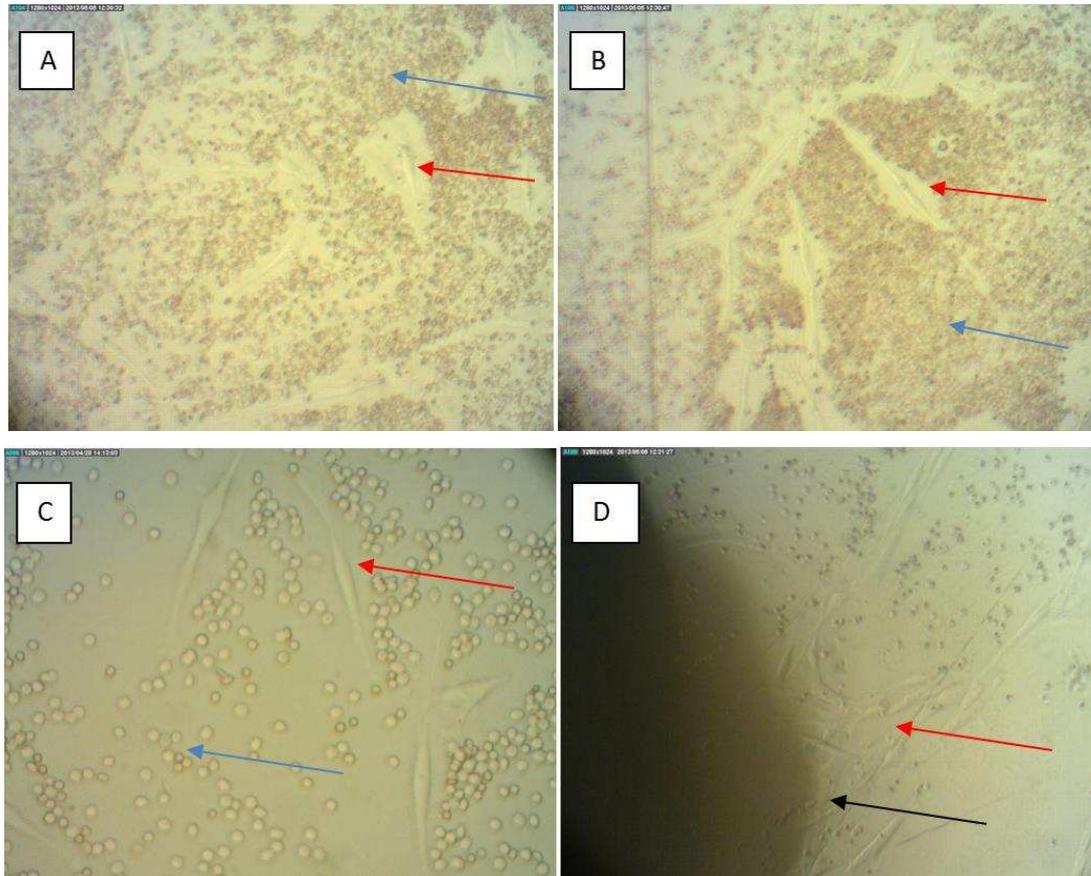


Figura 2

