



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

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE PROGENITORES MESENQUIMAIS ORIUNDOS DA MEDULA ÓSSEA DE CAPRINOS NATIVOS DO ESTADO DO PIAUÍ

Jamille Silva Machado (bolsista do PIBITI/CNPq-UFPI), Maria Acelina Martins de carvalho, (Colaborador, CCA-UFPI, Teresina), Napoleão Martins Argolo Neto (Colaborador, CCA-UFPI, Teresina), Antônio Augusto Nascimento Machado Júnior (Colaborador, CPCE-Bom Jesus-PI), Flávio Ribeiro Alves (Orientador, CPCE-Bom Jesus-PI)

Introdução

A plasticidade das células-tronco foi evidenciada por meio de vários estudos com células mioblásticas esqueléticas, células da medula óssea, além de células hematopoiéticas em infarto. Estas células têm sido induzidas a diferenciação em cardiomiócitos e em células endoteliais contribuindo para a angiogênese, e isto tem sido demonstrado em modelos animais (ABBOTT & GIORDANO, 2003).

A presente proposta lançada traz consigo a possibilidade de viabilização de protocolos para extração, expansão, caracterização e caracterização de células-tronco mesenquimais (CTM) obtidas a partir de aspirados de medula óssea de caprinos saudáveis. Aliado a isso, há a oportunidade de formação de um banco de células que, após sua adequada caracterização, poderão ser avaliadas quanto ao efeito terapêutico na recuperação de lesões em modelos animais, para aquisição de resultados que possam ser projetados para uso futuro em humanos e sua consequente transferência de tecnologia.

MATERIAL E MÉTODO

Animais

Foram utilizados 20 caprinos nativos, de ambos os sexos, entre 1,0 e 1,5 anos de idade, previamente vermifugados com albendazol na dose de 5mg/Kg, via oral, após constatado o seu estado de higiene dos animais, por meio de exames semiológicos e laboratoriais. Os animais foram provenientes de propriedades localizadas próximas ao Campus Professora Cinobelina Elvas da Universidade Federal do Piauí, implantado em 2006, no município de Bom Jesus – Piauí, onde o proponente é professor vinculado ao curso de Medicina Veterinária.

Obtenção de células-tronco mesenquimais da medula óssea de caprinos

Os animais foram previamente sedados utilizando-se acepromazina 1% na dose de 0,1 mg/kg/IM e anestesia epidural com lidocaína 2% na dose 7 mg/kg. O conteúdo medular foi obtido por meio de aspirado de 3 a 7 mL da crista ilíaca. O aspirado foi lavado em meio DMEM – Low Glicose contendo penicilina-estreptomicina a 1% e centrifugado a 2000 rpm durante 25 minutos. O precipitado celular foi então ressuscitado em meio de cultura contendo soro fetal bovino a 10% e transferido para placas de 06 poços e cultivadas em estufa contendo atmosfera de CO₂-5% à 37°C até sua confluência atingir 70 a 80%.

Citometria de Fluxo

As células foram tripsinizadas em quarta passagem e centrifugação 1000rpm/5min e ressuscitadas em PBS a concentração de 1×10^5 células/mL para cada anticorpo utilizado. Estas foram incubadas no escuro por 45 minutos em temperatura ambiente. As células foram então lavadas 3 vezes com PBS e ressuscitadas em 0,20 ml de PBS gelado. Para as amostras incubadas com anticorpos não conjugados foi utilizado o anticorpo secundário anti-mouse PE. As amostras foram incubadas por 15 minutos, lavadas 3 vezes com PBS e ressuscitadas em 0,20 ml de PBS gelado.

O citômetro de fluxo foi calibrado utilizando células não marcadas. As células foram separadas pelo “forward scatter” para eliminar os debris. Para cada amostra, foram contados no mínimo 5000 eventos. Foram analisados os marcadores: OCT-3/4, PCNA, CK-PAN, VIMENTINA, NANOG.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Cultivo celular

Em nossas avaliações verificamos a presença de células aderentes formadoras de matriz de Friedenstein et al. (1976), quando estabeleceram como principal característica a capacidade de aderência ao plástico, enquanto células em suspensão eram lavadas 2 a 4 dias após o início da cultura.

