

Influência do protocolo laboratorial no rendimento *in vitro* de células-tronco mesenquimais

Influence of the laboratory protocol on the in yield of bone marrow mesenchymal stem cells

Raniere Fagundes de Melo Silveira¹, Leonardo Capistrano Ferreira², Fernanda Ginani³, Carlos Augusto Galvão Barboza³

¹Biomédico e Mestrando em Bioquímica – Universidade Federal do Rio Grande do Norte; ²Aluna de Graduação em Biomedicina – Universidade Federal do Rio Grande do Norte; ³Doutor em Patologia Bucal e Professor Adjunto da Disciplina de Embriologia, Departamento de Morfologia – Universidade Federal do Rio Grande do Norte; Natal, RN, Brasil

Resumo

Células-tronco mesenquimais apresentam excelentes características para o uso em terapia celular. Contudo, os protocolos de extração, manutenção e expansão dessas células ainda necessitam de uma padronização. A proposta do nosso trabalho foi avaliar a influência do período de pré-cultivo (PPC), tempo de tripsinização (TT) e adição de meio condicionado (IMC) com relação ao rendimento de uma cultura primária de células-tronco mesenquimais extraídas da medula óssea de camundongos. Nossos resultados mostram que os grupos de células cultivadas em PPC de 72 horas mostraram um melhor rendimento celular, quando comparadas às de PPC de 24 horas. O TT não apresentou diferença significativa entre 5 e 10 minutos, embora a viabilidade celular se mantivesse acima de 90% para os dois tempos avaliados. O meio condicionado adicionado à cultura primária parece não influenciar significativamente o rendimento celular. Concluímos que o uso de um PPC de 72 horas aumenta significativamente o número de células obtidas em cultura primária de medula óssea.

Palavras-chave: Células-tronco – Medula óssea – Técnicas de cultura.

Abstract

Mesenchymal stem cells show excellent characteristics for use in cell therapy. However, the extraction, maintenance and expansion protocols of these cells need to be standardized. The aim of this study was to assess the influence of the pre-culture period (PCP), trypsinization time (TT) and addition of conditioned medium (CM) on the yield of a primary culture of mesenchymal stem cells extracted from the bone marrow of mice. Our results show that the groups of cells cultivated for a PCP of 72 hours had better cell yield, compared to a PCP of 24 hours. The TT showed no significant difference between 5 and 10 minutes; however, cell viability remained above 90% for both times assessed. The conditioned medium added to the primary culture seems to have no significant influence on cell yield. We conclude that the use of a PCP of 72 hours significantly increases the number of cells obtained in a primary bone marrow culture.

Keywords: Stem cells – Bone marrow – Cell culture techniques.

INTRODUÇÃO

Atualmente, vem sendo observado um elevado número de pesquisas biomédicas que objetivam o uso de células-tronco (CT), principalmente no campo da terapia celular¹. Os resultados dessas pesquisas, como o conhecimento de que essas células têm a capacidade de autorrenovação, multiplicação e diferenciação em diversas linhagens², além de impressionante plasticidade³, têm aumentado ainda mais o interesse nesse tipo de célula.

As células-tronco mesenquimais foram isoladas pela primeira vez por Friedenstein, Chailakhjan e Lalykina no início da década 70, a partir de uma suspensão celular da medula óssea⁴. Esse tipo especial de célula-tronco adulta, encontrado na medula óssea, é denominado célula-tronco mesenquimal (CTM)⁵. A medula óssea é um reservatório de células-tronco/progenitoras de tecido mesenquimal e não apenas sítio

onde ocorre a hematopoese pós-natal¹. Na medula óssea, as células-tronco mesenquimais constituem uma pequena população celular⁵, embora possam ser expandidas com alta eficiência e induzidas a se diferenciarem em múltiplas linhagens em condições de cultura definidas.⁶