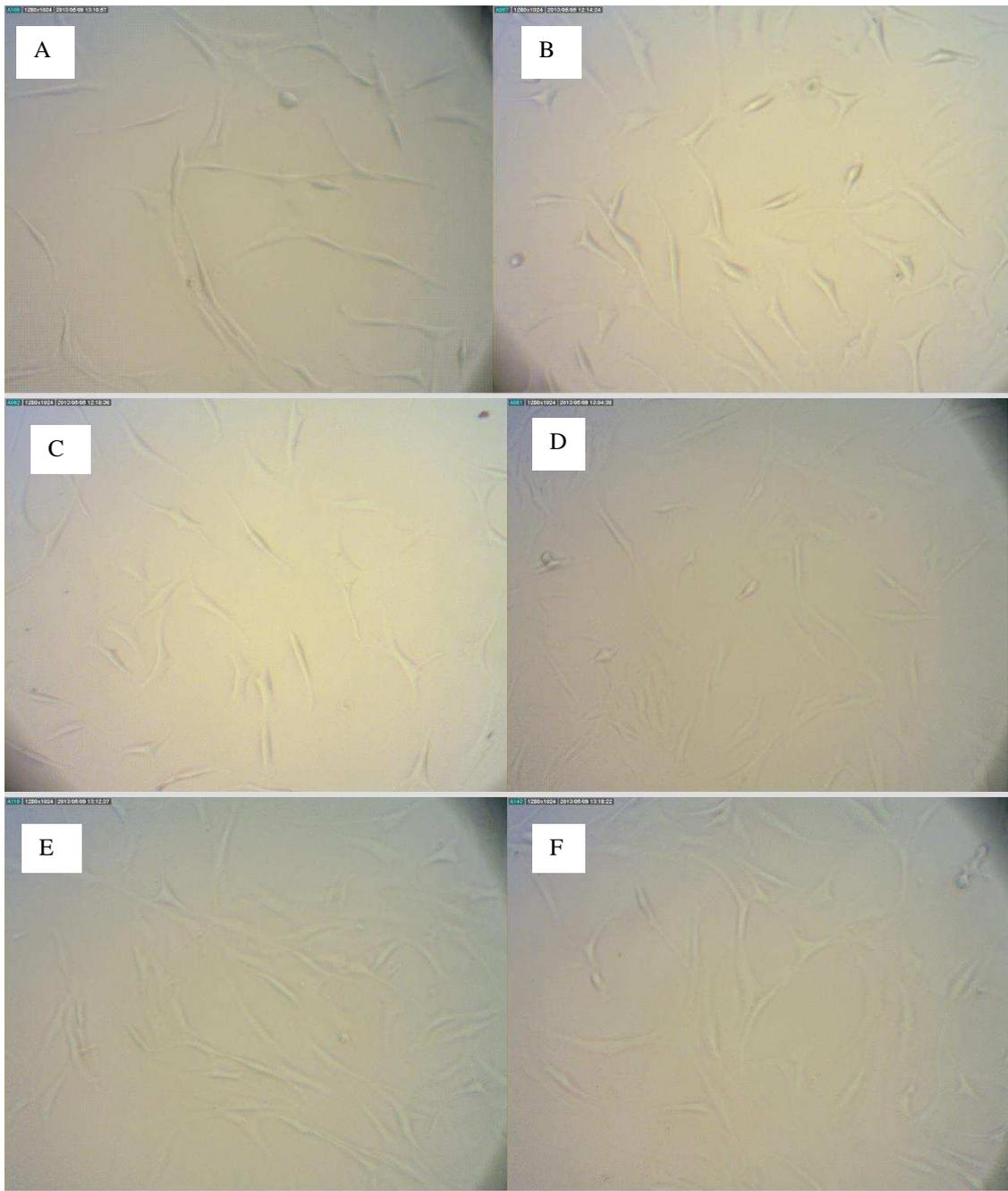


Figura 3

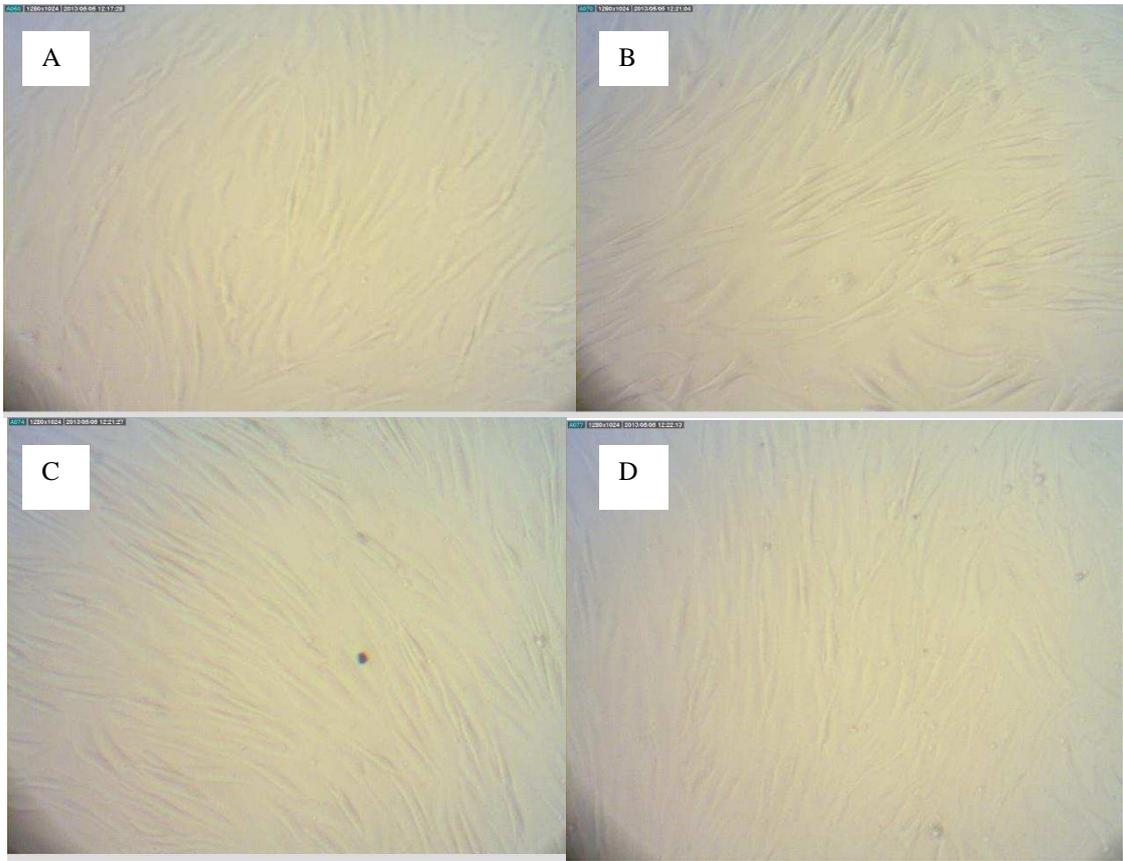


