



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 DIFERENCIAÇÃO DE PROGENITORES MESENQUIMAIS ORIUNDOS DA MEDULA ÓSSEA DE CAPRINOS NATIVOS DO ESTADO DO PIAUÍ

Morgana Santos Araújo (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 potencialidade das células-tronco tem sido subdividida em pelo menos três categorias: células totipotentes, que contém informação genética necessária para criar todas as células do corpo, inclusive a placenta e anexos embrionários); células pluripotentes, as quais podem dar origem a qualquer tipo de células, exceto a placenta e anexos embrionários; células multipotentes, capazes de originar a vários tipos celulares, mas com maior limitação; e as células unipotentes que originam apenas um tipo de célula (JIANG et al., 2002).

A presente proposta lançada traz consigo a possibilidade de viabilização de protocolos para extração, expansão e diferenciação 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%.

Indução da Diferenciação Celular *in vitro*

Para este procedimento, as células previamente cultivadas foram plaqueadas em placas de seis poços em uma densidade inicial de 10⁴ em cada poço, como meio de cultura basal (mesmo meio utilizado para o cultivo dessas células). As células plaqueadas permaneceram na estufa “overnight”. Observou-se a expansão celular até que estas cheguem a 70% de confluência. Após esse momento, realizou-se a troca do meio de cultura para a indução das diferenciações: osteogênica e adipogênica.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Cultivo celular

O protocolo utilizado produziu um aspirado de células da ordem de 9 mL de medula óssea, proveniente da crista da tíbia. A crista ilíaca é a região mais comumente empregada na coleta de medula óssea na maioria das espécies (ITO et al., 2004). Entretanto, o aspirado de medula de cutias, a partir da crista ilíaca, não propicia volume celular que permita ser expandido em cultura. De fato, Friedenstein et al. (1976) relatam uma pequena população de MSCs na medula óssea (1:10.000 células nucleadas).

A concentração inicialmente plaqueada (4,6 x 10⁶ cel/mL) proporcionou uma população de células aderentes ao plástico e de característica fibroblastóide observada, juntamente a células em suspensão 24 horas após o início do cultivo, como também descrito por Meuleman et al. (2006) para humana.

A morfologia celular de aspecto fibroblastóide, com tendência a formação de colônias e alta capacidade de divisão foi obtida aos oito dias de cultivo mostrou-se semelhante às descrições feitas por Friedenstein, (1976) para linhagens não-hematopoéticas do estroma medular, formadoras de colônias unidade de fibroblastos (CFU-F) de alta plasticidade para dar origem a múltiplos tecidos, como osso, cartilagem, adipócitos e fibroblastos.

A viabilidade observada (99,01%) possibilitou a manutenção em cultivo por 15 passagens. A semelhança disso, ensaios realizados por Meirelles e Nardi (2008) determinaram a viabilidade em cultura de MSCs isoladas da medula óssea de ratos durante 50 passagens.

Indução da Diferenciação Celular *in vitro*

A população de MSCs isoladas da medula óssea de caprinos demonstrou comprometimento com a linhagem celular osteogênica e adipogênica. Resultados semelhantes também foram descritos

por TROPEL et al. (2004) ao avaliar culturas de células da medula óssea de ratos, expandidas em cultivo e induzidas a diferenciação. O protocolo de diferenciação empregados no ensaio realizado mostrou resultados compatíveis aos relatado por CHIU et al. (2011) quando demonstraram a presença de células densamente marcadas por Alizarin Red, a intensa produção de matriz extracelular, assim como a presença de grânulos lipídicos em células com morfologia cuboide, marcadas por Oil Red, três semanas após iniciada a diferenciação celular. Corroborando aos nossos achados, Ito et al. (2004) observaram células com gotículas de lipídios intracitoplasmáticas duas a três semanas, quando as células eram cultivadas em meio de cultura enriquecido com dexametasona e insulina.

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

- CHIU, L. H.; YEH, T. S.; HUANG, H. M.; LU, S. J.; YANG, C. B.; TSAI, Y. H. Diverse effects of type II collagen on osteogenic and adipogenic differentiation of mesenchymal stem cells. **J Cell Physiol.** 2011 doi: 10.1002/jcp.22976. [Epub ahead of print].
- FRIEDENSTEIN, A. J. Precursor cells of mechanocytes. **Int. Rev. Cytol.** v. 47, p. 327-359, 1976.
- ITO, A.; HIBINO, E.; HONDA, H.; HATA, K.; KAGAMI, H.; UEDA, M.; KOBAYASHI, T. A new methodology of mesenchymal stem cell expansion using magnetic nanoparticles. **Biochemical Engineering Journal.** v. 20, p. 119-125, 2004.
- JIANG, Y.; VAESSEN, B.; LENVIK, T.; BLACKSTAD, M.; REYES, M.; VERFAILLIE, C. M. Multipotent progenitor cells can be isolated from postnatal murine bone marrow, muscle, and brain. **Exp Hematol.** v. 30, n. 8, p. 896-904, 2002.
- MEIRELLES, L. S.; CAPLAN, A. I.; NARDI, N. B. In search of the in vivo identity of mesenchymal stem cells. **Stem Cells.** v. 26, p. 2287, 2008.
- MEULEMAN, N.; TONDREAU, T.; DELFORGE, A.; DEJENFFE, M.; MASSY, M.; LIBERTALIS, M.; BRON, D.; LAGNEAUX, L. Human marrow mesenchymal stem cell culture: serum-free medium allows better expansion than classical α -MEM medium. **Eur J Haematol.** v. 76, 309-316, 2006.
- TROPEL, P.; NOËL, D.; PLATET, N.; LEGRAND, P.; BENABID, A-L.; BERGER, F. Isolation and characterization of mesenchymal stem cells from adult mouse bone marrow. **Experimental Cell Research.** v. 295, n. 1, p. 395-406, 2004.