



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

Raffael Eufrásio Oliveira (bolsista do PIBIC/CNPq), Flávio Ribeiro Alves (colaborador, UFPI – Bom Jesus), Antonio Augusto Nascimento Machado Júnior (Orientador, Curso de Medicina Veterinária – UFPI – Bom Jesus)

INTRODUÇÃO: Inicialmente os estudos referentes às células-tronco foram resguardados a progenitores celulares comprometidos com a renovação e diferenciação tecidual, a partir de células residentes no mesmo tecido (WILMUT et al., 2007). Todavia, os avanços observados nos últimos anos, no âmbito da biologia das células-tronco, têm demonstrado o alto nível de plasticidade de certos tipos celulares, evidenciando que células originadas de tecidos específicos apresentam capacidade para cruzar esta fronteira, dando origem a outras linhagens celulares diferentes daquelas primordiais (FORBES et al., 2002; WAGERS e WEISSMAN, 2004; KRATCHMAROVA et al., 2005). A busca por modelos biológicos adequados tem se tornado cada vez mais importante, como forma de reproduzir resultados mais próximos do desejado, para aplicação tanto à Medicina Humana quanto à melhoria da qualidade de vida animal. Deste modo, objetivou-se neste trabalho o isolamento e expansão de células-tronco mesenquimais oriundas da medula óssea de caprinos, em busca de estabelecer um modelo animal confiável para protocolos de tratamento de lesões articulares em animais e, possível extrapolação para humanos.

METODOLOGIA: Foram utilizados 20 caprinos nativos, de ambos os sexos, entre 1,0 e 1,5 anos de idade, provenientes de propriedades localizadas próximas ao CPCE/UFPI em Bom Jesus. Os animais foram previamente sedados utilizando-se acepromazina 1% na dose de 0,1 mg/kg por via intramuscular para tranquilização e ação ansiolítica, sendo na sequência anestesiados com lidocaína a 2% na dose de 2mg/Kg. Depois de verificado o efeito anestésico local, o conteúdo medular foi obtido por meio de aspirado de 3 a 7 mL, coletados diretamente da crista ilíaca de caprinos, previamente tricotomizada e submetida a antisepsia local. O procedimento de coleta foi realizado fazendo-se uso de uma cânula de biópsia de medula óssea introduzida com a mão através da crista ilíaca no sentido crânio-caudal com inclinação dorsal aproximada de 35°. O aspirado foi lavado em meio DMEM – Low Glicose contendo penicilina-estreptomicina a 1%, e centrifugado a 1000 rpm durante 5 minutos. O precipitado celular foi então ressuspensionado em meio de cultura contendo soro fetal bovino a 10% até uma densidade de 1,4 a 1,6 x 10⁶ células/mL. As células foram

transferidas para garrafas de 25 cm² e cultivadas em estufa contendo atmosfera de CO₂-95% à 37°C até sua confluência atingir 70 a 80%. Após a separação celular, a concentração e viabilidade das amostras foram determinadas através do método de exclusão do Azul de Trypan. Após adição e homogeneização de 20 µl da suspensão celular em 20 µl da solução de Azul de Trypan, uma alíquota de 15 µl foi levada ao hematócrito e observada em microscópio óptico. A concentração celular foi determinada pela fórmula: (n° total de contadas X fator de diluição X 10⁴)/número de quadrantes contados. A viabilidade da amostra foi determinada pela relação entre a quantidade de células vivas (não coradas) e as quantidades totais de células, descartando-se as suspensões celulares com viabilidade inferior a 34%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO: O cultivo celular de células isoladas a partir da medula óssea de caprinos nativos do Estado do Piauí exibiu rápido crescimento, quando avaliado após passagens sucessivas em cultura. A primeira avaliação foi realizada vinte quatro horas após o início do cultivo e as células foram observadas homogeneamente aderidas em todos os pontos da garrafa, prevalecendo um grande número de células mononucleadas, caracterizadas pelo aspecto ovalado, de núcleo globóide e central. (Figura 1a). Nesse momento, foi realizada a primeira troca de meio de cultura basal, realizando-se lavagem prévia com PBS, o que resultou na diminuição da quantidade de células mononucleares (Figura 1b e c) e possibilitando a melhor visualização das células aderentes de formato fibroblástico de diversos tamanhos, revelando assim o seu potencial para confluência celular (Figura 1d). As células provenientes da medula óssea de caprino atingiram confluência que variaram entre 30 a 40% aos nove dias de cultivo. Aos 14 dias de cultivo as células atingiram 80% de confluência, quando se observou a necessidade de realização da primeira passagem desta cultura. Aos 17 dias de cultivo, apenas três dias após a primeira tripsinização, as células já se encontravam uniformemente aderidas ao fundo da garrafa, formando colônias homogêneas. Estas colônias foram caracterizadas por serem constituídas por células de igual tamanho e de característica fibroblástica, iniciando-se o processo de confluência, até a constituição da monocamada. (Figura 2). O crescimento celular foi monitorado através de uma curva de crescimento (Figura 3), mostrou grande variação durante a contagem celular, alcançando uma concentração inicial de células 3,2 x 10⁵ cel/mL aos três dias, após o plaqueamento das células utilizadas para avaliação da curva. Aos nove dias a concentração celular alcançou 6,5 x 10⁵ cel/mL, atingindo o ápice do crescimento celular, a partir do qual se inicia queda da concentração, alcançando 3,48 x 10⁵ cel/mL aos doze dias de cultivo, mantendo-se a 2,6 x 10⁵ cel/mL a partir dos 18 dias de cultivo em diante.