Figura 4

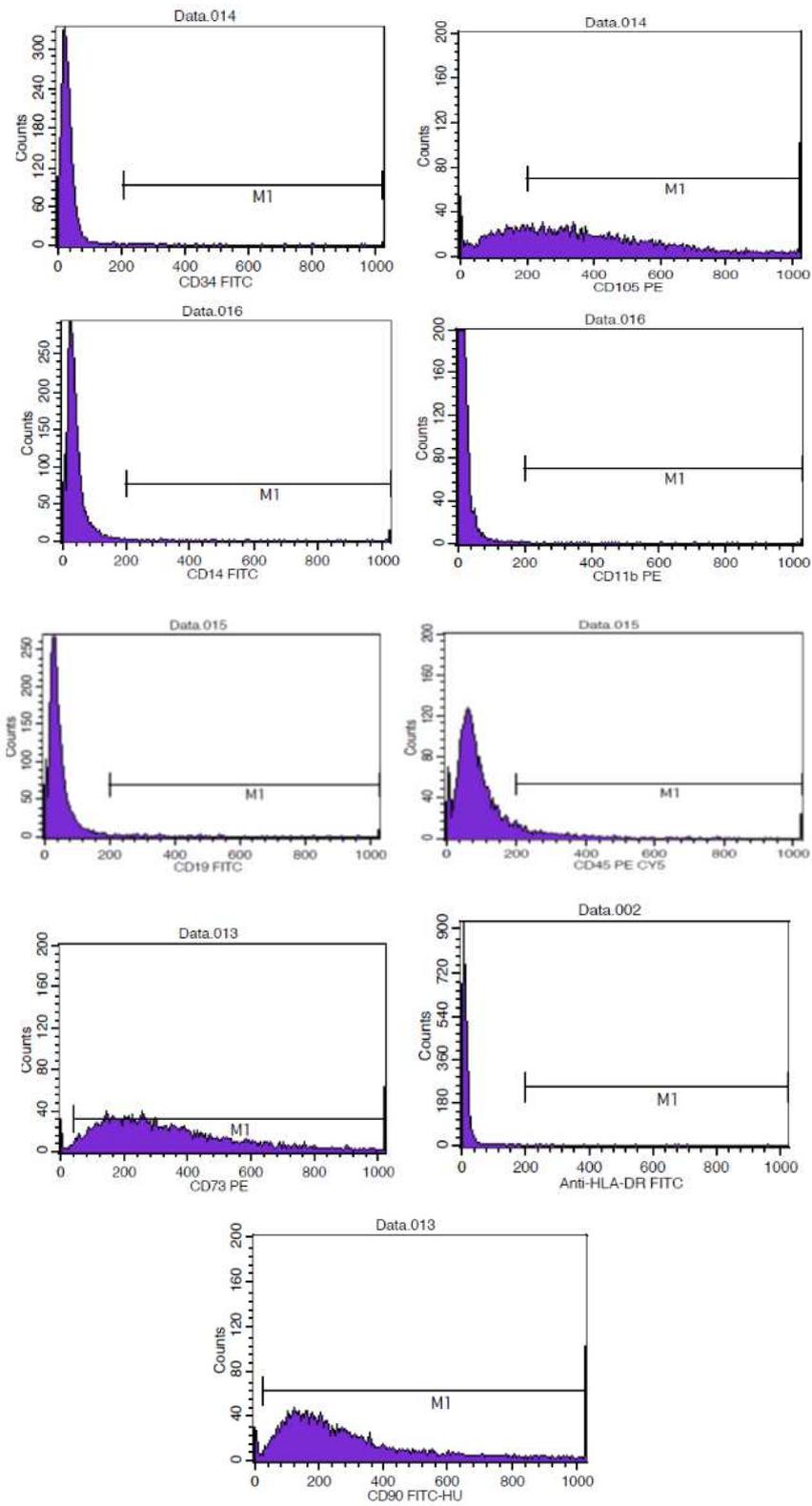