Numa cultura primária, o tempo transcorrido desde a extração das células até a primeira troca de meio, denominado, neste trabalho de período de pré-cultivo (PPC), e o tempo de atuação da tripsina (TT), no momento do subcultivo, são importantes fatores quando se busca um número maior de células numa cultura, isto é, um rendimento elevado⁷. As células-tronco mesenquimais da medula óssea expressam amplo espectro de citocinas e fatores de crescimento envolvidos diretamente na maturação do ambiente estromal, sendo um importante elemento regulador da hematopoese e de outros sistemas celulares presentes não apenas na medula, mas também em cultura.⁸

Estudos com cultura de células requerem uma população celular com fenótipo característico e, normalmente, um número elevado de células. Como a

Recebido em 18 de junho de 2009; revisado em 28 de dezembro de 2009
Address for correspondence: Dr. Carlos Augusto Galvão Barboza.
Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Campos
Universitário Lagoa Nova, CP 1575. 59072-970 Natal- RN – Brasil.
Tel.: (84) 3215-3431. E-mail: cbarboza@cb.ufrn.br

perda do fenótipo pode ser observada quando células diploides são cultivadas por muito tempo⁹, a avaliação do fenótipo, durante um longo cultivo (com subcultivos seriados), é fundamental para a seleção da população apropriada de células, para ser usada *in vitro* ou *in vivo*¹⁰. Contudo, durante muitos anos, a escolha de um procedimento particular e padronizado ao tipo celular específico e as condições de cultura foram empíricas¹¹. Esse é um assunto particularmente a ser considerado, tendo em vista a diversidade e multiplicidade de metodologias na literatura, o que traz dificuldades na interpretação e comparação dos resultados obtidos em investigações similares. Assim, buscar um protocolo padronizado, visando ao máximo rendimento celular com o menor número de passagens possível, mostra-se de extrema importância.

Este trabalho teve como objetivo padronizar um protocolo de expansão de células-tronco mesenquimais da medula óssea de camundongos, a fim de melhorar o rendimento dessas células em um cultivo primário. Foram avaliados: o período ideal de pré-cultivo das células extraídas da medula óssea; a influência do tempo de tripsina no momento do subcultivo; e a ação exercida por um meio condicionado no cultivo.

MATERIAIS E MÉTODOS

Extração da medula óssea de camundongos

Para o evento de extração das células da medula óssea, foram utilizados dois camundongos albinos machos Swiss, com dois meses de idade, procedentes do Laboratório de Cronobiologia do Departamento de Morfologia da UFRN. O trabalho foi repetido seis vezes, totalizando doze animais utilizados no trabalho, os quais foram mantidos em condições adequadas, seguindo-se as recomendações do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). As células da medula dos animais foram obtidas seguindo o procedimento descrito por Maniatopoulos, Sodek e Melcher¹² e cultivadas utilizando meio de cultura básico alfa-MEM com 50 mg/L de sulfato de gentamicina e 2 mg/L de anfotericina B (Cultilab, Brasil) e suplementado com 15% de soro fetal bovino – FBS (Cultilab, Brasil). Foram obtidas quatro placas iniciais de cultivo. Cada placa foi formada com a medula extraída de dois ossos (fêmur e tibia) do mesmo membro e do mesmo animal, constituindo-se, assim, a placa 1 e a placa 2 para um dos animais; e a placa 3 e a placa 4 para o outro animal. Utilizaram-se essas últimas placas, além do cultivo, para a obtenção do Meio Condicionado (MC) (Figura 1).

Preparo do meio condicionado

Após três dias de cultivo (72 horas), retirou-se aproximadamente 90% do meio das placas 3 e 4, que foi então centrifugado a 1200 rpm por 8 minutos, onde o sobrenadante, designado de Meio Condicionado (MC), foi coletado e então congelado a -20°C para uso posterior.

Cultivo das CTM

Com o decorrer dos procedimentos, avaliamos quais os melhores parâmetros estudados e, com isso, direcionamos nossa atenção aos grupos que apresentaram melhor rendimento celular (Figura 1). Dessa forma, desde a extração até o primeiro subcultivo, avaliamos o período de pré-cultivo (PPC) e o tempo de tripsinização (TT); e, do primeiro subcultivo até o segundo, analisamos a influência do meio condicionado (IMC) na cultura das células. O meio alfa-MEM (Cultilab, Brasil), com antibióticos e suplementado com 15% de soro fetal bovino (FBS), e o cultivo em estufa úmida à 37°C com 5% de CO₂ e 95% de ar foram às condições oferecidas à cultura das células.

