

ESTABELECIMENTO DAS CONDIÇÕES DE ISOLAMENTO E CULTIVO DAS CELULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DA MEDULA ÓSSEA DE FETOS DE CÃES

JÉSSICA BORGHESI¹, LARA CAROLINA MARIO¹, ANA CAROLINA LANDENTIN MELLO², MARIA ANGÉLICA MIGLINO³, CARLOS EDUARDO AMBRÓSIO⁴, DANIELE MARTINS⁴, ANA FLÁVIA DE CARVALHO⁵, CRISTIANE VALVERDE WENCESLAU⁵

¹ Graduanda da UNIFEOB, São João da Boa Vista/SP

² Graduanda da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia-USP

³ Docente da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia-USP

⁴ Docente da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, USP

⁵ Docente da UNIFEOB, São João da Boa Vista/SP

RESUMO: As células-tronco mesenquimais (CTM) são progenitores multipotentes que podem se diferenciar em múltiplas linhagens diferenciadas terminais, incluindo tecidos ósseos, cartilagosos, musculares, nervosos, adiposos e células estromais da medula *in vivo* e *in vitro*. Estas células são além de serem isoladas a partir da medula óssea adulta podem ser isoladas da medula óssea fetal. No entanto, há pouco estudo referente à técnica de isolamento das CTM da medula óssea fetal. Desta forma, o trabalho propôs isolar CTM a partir de fetos caninos com base na metodologia estabelecida para a obtenção de CTM a partir da medula óssea adulta de humanos. Para isto foram utilizados 12 úteros de cadelas prenhes para a coleta do aspirado medular a partir do osso fêmur. O meio de cultivo de eleição foi o alfa-MEM e 15% de soro fetal bovino o qual propiciou o isolamento de CTM-CD44 positivas.

PALAVRAS-CHAVE: célula-tronco mesenquimais, cultivo celular, feto de cães, medula óssea

INTRODUÇÃO

As células-tronco (CT) podem ser classificadas em três categorias de acordo com o período de isolamento durante a ontogênese: embrionária, fetal e adulta. Dentre estas categorias destacam-se as CT isoladas do feto por apresentarem amplo potencial de diferenciação maior que as CT adultas e não apresentarem questionamento ético quanto sua utilização. Estas células diferem das demais células do organismo por apresentarem três características: são indiferenciadas e não-especializadas; são capazes de se multiplicar por longos períodos mantendo-se indiferenciadas de forma que um pequeno número pode originar uma grande população de células semelhantes; e são capazes de se diferenciar em células especializadas de um tecido em particular (ZAGO e COVAS, 2004; GAGE, 2000).

As CT diferem principalmente quanto à plasticidade ou potencia, podendo ser hierarquicamente classificadas como: totipotente (aquelas que se diferenciam em todas as células do organismo, incluindo placenta e os anexos placentários); pluripotente (diferenciam em células dos três folhetos germinativos); multipotente (diferenciam em mais de um tipo celular, porém não necessariamente em todos os tipos celulares de uma dada camada germinativa) e as CT unipotente (aquelas que diferenciam somente em um tipo celular, como por exemplo músculo e neurônio) (ABDULRAZZAK et al., 2010).

As CTM enquadram na categoria de CT multipotente, estas células são isoladas dos mais diversos tipos de tecidos do organismo fetal e adulto (HAYNESWORTH et al., 1992). As CTM foram primeiramente isoladas a partir da medula óssea adulta por Friendenstein (1970) sendo classificadas como precursores fibroblásticos da medula óssea. A partir daí, Caplan (1991), Pittenger et al., (1999) e Colter (2000) purificaram, expandiram e caracterizaram estas células sendo definidas pelos autores como CTM. Características das CTM incluem morfologia fibroblastoide *in vitro*, alta capacidade de expansão e capacidade de diferenciar em diversos tecidos mesodermiais como: fibroblastos, osteoblastos, adipócitos e condrócitos (DEANS e MOSELEY, 2000).