Figura 5

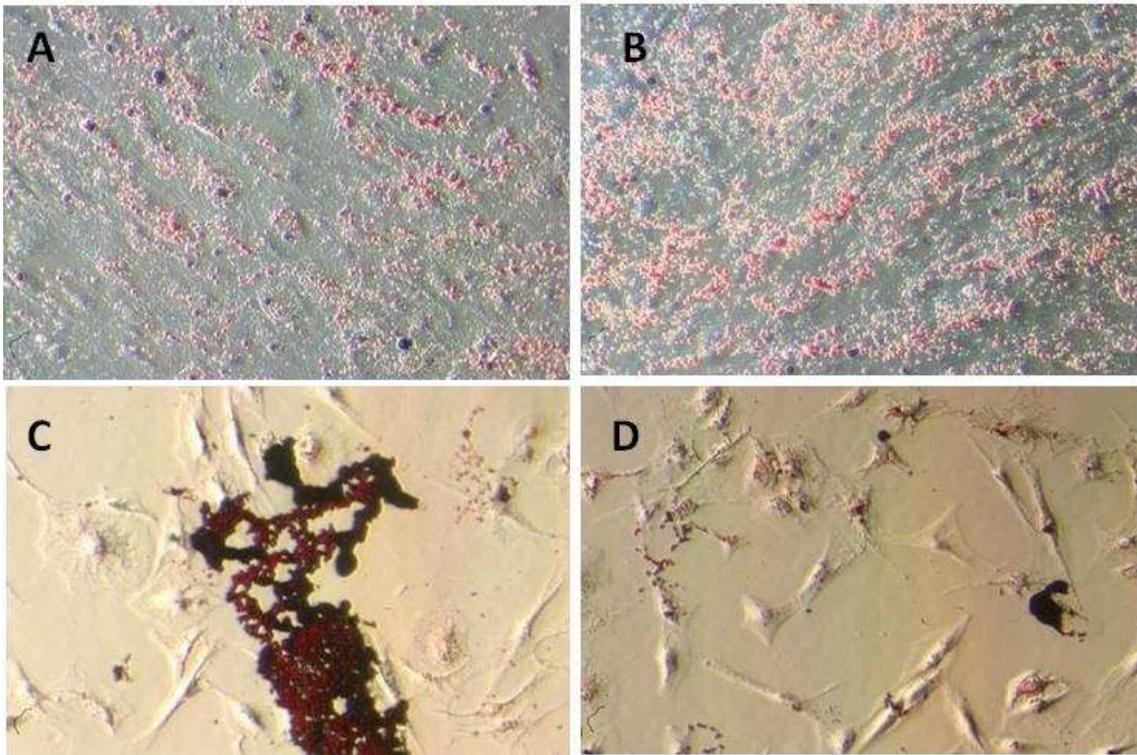


Figura 6

