

EXPANSÃO, CULTIVO E CARACTERIZAÇÃO *IN VITRO* DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DO CORDÃO UMBILICAL DE CUTIAS (*DASYPROCTA PRYMNOLOPHA*, WAGLER, 1831)

Gerson Tavares Pessoa (bolsista do PIBIC/CNPq), Napoleão Martins Argolo Neto (colaborador, PRODOC – CAPES/UFPI), Flávio Ribeiro Alves (colaborador, Campus Cinobelina Elvas, Bom Jesus/UFPI), Yulla Klinger Pereira de Carvalho (colaboradora, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal – CCA/UFPI), Maria Acelina Martins de Carvalho (orientadora, Depto de Morfofisiologia Veterinária - UFPI)

Introdução

A capacidade regenerativa, apesar de restrita a alguns órgãos, sempre foi alvo de interesse dos pesquisadores. Sabe-se que a manutenção dos tecidos no organismo é exercida por reservas celulares "*in situ*", capazes de recuperar órgãos lesionados, através da reparação do parênquima tecidual, mesmo que com uma série de limitações quanto à diferenciação (MADEN, 2001). A terapia com células-tronco mesenquimais (MSC) é um procedimento promissor para o tratamento de vários tipos de doenças degenerativas, devido ao fato de possuírem a capacidade plástica, sendo capazes de originar diversos tipos celulares *in vivo* e *in vitro* (KRAUSE, 2002).

Esta pesquisa tem por objetivo expandir e cultivar *in vitro* as células-tronco mesenquimais do cordão umbilical de cutias (*Dasyprocta prymnolopha*), bem como descrever suas características morfológicas.

Metodologia

Foram utilizadas duas cutias (*Dasyprocta prymnolopha*, Wagler, 1831), gestantes, adultas, entre um e dois anos de idade. Os animais foram provenientes do Núcleo de Estudos e Pesquisas em Animais Silvestres – NEPAS (Certificado de Registro IBAMA/PI N° 02/08-618) da Universidade Federal do Piauí (UFPI). Constatados os padrões de higiene, os animais foram submetidos a exame ultrassonográfico uterino.

Na eminência do parto, o animal foi pesado, encaminhado ao centro cirúrgico e submetido à cesariana. Foram coletados dois cordões de cada animal, os quais foram encaminhados ao laboratório de células-tronco. O cordão umbilical foi lavado em solução salina-fosfato tamponante (PBS) com 2% de antibiótico (Penicilina-estreptomicina. SIGMA® Cat. N° P4333. Em seguida, dissociado mecanicamente, com auxílio de uma lâmina estéril de bisturi nº 20, em uma placa de Petri de 35 mm contendo solução de Colagenase tipo 1 a 1% (Invitrogen®, Cat. N° 17100-017). Posteriormente, o material foi incubado em estufa contendo atmosfera de CO₂ – 95% a 37°C durante 30 minutos.

O material foi semeado uma placa de cultura de seis poços (Placa de crescimento celular de seis poços TPP®) e mantido em estufa incubadora (TECMAL TE-399®) à 37°C em 5% de CO₂ e umidade de 95%. O meio de cultivo foi trocado a cada três dias e a cultura, monitorada para avaliação do crescimento, até que as culturas atingiram 80% de confluência. As células foram plaqueadas na concentração de 10⁶ células/mL em garrafas de cultura de tecidos de 25cm² com três mL de meio de cultivo D-MEM suplementado. Estas foram mantidas em incubação à 37°C em 5% de CO₂ e umidade de 95%. As culturas foram expandidas, fotografadas em microscópio invertido de

contraste de fase (COLEMAN NIB-100[®]) e repicadas com o dobro da área original, aferindo-se a concentração celular a cada passagem.