As CTM são as CT mais estudadas nas pesquisas com CT por serem facilmente obtidas e não possuir questionamento ético quanto sua utilização nas pesquisas com CT. No entanto, pouco se sabe sobre o isolamento de CTM a partir dos tecidos fetais, em particular a medula óssea

fetal. Desta forma, o estabelecimento de condições para o isolamento, bem como a idade fetal adequada, para o isolamento de CTM de cães fornecerá resultados que podem ser aplicados com segurança para humanos uma vez que, que o cão apresenta semelhança morfológica e fisiológica aos humanos quando comparados com os demais modelos experimentais (camundongos e ratos).

O presente trabalho visa isolar e expandir *in vitro* CTM a partir da medula óssea de fetos caninos, com base nos protocolos já estabelecidos para o isolamento de CTM de medula óssea adulta de humanos e camundongos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizados 12 úteros oriundos de campanhas de castração do Centro de Controle de Zoonoses da cidade de São Paulo. Os fetos tinham gestacional entre 40 a 60 dias de gestação. As idades foram determinadas através da técnica de *Crow-rump* (EVANS E SACK, 1963). A coleta de medula óssea canina deu-se a partir do osso fêmur, através da lavagem do canal medular, com auxílio de uma seringa de 3-ml e agulhas 25X7. Após, as células foram submetidas a protocolo de separação de células mononucleares com o auxílio Ficoll-Paquetm Plus, seguida do plaqueamento em placas de cultivo com os meios de cultivo alfa-MEM suplementado com 15 % de SFB e 1% Estreptomicina/Penicilina. Estas células foram incubadas a uma temperatura de 37,0 °C, com umidade relativa próxima de 100% e atmosfera gasosa de 5% de CO₂. Após o isolamento as células foram expandidas e avaliadas morfológicamente através do microscópio invertido NIKON ECLIPSE TS100 e caracterizadas fenotipicamente através de marcadores de CTM (CD117, CD44, CD90 e CD29 e de células-tronco hematopoéticas e endoteliais como CD31, CD13, CD45 e CD14 através da técnica de citometria de fluxo (CAPLAN, 1991; KOLF et al., 2007).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ao analisar o cultivo celular das células mononucleares aderentes da medula óssea de fetos caninos, constatamos que é possível isolar e expandir células com características similares as CTM a partir da medula óssea fetos caninos com 60 dias de gestação. Amostras da medula óssea com 40 e 50 dias de gestação não foram eficientes para o isolamento de CTM. Isto pode ser justificado, pois os nichos de CT nos tecidos fetais são transitórios. As CT nos tecidos fetais possuem características específicas que são dependentes do tecido de origem e período gestacional, que foram isoladas (WENCESLAU et al., 2011). O que indica um alto nível de heterogeneidade dentro de um *pool* de CT nos tecidos fetais. Desta forma, confirmamos a existência CTM na medula óssea fetal no período aproximado de 60 dias de gestação de fetos de cães, enquanto que para humanos e camundongos o período de isolamento corresponde ao primeiro trimestre de gestação (ZANJANI et al., 1993; CLAPP et al., 1995; TAVIAN et al., 1999).

A obtenção das células mononucleares foi através da separação por gradiente de densidade com auxílio do Ficoll-Paque-plus, método este, já estabelecido para obtenção de CTM adultas. Após um período de 48 horas de cultivo foram identificadas as primeiras colônias de células aderentes com morfologia fibroblastoíde, dados estes anteriormente descritos para a CTM adultas (CAPLAN, 1991; FRIEDENSTEIN et al., 1970; PITTENGER et al., 1999).

A escolha do meio de cultivo adequado é outro fator primordial para o sucesso do cultivo celular de CT. Com base na literatura para o isolamento de CTM da medula óssea adulta utilizamos o meio de cultivo alfa-MEM com 15% de SFB o qual, forneceu o isolamento de CTM com morfologia homogênea e com uma regular taxa de expansão celular. Dados semelhantes foram demonstrados por trabalhos anteriores em humanos (FRIEDENSTEIN et al., 1970; PITTENGER et al., 1999).