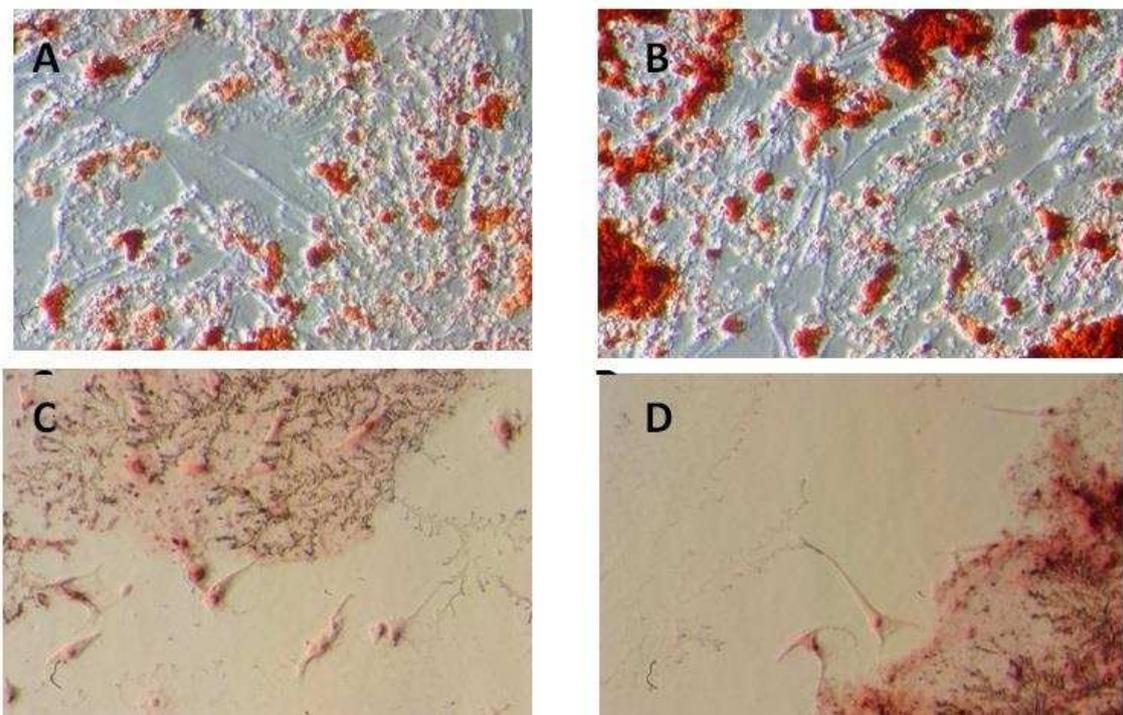


Figura 7



Figura 8