O estabelecimento da cultura primária foi realizado quando semeada uma concentração de um aspirado $4,6 \times 10^6$ cel/mL, o que também foi descrito por Meirelles et al. (2008) para medula óssea de ratos, utilizando uma concentração celular de 5×10^6 cel/mL.

A morfologia fibroblastóide observada em nossos estudos *in vitro* apresentaram morfologia semelhante ao relatado por Martin et al. (2002) em gatos, assim como às descrições feitas para roedores e humanos (PITTINGER et al., 1999; WOODBURY et al., 2000).

Citometria de Fluxo

A caracterização celular tomando como base a citometria de fluxo evidenciou a presença de uma população de células que expressaram positivamente a presença do fator de transcrição octamérico (OCT-3/4) e Nanog, conforme os achados de Niwa; Miyazaki; Smith (2000) quando descreveram o Oct-4 como regulador essencial da indiferenciação em células embrionárias de ratos. Aliado a isso, Chambers et al. (2003) demonstraram o papel importante do Nanog no mecanismo de regulação da pluripotência celular da MCI.

O estudo realizado demonstrou a expressão positiva do PCNA nuclear nas culturas, em quarta passagem demonstrando a capacidade proliferativa das células isoladas, como também

descrito por Hasegawa et al. (2006). A positividade para Vimentina e CK-PAN possibilitou tanto a caracterização da morfologia celular pela marcação do citoesqueleto celular, conforme relatado por e Collino et al. (2009), quanto a observação estas características de indiferenciação celular em células igualmente marcadas positivamente para CD44, CD29, CD90.

CONCLUSÕES

O ensaio experimental realizado demonstrou a plasticidade dos progenitores celulares obtidos a partir de aspirados da medula óssea de caprinos nativos do Estado do Piauí. A expressão de marcadores de indiferenciação celular, característicos de células-tronco embrionárias, tais como OCT-3/4, Nanog, ou ainda, marcadores de proliferação celular (PCNA) e de células mesenquimais (Vimentina e Ck-pan), associada às características morfológicas e de crescimento em cultura, nos permitem sugerir a existência de uma população de MSC na medula óssea dos caprinos estudados, cujo potencial poder explorado futuramente em estudos pré-clínicos.

Palavras Chave: Células-tronco mesenquimais, terapia celular, Modelo caprino

REFERÊNCIAS

- ABBOTT ,D; GIORDANO, F.J. Stem cells and cardiovascular disease. **J Nucl Cardiol**; v.10, p. 403-12, 2003.
- CHAMBERS, I; COLBY, D; ROBERTSON, M.; et al. Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. **Cell**. 2003; 113:643-655.
- COLLINO, F.; REVELLI, A.; MASSOBRIO, M.; KATSAROS, D.; SCHMITT-NEY, M.; CAMUSSI, G.; BUSSOLATI, B. Epithelial-mesenchymal transition of ovarian tumor cells induces an angiogenic monocyte cell population. **Exp Cell Res**. v. 315, n. 17, 2982-2994, 2009.
- FRIEDENSTEIN, A. J.; GORSKAJA, J. F.; KULAGINA, N. N. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. **Exp Hematol**. v. 4, 267-274, 1976.
- HASEGAWA, N.; KAWAGUCHI, H.; HIRACHI, A.; TAKEDA, K.; MIZUNO, N.; NISHIMURA, M.; KOIKE, C.; TSUJI, K.; IBA, H.; KATO, Y.; KURIHARA, H. Behavior of transplanted bone marrow-derived mesenchymal stem cells in periodontal defects. **J Periodontol**. v. 77, n. 6, p. 1003-1007, 2006.
- NIWA, H.; MIYAZAKI, J.; Smith, A. G. Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat. Genet.* v. 24, p. 372-376, 2000.
- 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, 143–147, 1999.
- WOODBURY, D.; SCHWARZ E. J.; PROCKOP, D. J.; BLACK, I. B. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. **J Neurosci Res**. v. 61, p. 364, 2000.