As células procedentes do animal 1 foram analisadas como grupo 1, utilizando-se o tempo de pré-cultivo de 24 horas (Grupo 1, G1) e as células do animal 2, o grupo 2, utilizando o tempo de pré-cultivo de 72 horas (Grupo 2, G2). Logo após a extração da medula, a primeira troca de meio foi realizada, baseada nos respectivos tempos de pré-cultivo estudados (24 horas e 72 horas). A cada 3 ou 4 dias, o meio antigo era removido junto com as células não aderentes, e o mesmo volume de meio era adicionado. A cultura foi mantida por aproximadamente 7 dias, até alcançar confluência de 70 a 90%, quando então era subcultivada.

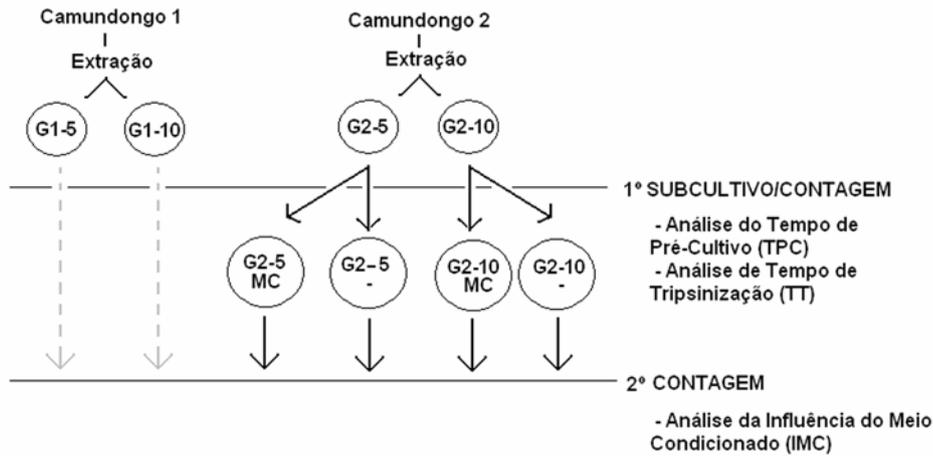
Como, em cada grupo (G1 e G2), havia duas placas de 60 mm, no momento do primeiro subcultivo, analisamos o TT de 5 e 10 minutos, respectivamente (G1-5, G2-5, G1-10 e G2-10). Como relatado anteriormente, após a contagem dos grupos, as placas com menor número de células eram descartadas, restando apenas duas placas para análise. As placas com melhor rendimento eram subcultivadas em outras duas placas, uma livre de Meio Condicionado e outra contendo 10% de Meio Condicionado, para assim avaliarmos a IMC. Ao atingir confluência de 70 a 90%, realizamos o segundo subcultivo e contagem celular das placas (Figura 1).

Subcultivo celular

No primeiro subcultivo, ao atingir 70 a 90% de confluência, o meio básico foi removido e então adicionado às placas 2 mL de tripsina/EDTA (0,25% de Tripsina contendo 1 mM de EDTA – Cultilab/Brasil). Em seguida, os grupos foram incubados nos seus respectivos tempos (5 e 10 minutos). A suspensão celular foi então colocada em um tubo cônico com o mesmo volume de meio alfa-MEM, suplementado com 20% de FBS, com o objetivo de inativar a tripsina. A suspensão foi centrifugada a 1200 rpm durante 8 minutos, sobrenadante retirado, as células ressuspensas em 1 mL, e então uma alíquota de 250 µl dessa suspensão foi separada para a contagem no hemocitômetro.

