

## **Células-tronco mesenquimais da medula óssea de coelhos: isolamento, cultivo *in vitro* e perspectivas de utilização em lesões tendíneas**

Luiz Augusto de SOUZA<sup>1</sup>; Luiz Antônio Franco da SILVA<sup>2</sup>; Benito Juarez Nunes Alves de OLIVEIRA<sup>1</sup>; Aliny Pereira de LIMA<sup>3</sup>; Taís Andrade DIAS<sup>4</sup>; Flávia Duarte de JESUS<sup>5</sup>

<sup>1</sup> Doutorando. Escola de Veterinária e Zootecnia - UFG. [souza\\_vet@yahoo.com.br](mailto:souza_vet@yahoo.com.br)

<sup>2</sup> Professor Adjunto. Escola de Veterinária e Zootecnia - UFG.

<sup>3</sup> Doutoranda. Instituto de Ciências Biológicas - ICB/UFG.

<sup>4</sup> Mestranda. Escola de Veterinária e Zootecnia - UFG.

<sup>5</sup> Graduanda. Escola de Veterinária e Zootecnia - UFG.

Palavras-chave: Colágeno, MesenCult® humano, Tenectomia

### **INTRODUÇÃO**

A inovação científica e o potencial terapêutico das células-tronco (CT) derivadas de tecidos adultos às áreas médica e científica têm sido reportados há anos. Tais células estão envolvidas na renovação natural de tecidos e o seu potencial terapêutico baseia-se na capacidade de se transformar em várias outras linhagens celulares (NARDI & MEIRELLES, 2006).

Métodos convencionais de tratamento para traumas ocorridos no aparelho locomotor promovem resultados frustrantes quando considerados o tempo de cicatrização e a qualidade do tecido formado (HADDAD et al., 1997). Pesquisas recentes relacionadas ao traumatismo de tendão oferecem técnicas corretivas com associação da terapia celular com os biomateriais permitindo a obtenção de bons resultados em situações de alta complexidade (HUANG et al., 2006).

Sabe-se que as células-tronco revelam terapias potenciais para a medicina regenerativa que propõe que a utilização das células mesenquimais adultas resultam em regeneração de qualidade sem a formação de cicatrizes ou fibrose. Desse modo, a experimentação laboratorial envolvendo esses tipos de células está evoluindo, porém, são necessários estudos fundamentados e controlados sobre as diferentes fontes de CT e métodos de purificação para expansão em cultura que confirmem a contribuição desta terapia na qualidade da cicatrização (ZAGO & COVAS, 2004).

Portanto, tendo em vista a importância do aparelho locomotor e suas limitações relacionadas ao tratamento, optou-se pela realização deste estudo na expectativa de descrever os procedimentos para obtenção, isolamento e cultivo das células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea (MO) de coelhos e sua aplicação em lesões tendíneas iatrogênicas.

## MATERIAL E MÉTODOS

Após aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFG, sob o protocolo nº 134/11, foram selecionadas aleatoriamente 10 unidades experimentais para padronização da metodologia de isolamento e cultivo dentre 48 coelhos da raça Nova Zelândia. Estes fazem parte de um projeto de doutorado do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal de Goiás.

Os animais foram submetidos ao protocolo anestésico para realização da tricotomia e antisepsia da região escápulo-umeral. Com uma agulha metálica de Rosenthal 16 gauge, heparinizada e inserida na região do tubérculo umeral, foram aspirados 8,0ml de MO utilizando seringa de 10ml com 0,2ml de solução estéril heparinizada (5000U/ml).

Em capela de fluxo laminar, o aspirado foi dividido em quatro tubos Falcon estéreis de 15ml e diluídos em 2,0ml de solução salina tamponada (DPBS, Gibco® Invitrogen, São Paulo, SP, Brasil) acrescida de soro fetal bovino (SFB) a 10% e 10Mm EDTA (RoboSep, Stem Cell®, Vancouver, Canadá). Cada amostra foi adicionada sobre 2,0ml de solução Ficoll-paque® Plus (Amersham Biosciences, São Paulo, SP, Brasil). Em seguida, foram centrifugadas a 495 x g durante 30 minutos a 15°C e separadas em plasma, nuvem celular, Ficoll-paque® e células vermelhas.

