

UNifeob		8º ENCONTRO ACADÊMICO DE PRODUÇÃO CIENTÍFICA - MEDICINA VETERINÁRIA		V ^{medicina} Vet ^{erária} Ná ^{ria} 20 ANOS unifeob
PESQUISA CONCLUÍDA	PESQUISA EM ANDAMENTO	RELATO DE CASO	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	

- 1 » Caracterização da morfologia externa de fetos de paca
- 2 » Análise comparativa do número de corpos de neurônios em área do córtex cerebral de diferentes raças de cães
- 3 » Estudo histológico da glândula pineal de *Nasua nasua* (Quati) empregando microscopia de luz
- 4 » Análise macroscópica do aparelho reprodutor masculino do ouriço-cacheiro (*Coendou villosus*)
- 5 » Características de células fibroblast-like derivados do cultivo do saco vitelino em diferentes períodos gestacionais
- 6 » Suspeita da produção de β -Lactamase de espectro estendido (ESBL) Enterobactérias isoladas em caso de mastite ambiental
- 7 » Qualidade do leite de acordo com a instrução normativa 51: Contagem de células somáticas em amostras de leite bovino
- 8 » Estudo da pluripotencialidade do fígado fetal canino nos diferentes períodos gestacionais
- 9 » Influência do estresse causado pela tosquia e aumento de peso ao nascer de cordeiros (*Ovis aries*) - Resultados parciais
- 10 » Morfologia e viabilidade de oócitos ovinos para produção de embriões em laboratório
- 11 » Avaliação do ganho de peso diário de cordeiros segundo o manejo de desmame
- 12 » Incidência de endoparasitoses em ovinos da raça Santa Inês em função do horário de pastejo
- 13 » Leucemia canina: Casos diagnosticados no período de 2003 a 2006
- 14 » Técnica para cateterização do espaço subaracnóideo em ovinos
- 15 » Avaliação da adaptação de ovelhas ao manejo de ordenha mecânica através do comportamento

CARACTERÍSTICAS DE CÉLULAS FIBROBLAST-LIKE DERIVADAS DO CULTIVO DO SACO VITELINO EM DIFERENTES PERÍODOS GESTACIONAIS¹

CRISTIANE VALVERDE WENCESLAU²; DANIELE DOS SANTOS MARTINS²; CARLOS EDUARDO AMBRÓSIO³; ANDRÉ LUIZ REZENDE FRANCIOLLI²; FERNANDA R. AGRESTE²; ADRIANA CAROPREZO MORINI²; JOÃO CARLOS MORINI JR.²; ANA FLÁVIA DE CARVALHO³; MARIA ANGÉLICA MIGLINO⁴

¹Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – Fapesp - Bolsa de Doutorado

²Pós-Graduandos da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP – FMVZ-USP. Av. Prof. Orlando Marques de Paiva, 87 – Butantã, Cidade Universitária – São Paulo, 05508-270.

³Professor do curso de Medicina Veterinária do Centro Universitário da Fundação de Ensino Octávio Bastos, São João da Boa Vista/SP.

⁴Professora Titular (FMVZ/USP) - Universidade de São Paulo, Cidade Universitária, São Paulo/SP.