Após a contagem, os melhores grupos foram selecionados e finalmente passados para uma placa de seis poços de 35 mm. Na segunda contagem, o procedimento seguiu o mesmo padrão, considerando as

Figura 1. Desenho esquemático do experimento para cultivo e análise em progressão dos parâmetros estudados.



Nota: G1 = grupo de células do camundongo 1 cultivadas por 24h antes da primeira troca de meio; G2 = grupo de células do camundongo 2 cultivadas por 72h antes da primeira troca de meio; 5 ou 10 = indicam o tempo de tripsina usado; MC = Meio Condicionado; TPC = tempo de pré-cultivo; TT = tempo de tripsinização; IMC = influência do meio condicionado.

condições espaciais dos poços. Contudo, o tempo de tripsinização utilizado foi o julgado como melhor tempo na primeira passagem, de acordo com o número de células contadas no primeiro subcultivo.

Viabilidade e contagem celular

A viabilidade celular foi analisada com o uso do corante azul de tripan. A alíquota retirada para a contagem celular foi somada ao mesmo volume de azul de tripan e então realizada a contagem de células viáveis e não-viáveis. As células viáveis expulsam o corante do seu citoplasma e não são coradas, ao contrário das células mortas, na qual o corante permanece no interior da célula sendo então coradas de azul³. Para o cálculo do número de células viáveis, foi utilizada a seguinte equação matemática: $NCV \times D \times 10^4 / \#Q$, em que NCV = número de células viáveis contadas, D = diluição da amostra (2) e #Q = número de quadrantes na câmara de Neubauer usados para a contagem. Para a análise da porcentagem de viabilidade das células, o seguinte cálculo foi realizado: $V\% = (NCV / (NCV + NCNV)) \times 100$, em que V% = porcentagem de células viáveis e NCNV = número de células não-viáveis.

Análise estatística

Os resultados dos experimentos foram analisados estatisticamente pelo método de Mann Whitney.

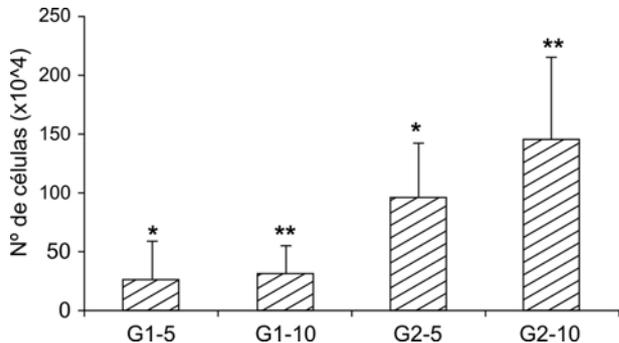
RESULTADOS

Período de pré-cultivo

De acordo com a análise das contagens celulares no primeiro subcultivo, foram obtidas, no G1-5, um número médio de $27,8 \times 10^4$ células/mL ($\pm 32,21$), o G1-10, $31,3 \times 10^4$ células/mL ($\pm 23,68$), o G2-5, $97,5 \times 10^4$ células/mL ($\pm 46,45$)

e o G2-10 $146,1 \times 10^4$ células/mL ($\pm 70,26$). O grupo 2 apresentou um maior número de células, caracterizando o período de pré-cultivo de 72 horas como o tempo com melhor avaliação (Figura 2).

Figura 2. Contagem de células do primeiro subcultivo.



Notas: - G1 = período de pré-cultivo de 24 horas; G2 = período de pré-cultivo de 72 horas; 5 = tempo de tripsinização de 5 minutos; 10 = tempo de tripsinização de 10 minutos. * $p = 0.026$; ** $p = 0.008$. - Mann Whitney test (n = 6).