As nuvens celulares foram transferidas para um único tubo Falcon que foi centrifugado a 385 x g durante 10 minutos a 4°C por duas vezes com 10,0ml de DPBS seguida de uma terceira centrifugação com MesenCult® suplementado com SFB a 10%. O meio foi desprezado e o sedimento celular resuspenso em 2,0ml do mesmo meio para determinação do rendimento e viabilidade celular em câmara hemocitométrica pela técnica de exclusão vital por azul de Tripán 4%.

A partir da fração mononuclear as células-tronco mesenquimais (CTMs) foram obtidas pela depleção negativa das células hematopoiéticas, utilizando o anticorpo monoclonal CD45 de camundongo anti-coelho, complexo tetramérico e nanopartículas magnéticas (EasySep, StemCell®, Vancouver, Canadá). Inicialmente, foi adicionado as células IgG1 de camundongo a 5%, permanecendo por cinco minutos. Em seguida, 20µL do anticorpo CD45 com repouso de 15 minutos e 20µL das nanopartículas magnéticas. A amostra foi acondicionada em tubo de poliestireno e acrescida de PBS suplementado com SFB e EDTA até o volume final de 2,5ml. Inserido na base magnética o tubo permaneceu por 10 minutos e em seguida foi vertido em um tubo Falcon onde foram depositadas as CTMs para nova contagem.

As CTMs isoladas foram inicialmente cultivadas em garrafas de cultura de 25cm<sup>3</sup> imersas em meio MesenCult<sup>®</sup> humano suplementado com SFB a 10%, gentamicina (25µg/ml) e anfotericina B (1µg/ml) mantidas em estufa a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>. Após 72 horas o meio foi removido e as células não aderentes descartadas, a cada três dias o meio era novamente removido. O crescimento foi avaliado em microscópio invertido até que atingissem 80 a 90% de confluência período em que foram subcultivadas em garrafas de 75 cm<sup>3</sup> após tratamento com tripsina/EDTA (0,25%) (Gibco-BRL). A concentração celular foi ajustada para 1,0x10<sup>5</sup> células em 200µl de meio Mesencult<sup>®</sup> para serem inoculadas nos defeitos tendíneos.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em relação ao local da aspiração da MO foi citado por GRINDEM et al. (2002) a crista ilíaca e o trocanter maior do fêmur. Optou-se pela colheita no tubérculo umeral devido à facilidade na obtenção do aspirado. Embora alguns estudos como o de MUSCHLER et al. (1997) não determinaram a necessidade e o volume adequado do anticoagulante, o volume utilizado neste estudo impediu a coagulação das amostras e não interferiu na viabilidade celular.

Com metodologia semelhante à de SOUZA (2009) foi possível isolar e quantificar as células da MO pelo gradiente de densidade Ficoll-paque<sup>®</sup>. No entanto, acredita-se que o rendimento e a viabilidade celular entre os animais variaram devido aos fatores intrínsecos e a técnica de manipulação (Tabela 1).

Tabela 1 – Rendimento e viabilidade da fração de células mononucleares e células-tronco mesenquimais isoladas da medula óssea de coelhos.