Após a expansão celular, as CTM foram submetidas á técnica de citometria de fluxo a fim de verificar o caráter fenotípico das CTM, uma vez que, que não expressam somente um marcador específico. As CTM adultas expressam classicamente uma gama de marcadores mesenquimais como *CD105*, *CD73*, *CD90* e *C44* (expressão em torno de 90%) e são negativas para marcadores de CT endoteliais e hematopoéticas *CD45*, *CD34*, *CD14* ou *CD11b*, *CD79a* ou *CD19*, e *HLA* (KOLF et al., 2007). Dentre os marcadores enumerados acima, as células derivadas da medula óssea fetal canina foram positivas somente para o anticorpo de adesão

celular (CD44), na porcentagem de 96, 55%. Este anticorpo é um receptor de adesão celular, sendo o principal ligante hialurônico e componente comum da matrix extracelular. Porém, todos os outros anticorpos sugestivos para CTM foram negativos. O alto valor da expressão do anticorpo CD44 demonstrado pelas células da medula óssea canina sugere-se, que são CTM. CTM isoladas de humanos e camundongos de outras fontes adultas também expressaram a mesma proteína (CAPLAN, 1991; PITTENGER et al., 1999; CAMPAGNOLI et al., 2001).

CONCLUSÃO

A metodologia empregada para isolamento de CTM adulta de humanos e camundongos é eficiente para o isolamento de CTM de medula óssea fetal canina.

REFERÊNCIAS

- ABDULRAZZAK, H; MOSCHIDOU, D; JONES, G; GUILLOT, P.V. Biological characteristics of stem cells from foetal, cord blood and extraembryonic tissues. **J. R. Soc. Interface**, v.7, 689–706, 2010.
- CAPLAN, A.I. Mesenchymal stem cells. **J Orthopaedic Research**, v. 9, p. 641–650, 1991.
- CLAPP, D.W; FREIE, B; LEE, W.H; ZHANG, Y.Y. 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. CAMPAGNOLI, C; ROBERTS, I.A; KUMAR, S; BENNETT, P.R; BELLANTUONO, I; FISK, N.M. Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow. **Blood**, v. 98, p.2396-2402, 2001.
- COLTER, D.C; CLASS, R; DIGIROLAMOAND, C.M; PROCKOP, DJ. Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow. **Proceedings of the National Academic Sciences of United States of America**, v.97, p.3213-3218, 2000
- DEANS, ROBERT J; MOSELEY, ANNEMARIE, B. Mesenchymal stem cells: Biology and potential clinical uses. **Experimental Hematology**, v.28, p.875-884, 2000.
- EVANS, H.E; 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.
- 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 Kinetic**, v.3, p.393–403, 1970.
- GAGE, F.H. Mammalian neural stem cells. **Science**, v. 287, p. 1433-1438, 2000.
- HAYNESWORTH, S. E; BARBER, I. A; CAPLAN. Cell surface antigens on human marrow-derived mesenchymal cells are detected by monoclonal antibodies. **Bone**, v.13, p. 69–80, 1992.
- KOLF, C.M; CHO, E; TUAN, R.S. Mesenchymal stromal cells. Biology of adult mesenchymal stem cells: Regulation of niche, self-renewal and differentiation. **Arthritis Research Therapy**, v. 9, p. 204, 2007.
- PITTENGER, M. F; MACKAY, A. M; BECK, S. C; JAISWAL, R. K; DOUGLAS, R; MOSCA, J. D; MOORMAN, M. A; SIMONETTI, D. W; CRAIG, S; MARSHAK, D. R. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. **Science**, v. 284, n. 5411, p.143-147, 1999.
- TAVIAN, M; HALLAIS, MF; PEAULT, B. Emergence of intraembryonic hematopoietic precursors in the pre-liver human-embryo. **Development**, v.126, p.793-803, 1999.
- ZAGO, MARCO A; COVAS, DIMAS T. Células-tronco Mesenquimais. In: **Células-tronco, a nova fronteira da medicina**. São Paulo: Editora Atheneu, 2006, p. 45-58.
- 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.
- WENCESLAU, C.V; MIGLINO, M.A; MARTINS, D.S; AMBRÓSIO, C.E; LIZIER; N.F; PIGNATARI G.C. Mesenchymal progenitor cells from canine fetal tissues: yolk sac, liver and bone marrow. **Tissue Eng Part A**. 2011.