Tempo de tripsinização

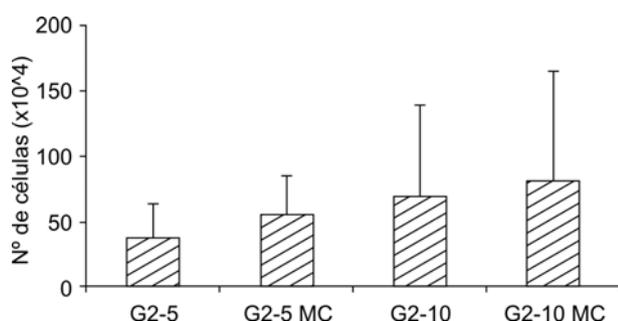
Os resultados obtidos com a contagem das células [G1-5 um número médio de $27,8 \times 10^4$ células/mL ($\pm 32,21$) com 99,20% de viabilidade celular; o G1-10, $31,3 \times 10^4$ células/mL ($\pm 23,68$) com 98,93% de viabilidade; o G2-5, $97,5 \times 10^4$ células/mL ($\pm 46,45$) com 98,07% de viabilidade; e o G2-10 com $146,1 \times 10^4$ células/mL ($\pm 70,26$) com 99,26% de viabilidade] apontam para o tempo de tripsinização de 10 minutos como o tempo com melhor avaliação, analisando-se, além do número de células, a viabilidade celular. Porém os números ainda são pouco conclusivos, visto que os números de células obtidas são próximos e

não apresentam significativa diferença estatística. (Figura 2).

Influência do meio condicionado

Com os resultados obtidos a partir da contagem das células [G1-5 um número de $22,5 \times 10^4$ células/mL ($\pm 14,30$) e 97,56% de viabilidade celular; o G1-5 MC, $45,1 \times 10^4$ células/mL ($\pm 27,64$) e 98,08% de viabilidade; o G2-10, $23,2 \times 10^4$ células/mL ($\pm 12,75$) com 96,23% de viabilidade; e o G2-10 MC, $39,7 \times 10^4$ células/mL ($\pm 28,22$) e com viabilidade de 97,85%], o meio condicionado parece não influenciar positivamente o rendimento dessas culturas, visto que, estatisticamente, não há diferença entre os grupos analisados (Figura 3).

Figura 3. Contagem de células do segundo subcultivo.



Notas: Essa contagem foi realizada de acordo com os melhores resultados da primeira contagem (Fig.2); o meio condicionado não influenciou rendimento do número de células obtidas na cultura; em todos os grupos o tempo de tripsinização foi de 10 minutos. MC = meio condicionado. Mann Whitney test ($n = 5$).

DISCUSSÃO

As células-tronco mesenquimais podem ser eficientemente cultivadas e expandidas *in vitro*, a partir, principalmente, da medula óssea. O potencial de expansão *in vitro* da CTM é variável, e algumas preparações de células crescem por mais de 20 ciclos de duplicação celular sem sinais de senescência, enquanto outras não suportam mais do que três ou quatro ciclos¹³. Além disso, há evidências de que a expansão se associa a uma redução do potencial de renovação dessas células¹⁰. Na clínica, um dos fatores limitantes para o transplante de células-tronco é o número de células precursoras empregadas no receptor. Além disso, diferentes protocolos de extração e expansão de células da medula apresentam rendimento e eficiência diferentes no uso da terapia celular para doenças¹⁴. Assim, uma maneira de tentar contornar esse problema é expandir a população dessas células-tronco *in vitro* de forma padronizada e, se possível, com o menor número de subcultivos possíveis. Dessa forma, as condições de cultivo são fundamentais para uma boa cultura celular.¹⁵

O isolamento de células mesenquimais com características de células-tronco é um procedimento que apresenta dificuldades. Parâmetros básicos, como volume e tempo de coleta dessas células, são focos de

estudos atualmente¹⁶. Um dos métodos de isolamento de células mesenquimais da medula óssea é baseado na sua capacidade de adesão ao plástico, e é utilizado como método padrão de isolamento desse tipo de célula¹⁷. Em cultura, as células-tronco mesenquimais apresentam uma morfologia fibroblastoide e são aderentes à placa de cultura. Durante o cultivo, as células não-aderentes, incluindo as hematopoéticas, são removidas, resultando numa cultura relativamente homogênea de CTM em diferentes graus de maturação. Numa cultura primária, o tempo desde a extração das células até a primeira troca de meio, denominado, neste trabalho, de período de pré-cultivo (PPC), é um fator determinante quando se busca um número maior de células na cultura.