Amostras	Células mononucleares (CMNs)		Células-tronco mesenquimais (CTMs)	
	Rendimento (cél./mL) x 10 <sup>6</sup>	Viabilidade (%)	Rendimento (cél./mL x 10 <sup>6</sup> )	Viabilidade (%)
1	7,04	98,05	5,00	97,20
2	13,00	96,74	3,77	96,15
3	13,70	95,32	1,50	96,77
4	3,72	99,46	2,22	99,10
5	9,22	98,71	3,45	98,57
6	3,20	94,67	0,22	100
7	1,06	96,36	1,16	98,30
8	6,88	98,00	1,32	100
9	8,16	96,91	1,42	95,94
10	7,12	97,26	2,70	95,74
<b>Média</b>	7,31	97,15	2,28	97,77

Foi observado um rendimento médio de  $7,31$  e  $2,28 \times 10^6$  células/ml de CMNs e CTMs respectivamente, sendo que 30% do total das CMNs eram compostas por CTMs da MO, o que justifica o processo de isolamento por meio das nanopartículas magnéticas. Logo, a depleção negativa com o anticorpo monoclonal CD45 permitiu a separação das células-tronco hematopoiéticas das mesenquimais, sendo estas últimas adicionadas em meio MesenCult<sup>®</sup> para expansão celular.

Durante os primeiros ensaios para expansão das células observou-se contaminação do cultivo entre 24 e 72 horas após a semeadura. Depois de seguidas tentativas foi possível iniciar a expansão das CTMs. Com três dias de cultivo observaram-se células com características fibroblastóides e epitelióides aderidas no fundo da garrafa, bem como a formação de unidades formadoras de colônias fibroblásticas (Figura 1). Após as subdivisões houve predominância de células fibroblastóides e em alguns casos, presença de grandes células arredondadas e multinucleadas. ROMANOV et al. (2003) obtiveram as primeiras colônias aderentes somente após o quinto dia. Os resultados demonstraram que é possível obter as CTMs em um curto espaço de tempo usando o meio de cultura MesenCult<sup>®</sup>.

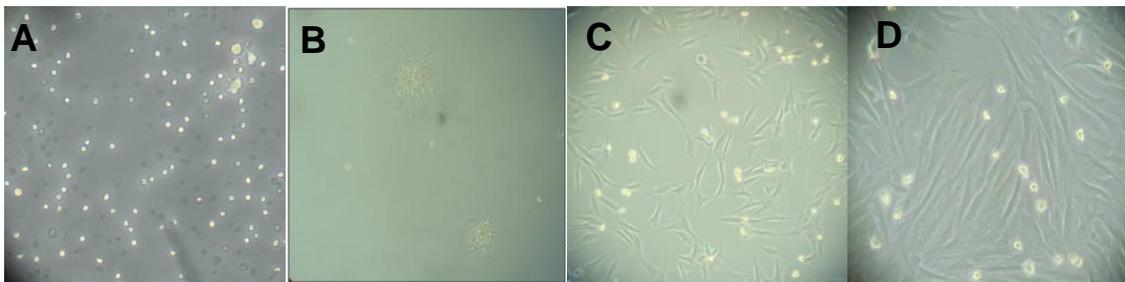


Figura 1. Fotomicrografia. Células-tronco mesenquimais aderentes provenientes da medula óssea de coelhos. Em (A) células-tronco mesenquimais no dia 0, (B) unidades formadoras de colônias fibroblásticas, (C) início de confluência das células fibroblastóides no 3<sup>o</sup> dia, (D) células fibroblastóides confluentes 10<sup>o</sup> dia. Aumento 200x

Após utilização de garrafas de 25 e 75cm<sup>3</sup> as amostras foram subcultivadas em garrafas de 150cm<sup>3</sup> fase em que já se encontravam entre a 4<sup>o</sup> e 7<sup>o</sup> passagem. Essas culturas foram submetidas a várias etapas de tripsinização e permaneceram em cultivo por longos períodos. Tais achados corroboram com os estudos de KAWASAKI-OYAMA et al. (2008) onde CMNs adquiridas do sangue do cordão umbilical permaneceram viáveis de dois a três meses em cultura.

Embora no presente estudo não tenham sido empregados marcadores específicos de CTMs e indução de diferenciação para confirmação da presença de CT, a proliferação celular observada é um indicativo da presença de células-tronco.

