



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO E CULTURA – MEC
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ – UFPI
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO – PRPPG
Coordenadoria Geral de Pesquisa – CGP
Campus Universitário Ministro Petrônio Portela, Bloco 06 – Bairro Ininga
Cep: 64049-550 – Teresina-PI – Brasil – Fone (86) 215-5564 – Fone/Fax (86) 215-5560
E-mail: pesquisa@ufpi.br; pesquisa@ufpi.edu.br

Plasticidade das células-tronco isoladas a partir do epitélio olfatório de cães sem raça definida (*Canis familiaris* Linnaeus, 1758)

Kaliny Henri da Silva Veloso (bolsista do PIBIC/UFPI), Flávio Ribeiro Alves (Orientador, CPCE-Bom Jesus-PI)

Introdução

Muitos mamíferos terrestres apresentam em suas cavidades nasais receptores ou elementos especializados do sistema neural (GUERRA; FALCÃO e MOREIRA, 2005). Em humanos, os receptores sensoriais do sistema olfatório encontram-se localizados dentro de um neuroepitélio que envolve a lâmina cribiforme do osso etmóide (HUARD et al., 1998). Dentro desse epitélio residem um conjunto de células-tronco que conferem ao epitélio olfatório a capacidade de repor os receptores olfatórios de neurônios (ORNs) após algum dano (MACKAY-SIM e KITTEL, 1990).

Diversos progenitores celulares e células-tronco têm sido estudados, buscando-se compreender sua plasticidade e seu uso em pesquisas futuras em terapia celular. Deste modo, este trabalho visa, por meio do uso do cão (*Canis familiaris* Linnaeus, 1758) como modelo animal, realizar uma caracterização morfológica dos progenitores celulares presentes no epitélio olfatório, com vistas a contribuir para a elucidação das dúvidas ainda existentes quanto a sua constituição e seus mecanismos de regeneração.

MATERIAL E MÉTODO

Foram utilizados vinte cães, sem raça definida, pesando em média 20 kg, com idade variando entre um e três anos e de ambos os sexos. Os cães foram provenientes do Sistema Municipal de coleta de animais de rua gerido pela Prefeitura de Bom Jesus, depois de constatada morte por causas naturais ou processos patológicos não infecciosos.

Todas as amostras foram fixadas em Metacarn (60% metanol, 30% clorofórmio e 10% de ácido acético glacial) por 24 horas e Glutaraldeído a 2,5% (tampão fosfato pH 7,3; 0,1 M).

As amostras fixadas em Metacarn foram incluídas em paraplast para confecção de cortes histológicos com 5 µm de espessura, para serem submetidas à coloração por Hematoxilina-eosina e imunocitoquímica para identificação de reação PAS (ácido periódico de Schiff) positiva. Foi realizado protocolo imunohistoquímico padrão, conforme previamente descrito por Alves et al., (2007) para detectar a atividade proliferativa celular, pela expressão do PCNA e Ki67 nuclear. As imagens foram analisadas em microscópio Nikon E800, acoplada a sistema de captura de imagens Nikon Coolpix, utilizando objetivas de 20x, 40x, 60 e 100x.

Fragmentos da mucosa nasal da região da lâmina crivosa do etmóide, previamente fixados em glutaraldeído 2,5%, foram lavados em tampão fosfatos 0,1 M, pós-fixados em tetróxido de ósmio. Logo após, submetidos ao protocolo de microscopia eletrônica de transmissão pela adição de uranila sob agitação, séries crescentes de etanol, óxido de propileno e embebidos em resina de araldite, procedeu-se a confecção das telas para leitura em um microscópio eletrônico de transmissão (Philips Morgagni 268 D).

Fragmentos do epitélio olfatório foram excisados e o material foi lavado a 0,9%. Em seguida transportado ao Laboratório de Cultivo Celular da Universidade Federal do Piauí-CCA, Campus Petrólio Portella em placa de Petri com PBS acrescido de penicilina-estreptomicina a 3% (Invitrogen, Cat. Nº 15140-122).

Os fragmentos obtidos foram submetidos a passagens sucessivas em PBS acrescido de penicilina-estreptomicina a 3% e adicionadas em placa de Petri contendo Tripsina-EDTA a 0,25% (Invitrogen, Cat. Nº 25200-114) 017) para a dissociação química. A reação enzimática foi inativada com 2 mL de meio de cultura D-MEM/F-12 (Invitrogen, Cat. Nº 10565-018) acrescido de Soro Fetal Bovino (Invitrogen Corporation, Nº 16000-044, 1000 ml). Deixou-se sedimentar o conteúdo em tubos falcon de 10mL, separando-se as células em suspensão em meio de cultura. Acrescentou-se 2 mL de meio aos fragmentos. Os fragmentos e células suspensas em meio de cultura foram centrifugados durante 5 minutos a 1000 rpm, sob temperatura ambiente. O material foi então ressuspensionado em 1 mL de meio de cultura, transferido para garrafas de 25 cm² (TPP, Switzerland) e cultivado em estufa contendo CO₂-5% à 37°C. As células em cultura foram visualizadas em microscópio de luz invertida (NIKON Eclipse-TS 100), sob objetivas de 4x, 10x, 20x e 40x e armazenadas através de sistema de captura (MTC Digital Color Camera).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A coloração hematoxilina-eosina e os corte semi-fino corado por azul de toluidina evidenciaram um epitélio tipicamente pseudo-estratificado ciliado, com presença de células calciformes dispersas e glândulas exócrinas mucosas na lâmina própria.