A partir de alguns experimentos, ficou demonstrado que essas células, além de constituírem uma população celular rara da medula óssea e possuírem elevada capacidade replicativa, são clonogênicas, formam colônias de densidade e formato irregulares e são capazes de formar tecido ósseo *in vivo*, mesmo após terem sido extensivamente cultivadas *in vitro*, e que, ainda, não entram na fase S do ciclo celular antes de 60 horas de cultivo¹⁸. Comparando com o nosso trabalho, essa última afirmação atesta o baixo número de células do grupo 1 (G1), com apenas 24 horas de pré-cultivo e concretiza o melhor rendimento apresentado pelo grupo 2 (G2), com 72 horas de pré-cultivo. Além disso, o baixo índice de células no grupo 1 pode estar relacionado com o tempo necessário para as células aderirem ao plástico e formarem uma matriz de ancoragem, pois a formação da matriz influencia a sobrevivência e a proliferação dessas células.¹⁹

Levando em consideração a viabilidade celular da cultura, um ponto crítico em um cultivo de células é o tempo de atuação da tripsina (TT) no momento do subcultivo. Um tempo de tripsinização elevado poderia danificar a membrana da célula, podendo levar à morte celular o que diminuiria o rendimento da cultura⁷. Alguns trabalhos utilizam a tripsina com tempos que variam entre 2 a 5 minutos^{7,19}. Nosso trabalho mostrou que não há diferença estatisticamente significativa entre um tempo de tripsinização de 5 e 10 minutos com relação ao número de células obtidas no subcultivo. Contudo, a viabilidade desses cultivos foram todos acima de 90%, o que é considerado uma excelente porcentagem de viabilidade.

O trabalho de Caterson e colaboradores²⁰ enfatiza a importância do protocolo de isolamento, das condições de expansão e também a influência da suplementação do meio de cultivo com soro fetal bovino na manutenção e propagação de células mesenquimais progenitoras extraídas de medula óssea. As células-tronco mesenquimais da medula óssea expressam amplo espectro de citocinas e fatores de crescimento envolvidos diretamente na maturação do ambiente estromal, sendo um importante elemento regulador de sistemas celulares

presentes na medula ^{4, 19}. Esses fatores devem ser produzidos também em cultura e interagir diretamente com fatores presentes no meio de cultivo das células. Produzem, ainda, uma série de moléculas da matriz extracelular, incluindo a fibronectina, laminina, colágenos e proteoglicanos, influenciando a adesão, proliferação e diferenciação dessas células ¹⁸. Assim, um meio que contém um acúmulo de fatores de crescimento produzidos pelas células tem seu papel relevante numa cultura de células, pois propiciará um ambiente mais favorável à expansão dessas células. Nosso trabalho, entretanto, não evidencia uma influência positiva no rendimento celular dessas culturas, já que os resultados obtidos não mostram uma diferença significativa entre os grupos com e sem adição de meio condicionado.

CONCLUSÕES

De acordo com a análise dos resultados, a utilização de um tempo de pré-cultivo de 72 horas aumentará o rendimento celular em um cultivo de células mesenquimais extraídas da medula óssea de camundongos. O uso de um tempo de tripsinização no subcultivo de 5 ou 10 minutos à cultura das células mesenquimais parece não influenciar o rendimento celular na obtenção de um número maior de células no final da cultura, mesmo com uma alta porcentagem de viabilidade nessas culturas. Além disso, de acordo com os resultados em nosso trabalho, o acréscimo do meio condicionado não surtiu um efeito favorável ao aumento do número de células na cultura.

AGRADECIMENTOS

Projeto desenvolvido com apoio financeiro da Propesq/UFRN (PID758-2007) e do CNPq.