RESUMO: Tendo como base os conhecimentos referentes à atividade eritropoiética da membrana vitelínica, a qual é considerada o primeiro sítio hematopoiético e vascular que surge nos mamíferos durante a organogênese, somados há função de suporte a eritropoiese efetuado pelas células-tronco mesenquimais, o presente trabalho visa verificar a expansão celular do saco vitelino através da técnica de explant, em vista aos nichos celulares encontrados no anexo fetal. Para o cultivo do saco vitelino foram utilizadas 5 cadelas com idades gestacionais de 30, 40 e 60 dias, foram conferidas através de ultra-sonografia e do Crown-Rump de cada feto de acordo com Evans & Sack (1979). As cadelas foram submetidas a ovariosalpingohisterectomia para a coleta do anexo fetal. Todo material foi coletado na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo-USP. O saco vitelino foi fragmentado manualmente (fragmentação mecânica), com auxílio de uma lâmina de bisturi até a obtenção de um homogeneizado dos fragmentos de tecidos e grupos celulares, que foram implantados na garrafa de cultivo de 5ml com o meio Eagle Dulbecco modificado-DMEM high com 10% soro fetal e estreptomicina e penicilina. As células foram incubadas a 38,5°C, a 100% de umidade e 5% de CO₂. A descrição morfológica do cultivo celular foi realizada periodicamente com auxílio do microscópio contraste de fase Nikon TS100. As células mantidas nestas condições cresceram sob forma de monocamada, com tipos celulares distintos fusiformes e células grandes com prolongamentos citoplasmáticos como fibroblast-like

PALAVRAS-CHAVE: saco vitelino, cultivo celular, fibroblast-like

INTRODUÇÃO

Castro-Malaspina realizaram muitos trabalhos na tentativa de isolar as células-tronco mesenquimais em cultivo utilizando soro, conseguindo resultados semelhantes com população de células-tronco

mesenquimais purificadas. Este avanço trouxe o entendimento e muitos esclarecimentos em relação à biologia destas células, porém, gerou diferentes terminologias para a aplicação deste tipo celular com capacidade de adesão e morfologia fibroblastoide, derivadas dos mais diversos tecidos (BAKSH et al., 2004).

De acordo com os estudos realizados pelos autores Guerreiro et al., (1997); Zanjani et al., (1993); Clapp et al., (1995); Tavian et al., (1999), durante a organogênese humana foi demonstrado a proliferação e diferenciação de progenitores de células-tronco hematopoiéticas, em diversos nichos como saco vitelino, região ventral da aorta, fígado fetal, timo, baço e medula óssea. Os precursores derivados do saco vitelino são responsáveis pela colonização e pelo desenvolvimento hematopoiético de outros tecidos, sendo seqüencialmente desenvolvidos no embrião e no feto como, por exemplo, no fígado, timo, baço, bursa de fábrício nas aves e medula óssea (MOORE and METCALF, 1970).

A função das células-tronco mesenquimais fetais em humanos ainda não foi bem esclarecida, no entanto ela exerce um papel no estabelecimento e na manutenção de células-tronco hematopoiéticas e de seus progenitores (CAMPNOLI, et al., 2001; O DONOGUE; FISK, 2004). Já, as células-tronco mesenquimais no organismo humano adulto, atuam como reservatórios de células reparativas através de sinais, como danos teciduais, fraturas, inflamações, necroses e tumores (PALERMO et al., 2005).