CONCLUSÃO: As células-tronco mesenquimais isoladas da medula óssea de caprinos apresentaram morfologia característica e crescimento in vitro semelhantes ao relatado na literatura para as células-tronco mesenquimais. Seu comportamento em cultivo, assim como sua capacidade de auto-renovação e morfologia observada podem sugerir seu potencial de proliferação em cultura, plasticidade e aptidão para maiores estudos quando ao seu uso em estudos futuros em terapia celular.

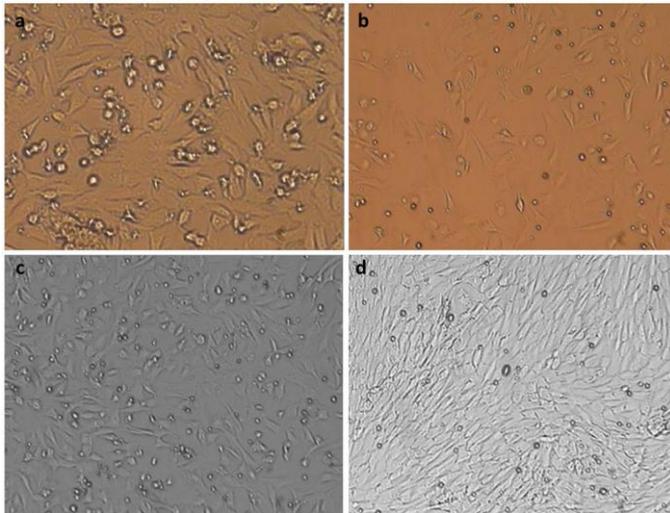


Figura 1 - Fotomicrografia do cultivo celular. (A) Cultivo celular após 24 horas, (B e C) característica do cultivo após a primeira lavagem com PBS e (D) processo de confluência celular caracterizado pela presença de células aderentes de formato fibroblastóide.

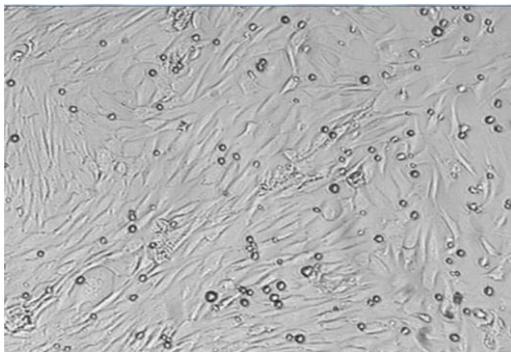


Figura 2 – Fotomicrografia representativa das colônias celulares após 17 dias de cultivo. Evidencia-se a uniformidade das células quanto ao tamanho e o início do processo de confluência.

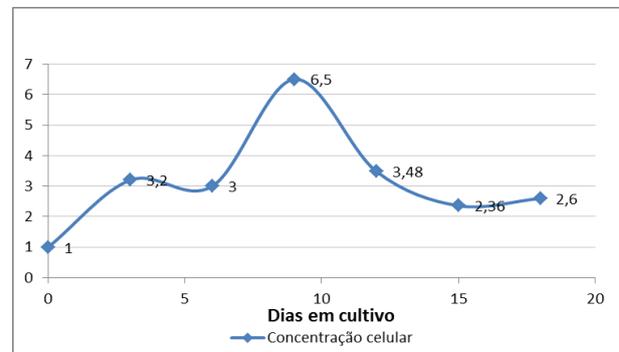


Figura 3 – Curva de crescimento do cultivo das células dos caprinos

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

FORBES, S. J.; PAMELA, V. I. G, POULSOM, R.; WRIGHT, N. A; ALISON, M. R. Adult stem cell plasticity: new pathways of tissue regeneration become visible. **Clinical Science**. n. 103, p. 355-369, 2002.

KRATCHMAROVA, I.; BLAGOEV, B.; HAACK-SORENSEN, M.; KASSEM, M.; MANN, M. Mechanism of Divergent Growth Factor Effects in Mesenchymal Stem Cell Differentiation. **Science**. v. 308. n. 5727, p. 1472-1477, 2005.

WAGERS, A. WEISSMAN, I. Plasticity of Adult Stem Cells. **Cell**, v. 116, n. 5, p. 639-648, 2004.

WILMUT, A. E.; SCHNIEKE, J.; Mcwhir, A. J.; KIND, K. H. S. Campbell. **Cloning and Stem Cells**. v. 9, n. 1, p. 3-7, 2007.

Palavras-chave: Pequenos ruminantes. Células-tronco. cultivo celular.