REFERÊNCIAS

- BITTENCOURT, R.A. de et al. Isolamento de células-tronco mesenquimais da medula óssea. **Acta Ortop. Bras.**, São Paulo, v.14, n.1, p.22-24, 2006.
- ANJOS-AFONSO, F.; BONNET, D. Isolation, culture, and differentiation potential of mouse marrow stromal cells. **Curr. Protoc. Stem Cell Biol.**, Hoboken, chapt.2,unit 2B.3, Oct. 2008.
- CANCEDDA, R. et al. Cell therapy for bone disease: a review of current status. **Stem Cells**, Dayton, v.21, n.5, p.610-619, 2003.
- FRIEDENSTEIN, A.J.; CHAILAKHJAN, R.K.; LALYKINA, K.S. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. **Cell Tissue Kinet.**, Oxford, v.3, n.4, p.393-403, Oct. 1970.
- KÖGLER, G. et al. A new human somatic stem cell from placental cord blood with intrinsic pluripotent differentiation potential. **J. Exp. Med.**, New York, v.200, n.2, p.123-135, July 2004.
- PROCKOP, D.J. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. **Science**, Washington, DC, v.276, n.5309, p.71-74, Apr. 1997.
- PRATA, K.L. **Efeito da quimioterapia em altas doses sobre as células-tronco mesenquimais humanas.** 2006. 200f. Dissertação (Mestrado)–Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2006
- COELHO, M.J.; CABRAL, A.T.; FERNANDES, M.H. Human bone cell cultures in biocompatibility testing. Part I: osteoblastic differentiation of serially passaged human bone marrow cells cultured in alpha-MEM and in DMEM. **Biomaterials**, Oxford, v.21, n.11, p.1087-1094, June 2000.
- HAYFLICK, L. The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. **Exp. Cell Res.**, Orlando, v.37, p.614-636, Mar. 1965.
- SCHMIDT, R.; KULBE, K.D. Long-term cultivation of human osteoblasts. **Bone Miner.**, Limerick, v.20, n.3, p.211-221, Mar. 1993.
- FRESHNEY, R.I. The culture environment: substrate, gas phase, medium and temperature. In: _____ **Culture of animal cells: a manual of basic technique.** 3rd.ed. New York: John Wiley and sons, 1994. p.71-101.
- MANIATOPOULOS, C.; SODEK, J.; MELCHER, A.H. Bone formation in vitro by stromal cells obtained from bone marrow of young adult rats. **Cell Tissue Res.**, Berlin, v.254, n.2, p.317-330, Nov. 1988.
- BRUDER, S.P.; JAISWAL, N.; HAYNESWORTH, S.E. Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation. **J. Cell Biochem.**, New York, v.64, n.2, p.278-294, Feb. 1997.
- SEEGER, F.H. et al. Cell isolation procedures matter: a comparison of different isolation protocols of bone marrow mononuclear cells used for cell therapy in patients with acute myocardial infarction. **Eur. Heart J.**, London, v.28, n.6, p.766-772, Mar. 2007.
- KASTEN, P. et al. Instant stem cell therapy: characterization and concentration of human mesenchymal stem cells in vitro. **Eur. Cell. Mater.**, Davos, v.16, p.47-55, Oct. 2008.
- BIEBACK, K. et al. Critical parameters for the isolation of mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. **Stem Cells**, Dayton, v.22, n.4, p.625-634, 2004.
- SUNG, J.H. et al. Isolation and characterization of mouse mesenchymal stem cells. **Transplant. Proc.**, New York, v.40, n.8, p.2649-2654, Oct. 2008.
- MORI, H. et al. Effects of heparin and its 6-O-and 2-O-desulfated derivatives with low anticoagulant activity on proliferation of human neural stem/progenitor cells. **J. Biosci. Bioeng.**, Osaka, v.100, n.1, p.54-61, July 2005.
- MANSO, M. et al. Testing biomaterials by the in-situ evaluation of cell response. **Biomol. Eng.**, Amsterdam, v.19, n.2/6, p.239-242, Aug. 2002.
- CATERSON, E.J. et al. Human marrow-derived mesenchymal progenitor cells: isolation, culture expansion, and analysis of differentiation. **Mol. Biotechnol.**, Totowa, v.20, n.3, p.245-256, Mar. 2002.