MATERIAL E MÉTODOS

Para o cultivo do saco vitelino foram utilizadas 5 cadelas com idades gestacionais de 30, 40 e 60 dias, no qual foram conferidas através de ultra-sonografia e confrontadas com o Crown-Rump de cada feto de acordo com a metodologia preconizada por Evans & Sack (1979). Depois de estabelecida a idade fetal média, os animais foram submetidos a ovariosalpingohisterectomia, para a coleta do anexo fetal. Todo material foi coletado na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo-USP. Os sacos vitelinos foram fragmentados manualmente (fragmentação mecânica), com auxílio de uma lâmina de bisturi até a obtenção de um homogeneizado dos fragmentos de tecidos e grupos celulares, sendo submetidos à lavagem com solução de Tampão Fosfato livre de Íons Ca^{+2} / Mg^{+2} (PBS-L). Os pequenos fragmentos foram implantados na garrafa de cultivo de 5ml com o meio Eagle Dulbecco modificado-DMEM high com 10% soro fetal e estreptomicina e penicilina. As células foram incubadas a 38,5°C, com umidade relativa próxima de 100% e atmosfera gasosa de 5% de CO_2 . Foi realizada a fotodocumentação periodicamente do cultivo celular com auxílio microscópio contraste de fase Nikon TS100.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir do *explant* do saco vitelino, com idades gestacionais aproximadas de 30, 40 e 60, dias houve o crescimento e expansão de células com características de *fibroblast-like* e com menor frequência de células com aparência epitelial. Morfologicamente estas células com característica fibroblastoide eram heterogêneas fenotipicamente, apresentando 2 formatos característicos: inicialmente elas são pequenas com formato alongado, fusiformes e citoplasma reduzido enquanto que o segundo tipo, apresentava prolongamentos citoplasmáticos bem maiores. Estes achados morfológicos são semelhantes com as características morfológicas das células de origem mesenquimal descritas por BANKS (1992) no organismo *in vivo*. O qual ressalta que a célula mesenquimatososa, é uma célula precursora da maioria das células do tecido conjuntivo, a qual apresentando uma forma estrelada ou fusiforme, com alta proporção núcleo citoplasma. Estas células são chamadas de células residentes, as quais incluem as células mesenquimatosas indiferenciadas, células reticulares, fibroblastos, macrófagos, pericitos, células adiposas e mastócitos (BANKS, 1992). COLTER et al. (2001) e PROCKOP et al. (2001) afirmam que as células mesenquimais maduras são freqüentemente mais nucleadas, porém, estes achados sugerem que este fato deve estar relacionado ao formato irregular do núcleo e não devido a possível presença de dois núcleos. Em nossos resultados as células fusiformes possuem o núcleo alongado e discreto e, as células com prolongamentos citoplasmáticos (células estreladas), apresentam um núcleo grande sendo facilmente identificado. Este último tipo celular assemelha-se morfolologicamente aos fibroblastos, sendo estas consideradas células diferenciadas, fato compatível com as descrições de COLTER et al. (2001) e PROCKOP et al. (2001). LEE et al. (1983), ao estudar a ultraestrutura do saco vitelino do cão, descreve que este é composto por 3 camadas: endoderma, mesoderma intermediário a estes o mesênquima. Os principais constituintes do mesênquima são vasos sanguíneos, ilhas sanguíneas, fibras, tecido conectivo ou conjuntivo e células do tecido conectivo. O autor ainda ressalta, que no interior das ilhas vasculares do saco há uma grande quantidade de eritrócitos, em vários estágios de desenvolvimento ou

maturação. Com base na organização morfológica e seus componentes celulares como relatado pelo autor e colaboradores, era esperado o crescimento de células de origem fibroblast-like em cultivo, pois o anexo embrionário é constituído por nichos de células tronco, que se encontram especificamente no interior das ilhas eritropoéticas, partindo de um precursor comum o hemangioblasto.

Outro fato que justifica o crescimento deste tipo celular é o meio de cultivo utilizado. Estas células em cultivo possuem capacidade de aderir ao plástico e expandir *in vitro* (PITTENGER et al., 1999). Uma das condições para sua expansão é a presença de soro fetal bovino, suas colônias são aderentes, com aparência fibroblástica (YOUNG et al., 2002). O meio de cultivo DMEM com 10% soro fetal contém poucos nutrientes além de ser considerado não seletivo, uma vez que as células com característica fibroblast-like ou com aparência fibroblastoide não são exigentes, crescem facilmente aderindo ao plástico expandindo-se formando colônias fibroblastoide assim como os mencionado pelos autores acima.

CONCLUSÃO

Com base nos resultados parciais, podemos concluir que é possível isolar células-tronco mesenquimais do tecido vitelínico nos diferentes períodos gestacionais, visto que, as células descritas em nossos resultados possuem características de fibroblast-like semelhantes ao encontrados nas células-tronco mesenquimais. Desta forma, se fazem necessários estudos detalhados como marcação celular e utilização de meios de cultivo específicos, para o estabelecimento e a manutenção da linhagem de células-tronco mesenquimais em cultura.