A imunohistoquímica demonstrou marcação positiva para PCNA, em núcleos da região basal do epitélio olfatório, enquanto houve maior tendência de marcação de células apicais na reação de imunohistoquímica para o Ki67, corroborando com as citações de Tsuji et al. (1992) em humanos, para os quais a técnica de imunohistoquímica lança mão de marcadores de proteínas expressas em sua maior parte no ciclo celular.

A avaliação ultra-estrutural, através de microscopia eletrônica de transmissão, demonstrou a presença de três grupos celulares distintos, dispostos como células colunares e células basais, estas últimas apresentando núcleo mais elétron-densos, intensa atividade metabólica, achados condizentes com as citações feitas por Caggiano et al. (1994) e Higuchi et al. (2005), sustentando a hipótese da presença de células progenitoras residentes entre as células basais do epitélio olfatório.

As células isoladas a partir do epitélio olfatório de cães sem raça definida e cultivadas em Meio D-MEM/F-12, exibiram alto nível de liberação a partir de fragmentos postos em cultura e observados 24 horas após o cultivo, também observado por Lumelsky et al. (2001) em multilinhagens

de células-tronco embrionárias, de células jovens quanto a capacidade de auto-renovação, assim com sua potencialidade para diferenciação ilimitada.

Tal qual observado por Roisen et al. (2001), ao nível da quarta passagem, encontrava-se estabelecida a manutenção de uma morfologia neuronal, evidenciada pela emissão de expansões citoplasmáticas que lembravam a interação existente entre células de caráter neuronal.

CONCLUSÕES

1) A microscopia eletrônica de transmissão mostrou-se eficaz para diferenciar a eletrodensidade de células quiescentes e de células em divisão presentes na membrana basal, confirmando as observações obtidas pela imunohistoquímica;

2) Os marcadores imunohistoquímicos PCNA e K67 são eficazes na identificação do mecanismo de proliferação celular do epitélio olfatório e podem evidenciar as células da lâmina basal comprometidas com a renovação desse epitélio;

3) O protocolo de cultivo e isolamento de células-tronco a partir do epitélio olfatório mostrou-se viável para cães sem raça definida, evidenciando em cultivo células com morfologia de fibroblastos, característica de progenitores celulares, confirmadas por meio de reações de imunohistoquímica e diferenciações celulares;

4) Dentre os meios de cultura testados, o DMEM-F12 demonstrou alto nível de proliferação celular, propiciando confluência da cultura em poucos dias pós-plaqueamento, além do favorecimento da diferenciação espontânea, em cultivo, de células com morfologia neuronal.

REFERÊNCIAS

GUERRA, M.; FALCÃO, M.; MOREIRA, A. L. Regulação da respiração. Disponível em:< http://fisiologia.med.up.pt/Textos_Apoio/Exercicio.pdf> Acesso em: 8 jul. 2005.

CAGGIANO, M.; KAUER, J. S.; HUNTER, D. D. Global basal cells are a neuronal progenitors in the olfactory epithelium: a lineage analysis using a replication-incompetent retrovirus. **Neuron**, n. 13, p. 339-352, 1994.

HIGUCHI, Y.; NAKAMURA, H.; KAWASAKI, M.; TAKAHASHI, S. The dynamics of precursor cells in the olfactory epithelium of juvenile and adult guinea pigs. **Eur. Arch. Otorhinolaryngol**, n. 262, p. 64-68, 2005.

HUARD, J. M. T.; YUONGENTOB, S. L.; GOLDSTEIN, B. J.; LUSKIN, M. B. SCHWOB, J. E. Adult olfactory epithelium contains multipotent progenitors that give arise to neurons and no-neuronal cells. **Journal of Comparative Neurology**, n. 400, p. 400-469, 1998.

LUMELSKY, N.; BLONDEL, O.; LAENG, P.; VELASCO, I.; RAVIN, R.; MCKAY, R. Differentiation of Embryonic Stem Cells to Insulin-Secreting Structures Similar to Pancreatic Islets. **Science**. v. 292, n. 5520, p. 1389 -1394, 2001.

MACKAY-SIM A.; KITTEL, P. W. Cell Dynamics in the Adult Mouse Olfactory Epithelium: A Quantitative Autoradiographic Study. **The Journal of Neuroscience**, v. 1 n. 4, p. 979-984, 1991.

ROISEN, F. J.; KLUEBER, K, M.; LU, C. L. ; HATCHER, L. M.; DOZIER, A.; SHIELDS, C. B.; MAGUIRE, S. Adult human olfactory stem cells. **Brain Research**. n. 890, p. 11-22, 2001.

TSUJI, T.; SASAKI, K.; KIMURA, Y.; YAMADA, K.; MORI, M.; SHINOZAKI, F. Measurement of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and its clinical application in oral cancer. **Int. J. Oral. Maxillofac. Surg**, v. 21, p. 369-372, 1992.