Pois células diferenciadas ou senescentes possuem tempo de vida limitado, caracterizado pela perda da capacidade de proliferação e alteração da morfologia, levando à estagnação da cultura o que justifica tal afirmação (BIEBACK et al., 2004).

## CONCLUSÕES

Os protocolos para isolamento de CMNs da MO por meio do gradiente de densidade Ficoll-paque® foi eficiente, assim como depleção negativa das células hematopoiéticas em base magnética para obtenção das CTMs. O cultivo dessas células em MesenCult® humano proporcionaram ambiente adequado para a expansão das CTMs da medula óssea de coelhos para posterior aplicação em lesões tendíneas. Os resultados são preliminares e a contribuição desta terapia na qualidade da cicatrização será observada futuramente.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BIEBACK K, KERN S, KLÜTER H, EICHLER H. Critical parameters for the isolation of mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. **Stem Cells**, Ohio v.22, n.4, p.625-634, 2004.
2. GRIDEM, C.B.; NEEL, J.A.; JUOPPERI, T.A. Cytology of bone marrow. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, Philadelphia, n.32, p.1313-1374, 2002.
3. HADDAD, J.L.; CHAVEZ-ABRAHAM, V.; CARRERA, J.; VILCHIS, J.; SASTRE, N. Microsurgical reconstruction of the Achilles tendon with a fascia lata flap. **Journal Reconstructive Microsurgery**, Washington, v.13, n.5, p. 309-312, 1997.
4. HUANG, H.; ZHAO, X.; CHEN, L.; XU, C.; YAO, X.; LU, Y.; DAI, L.; ZHANG M. Differentiation of human embryonic stem cells into smooth muscle cells in adherent monolayer culture. **Biochemical Biophysical Research Communication**, New York, v.351, n.2, p.321-327, 2006.
5. KAWASAKI-OYAMA, R.S.; BRAILE, D.M.; CALDAS, H.C.; LEAL, J.C.F.; GOLONIBERTOLLO, E.M.; PAVARINO-BERTELLI, E.C.; FILHO, M.A.; SANTOS, I. Cultivo de células mesenquimais do sangue de cordão umbilical com e sem uso do gradiente de densidade Ficoll-Paque. **Revista Brasileira de Cirurgia Cardiovascular** [online]. v.23, n.1, p.29-34, 2008.
6. MUSCHLER, G.V.; BOEHM, C.; EASLEY, K. Aspiration to obtain osteoblast progenitor cells from human bone marrow: the influence of aspiration volume. **Journal Bone Joint Surgery**, Massachusetts, v.79a, n.11, p.1699 -1709, 1997.
7. NARDI, N.B.; ALFONSO, Z.C. Células Tronco Hematopoiéticas. In: ZAGO, M.A.; COVAS, D.T. **Células Tronco, a nova fronteira da medicina**. São Paulo: Atheneu, 2006. p.49-65.
8. COVAS, D.T. **Células Tronco, a nova fronteira da medicina**. São Paulo: Atheneu, 2006. p.49-65.
9. ROMANOV, Y.A.; SVINTSITSKAYA, V.A.; SMIRNOV, V.N. Searching for alternative sources of postnatal human mesenchymal stem cells: candidate MSC-like Cells from umbilical cord. **Stem Cells**, Ohio. v.21, n.1, p.105-110, 2003.
10. SOUZA, L.A. **Enxerto osteocondral alógeno, associado à inoculação de células mononucleares autólogas da medula óssea no reparo do sulco troclear de coelhos**. 2008. 82f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia.
11. ZAGO, M.A.; COVAS, D.T. Pesquisas com células-tronco: aspectos científicos, éticos e sociais. In: SEMINÁRIO DO INSTITUTO FERNANDO HENRIQUE CARDOSO, 2004, São Paulo. **Anais...** São Paulo: Instituto Fernando Henrique Cardoso, 2004, 23 p.