REFERENCIAS

- BANKS, W. J. **Histologia Veterinária Aplicada**. São Paulo: Manole, 1991. 629p
- BAKSH, SIALAASAD, KO, CHAN, NH. Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. **Cell Mol Med**. 2004 Jul-Sep; 8(3):301-16. Review.
- CAMPAGNOLI, CESARE; ROBERTS, IRENE A. G.; KUMAR, SALIESH; BENNETT, PHILLIP R.; BELLANTUONO, ILARIA; FISK, NICHOLAS M.. Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow. **Hematopoiesis**. n. 8, v. 98, 2001.
- CLAPP, DW.; FREIE, B.; LEE, WH.; ZHANG, YY. Molecular evidence that in situ-transduced fetal liver hematopoietic stem/progenitor cells give rise to medullary hematopoiesis in adult rats. **Blood**. v.86, p.2113-2122, 1995.
- COLTER, DC, SEKYA, I, PROCKOP, D.J. Isolation and characterization of rapidly self-renewing stem cells from cultures of human marrow stromal cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 2001 Jul 3;98(14):7841-5. Epub 2001 Jun 26
- EVANS, H. E. and SACK, W.O. Prenatal Development of Domestic and Laboratory Mammals: Growth Curves, External Features and Selected References. **Anat., Histol., Embryol.**, v.2, p.11-45, 1973.
- LEE, SUE.Y.; ANDERSON, JOHN, W.; SCOTT, GRAYSON L.; MOSSMAN, HARLAND W.. Ultrastructure of the Placenta and Fetal Membranes of the Dog: II The Yolk Sac. **The American Journal of Anatomy**, 166, 313-327, 1983.
- GUERRIERO, A; WOLFOLD, L.; HOLLAND, HK.; GUO, GR.; SHEEHAN, K; WALLER, EK.. Thrombopoietin is synthesized by bone marrow stromal cells. **Blood**. v.90, p.3444-3455, 1997.
- O' DONOUGUE, KEELIN; FISK, NICHOLAS M.. Fetal stem cells. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology**. V.18, n.6, p.853-875, 2004.
- MOORE and METCALF, 1970 Ontogeny of the hematopoietic system yolk sac origin of in vivo and in vitro colony forming cells in the developing mouse embryo. **Br. Journal Haematol**, março 18 (3), 279-96, 1970.
- PALERMO, AT.; LABARGE, M.A.; DOYONNAS, R. et al. Bone marrow contribution to skeletal muscle: a physiological response to stress. **Dev. Biol**. v. 279, n.2, p336-344, 2005.
- PITTENGER, MF; MACKAY, AM; BECK, SC; JAISWAL, N; DOUGLAS, R; MOSCA, JD et al.. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. **Science**. v.284, p.143-147, 1999.
- PROCKOP, D.J. COLTER, DC, SEKYA, I. Isolation and characterization of rapidly self-renewing stem cells from cultures of human marrow stromal cells. **Cytotherapy**; 3(5):393-6, 2001.
- TAVIAN, M.; HALLAIS, MF.; PEAULT, B. Emergence of intraembryonic hematopoietic precursors in the pre-liver human-embryo. **Development**. v.126 p.793-803, 1999.
- ZANJANI, ED.; ASCENSÃO, J.L.; TAVASSOLI, M.. Liver-derived fetal hematopoietic stem cells selectively and preferentially home to the fetal bone marrow. **Blood**. v.81, p 399-404, 1993.
- YOUNG, HE.; STEELE, TA.; BRAY, RA.; HUDSON, J.; FLOYD, JA.; HAWKINS, K. et al.. Human reserve pluripotent mesenchymal stem cells are present in the connective tissues of skeletal muscle and dermis derived from fetal, adult, and geriatric donors. **The Anatomical Record**, v 264, n.1, p.51-62, 2001.