Resultados e Discussão

As células organizaram-se em *clusters* circunjacentes ao explante, com morfologia fusiforme, apresentando núcleo evidente, margens celulares bem definidas e mantendo contato umas com as outras por meio de prolongamentos citoplasmáticos orientados paralelamente entre si (figura 1). A elevada concentração celular aferida no isolamento de MSC de cordão umbilical já havia sido observada por FADEL et al. (2011); PENOLAZZI et al. (2011); WANG et al. (2011) em amostras de seres humanos. Estes autores obtiveram concentrações entre 10^6 a 10^7 células/mL. No presente trabalho, obteve-se uma concentração de 10^6 e $1,6 \times 10^6$ células/mL (tabela 1), o que nos permite inferir que o modelo proposto para coleta de MSC de cordão umbilical de cutias é viável.

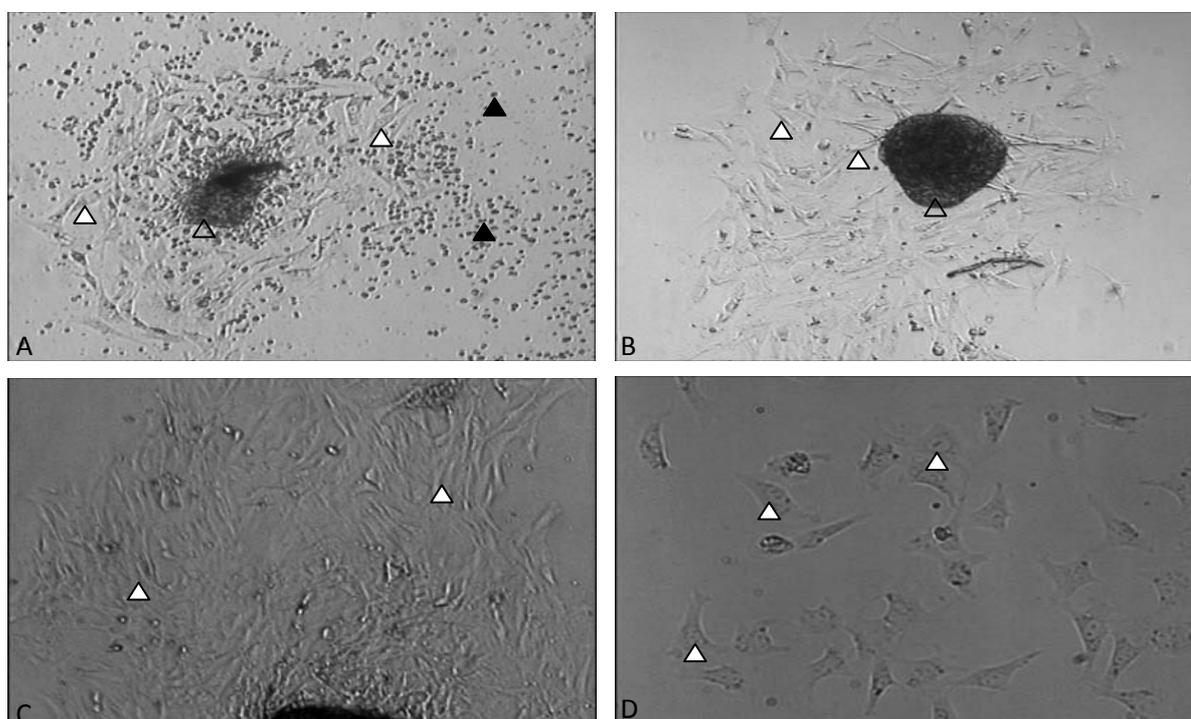


Figura 1 – Culturas de explante de cordão umbilical de cutia (*Dasyprocta prymnolopha*, Wagler, 1831). A: Células fusiformes (setas brancas) em torno de um fragmento de cordão umbilical (seta vazada), em primeira passagem. Permanecem inúmeras células mononucleares e hemácias, de morfologia arredondada ou ovalada, não aderentes (setas negras). Aumento de 5x. B e C: Células fusiformes (setas brancas) distribuídas marginalmente ao explante (seta vazada), em quinta passagem. Aumento de 10x. D: Colônia homogênea de células fusiformes com núcleos (setas brancas), nucléolos e limite celulares evidentes, em sexta passagem. Aumento de 20x.

