



**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 10<sup>6</sup> células/mL. As células foram

transferidas para garrafas de 25 cm<sup>2</sup> e cultivadas em estufa contendo atmosfera de CO<sub>2</sub>-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 hematocítmetro e observada em microscópio óptico. A concentração celular foi determinada pela fórmula: (n° total de contadas X fator de diluição X 10<sup>4</sup>)/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 fibroblastóide 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 fibroblastóide, 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 10<sup>5</sup> 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 10<sup>5</sup> cel/mL, atingindo o ápice do crescimento celular, a partir do qual se inicia queda da concentração, alcançando 3,48 x 10<sup>5</sup> cel/mL aos doze dias de cultivo, mantendo-se a 2,6 x 10<sup>5</sup> 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.

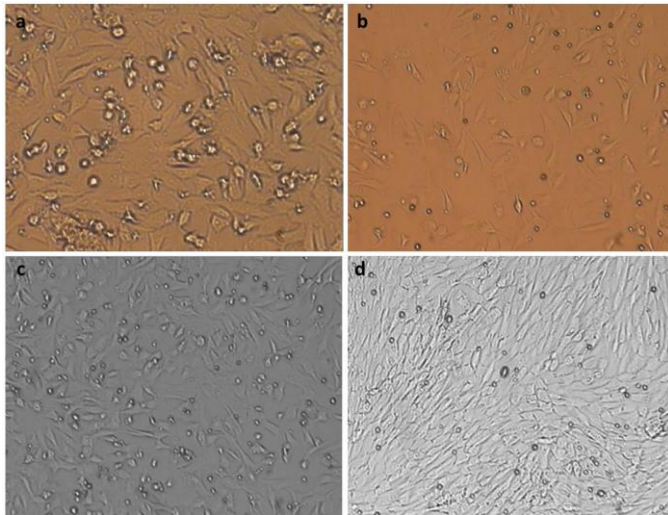


Figura 1 - Fotomicrografia do cultivo celular. (A) Cultivo celular após 24 horas, (B e C) característica do cultivo após a primeira lavagem com PBS e (D) processo de confluência celular caracterizado pela presença de células aderentes de formato fibroblastóide.

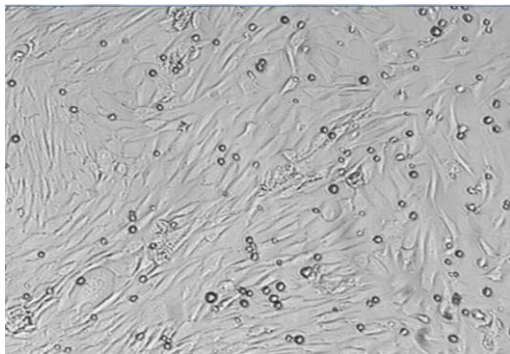


Figura 2 – Fotomicrografia representativa das colônias celulares após 17 dias de cultivo. Evidencia-se a uniformidade das células quanto ao tamanho e o início do processo de confluência.

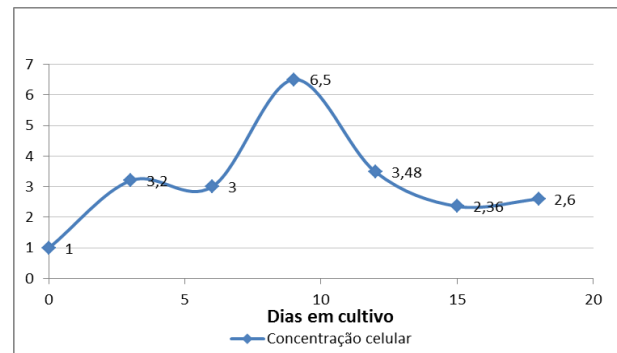


Figura 3 – Curva de crescimento do cultivo das células dos caprinos

#### 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.