Tabela 1 – Concentração de células-tronco mesenquimais isoladas e viabilidade celular por amostra, em cutias (*Dasyprocta prymnolopha*, Wagler, 1831).

Animal	Amostra (cordão)	Concentração (células/mL)	Viabilidade (%)
1	A	$1,16 \times 10^5$	93
	B	$1,36 \times 10^6$	96
	C	$1,42 \times 10^5$	85
2	D	$1,82 \times 10^5$	82
	Média	$5,0 \times 10^7$	89

Quando em cultura, as MSC desprendem-se do tecido do cordão umbilical, formando *clusters* circunvizinhos ao explante, em organização radial (figura 1). Estes achados corroboram com as observações de BIEBACK et al. (2010), COOPER et al. (2011), YANG et al. (2011) e SHI et al. (2011), os quais descrevem que apenas MSC possuem a capacidade de manterem-se aderidas em substrato plástico e proliferar-se indefinidamente.

A observação de confluência celular, aumento da concentração celular a cada passagem e homogeneidade morfológica após cada repique indicam indubitavelmente que as MSC observadas expandiram-se continuamente e preservaram-se indiferenciadas, características esperadas para uma cultura de células-tronco (BIEBACK et al., 2010; PENOLAZZI et al., 2011).

Conclusões

A elevada concentração celular aferida no isolamento de MSC de cordão umbilical de cutia nos permite inferir que o modelo proposto para coleta de MSC de cordão umbilical de cutias é viável. Quando em cultura, as MSC desprendem-se do tecido do cordão umbilical, formando *clusters* circunvizinhos ao explante, em organização radial, o que caracteriza a capacidade de se manterem aderidas em substrato plástico e se proliferarem indefinidamente.

Referências Bibliográficas

MADEN, M. Role and distribution of retinoic acid during CNS development. *International Review of Cytology*, v. 209, p. 1-77, 2001.

KRAUSE, D.S. Plasticity of marrow-derived stem cells. *Gene Therapy USA*, v. 9, p. 754–758, 2002.

FADEL, L. et al. Protocols for obtainment and isolation of two mesenchymal stem cell sources in sheep. *Acta Cir Bras*, v. 26, n. 4, p. 267-73, 2011.

PENOLAZZI, L. et al. Human mesenchymal stem cells seeded on extracellular matrix scaffold: Viability and osteogenic potential. *J Cell Physiol*, 2011 Aug 9. doi: 10.1002/jcp.22983. [Epub ahead of print].

WANG, H.W. et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cells derived from Wharton's jelly differentiate into insulin-producing cells in vitro. *Chin Med J (Engl)*, v. 124, n. 10, p. 1534-9, 2011.

BIEBACK, K.; BRINKMANN, I. Mesenchymal stromal cells from human perinatal tissues: From biology to cell therapy. *World J Stem Cells*, v. 26, n. 4, p. 81-92, 2010.

SHI, L.L.; LIU, F.P.; WANG, D.W. Transplantation of human umbilical cord blood mesenchymal stem cells improves survival rates in a rat model of acute hepatic necrosis. *Am J Med Sci*, v. 342, n. 3, p. 212-7, 2011.

YANG, X. et al. Mesenchymal stem cells derived from Wharton jelly of the human umbilical cord ameliorate damage to human endometrial stromal cells. *Fertil Steril*, 2011 Jul 29. [Epub ahead of print].

COOPER, K.; VISWANATHAN, C. Establishment of a mesenchymal stem cell bank. *Stem Cells Int*, 2011; 2011:905621. Epub 2011 Aug 4.

Apoio: Universidade Federal do Piauí – UFPI; Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq – Processo: 308275/2008-0 (Contempla Bolsa PQ - Nível 1C, adicional de bancada à orientadora).

Palavras-chave: *Dasyprocta*. Células-tronco mesenquimais. Cordão umbilical.