



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

EXPANSÃO CELULAR E AVALIAÇÃO DA CURVA DE CRESCIMENTO DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DE MEDULA ÓSSEA DE CATETOS (TAYASSU TAJACU, LINAEUS, 1958)

Pablo Brandão Fernandes (bolsista do PIBIC/CNPq), Napoleão Martins Argôlo Neto (Orientador, Departamento de Morfofisiologia – UFPI)

INTRODUÇÃO

As células-tronco mesenquimais alcançaram grande notoriedade em meio às comunicações científicas dos últimos anos, devido à elevada plasticidade apresentada *in vitro*. Contudo, observou-se também que estas células são encontradas virtualmente em todos os tecidos pós-natais¹, compondo subpopulações de morfologia semelhante, mas com características distintas de cultivo entre si. Entre as espécies silvestres, existem escassos estudos sobre o tema, de forma que adequar protocolos de cultivo e estabelecer o comportamento dessas células em cultura representam uma relevante etapa para o desenvolvimento de novos modelos em pesquisas com células-tronco.

METODOLOGIA

A proposta objetiva estabelecer protocolo de expansão celular *in vitro* e avaliar a curva de crescimento das células-tronco mesenquimais de medula óssea de catetos (*Tayassu tajacu*, *Linnaeus*, 1958), com a finalidade de utilização destes dados em futuras pesquisas com células-tronco medulares nesta espécie. A referida proposta faz parte de um projeto institucional do programa PRODOC – CAPES (AUX-PE 2128/2008) intitulado “Cultivo e Caracterização de Células-Tronco de Medula Óssea: Estudo em Modelos de Animais Silvestres”, finalizado em 30/06/2012, autorizado pelo SISBIO - ICMBio/IBAMA, nº. 19254-1.

Em uma primeira etapa, foram selecionados quatro catetos (*Tayassu tajacu*) machos, adultos jovens, hígidos, como doadores de medula óssea para isolamento e expansão de células-tronco mesenquimais (CTM) da medula óssea. As amostras de aspirado medular foram submetidas à centrifugação em solução com ficoll para separação do componente celular mononuclear do sangue, seguido do isolamento das CTM em meio DMEM High Glucose. As células foram expandidas para realizar estudo de unidades formadoras de colônias (UFC) e ensaios de cinética celular por meio de curva de crescimento por saturação. As culturas foram então congeladas em nitrogênio líquido na concentração de 10^5 células/mL durante 40 dias. Na segunda etapa da pesquisa, seis amostras de

CTM criopreservadas foram descongeladas em banho-maria a 37°C, utilizando-se duas amostras para estudo de cinética celular através de curva de crescimento e quatro amostras para análise da viabilidade celular sob estresse, onde as amostras descongeladas foram diluídas em solução salina tamponante (PBS) estéril, acondicionadas em seringas plásticas e submetidas à temperatura ambiente controlada de 24° C por 2, 4 e 8 horas, respectivamente, mimetizando uma situação de preparo das células para transplante.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos na primeira etapa do estudo demonstraram elevada celularidade da fração de células mononucleares ($3,15 \times 10^6$ a $3,66 \times 10^6$ células), com viabilidade celular média de 95%. As células apresentaram-se de tamanho grande e achatadas, com morfologia variando de fusiforme à fibroblástide² (Figura 1).

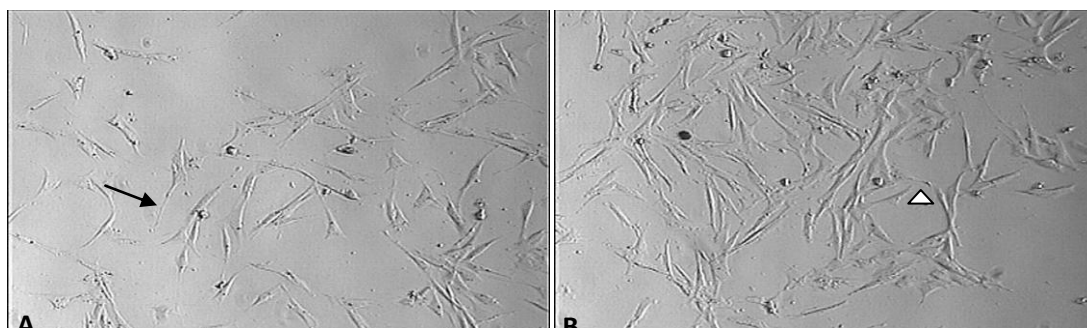
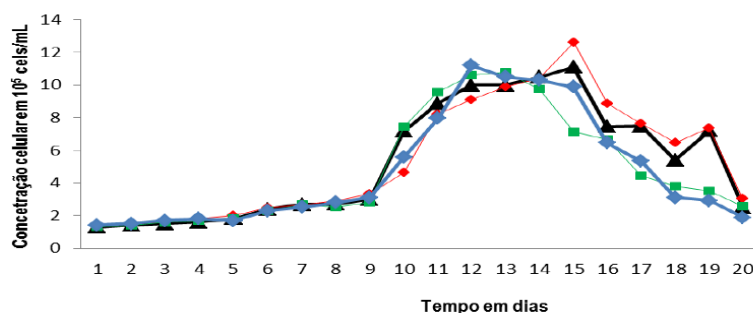


Figura 1. A: Células-tronco mesenquimais (seta) da medula óssea de catetos em quarta passagem. B: Projeções citoplasmáticas orientadas paralelamente entre as células distantes (cabeça de seta). Aumento de 20x.

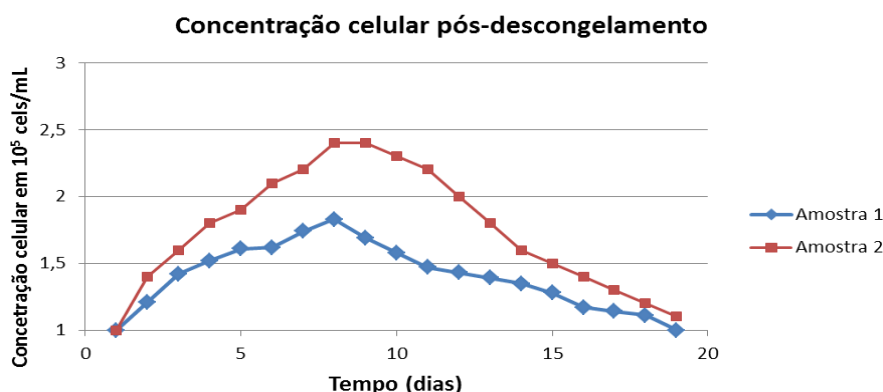
Durante o ensaio de UFC, identificaram-se, em média, $6,86 \pm 4,18$ colônias nas amostras estudadas. As UFC's apresentaram tamanho e morfologia variados e se expandiram progressivamente até coalescerem. O número de UFC's obtidas é apenas um indicativo do potencial da amostra coletada em conter CTM, mas não deve ser utilizado para avaliação direta da presença destas células na amostra, devido à grande heterogeneidade morfológica das UFC's entre indivíduos da mesma espécie. Quando expandidas por 10 passagens, observou-se uma viabilidade celular média de 91,25% e preservação da morfologia inicial. O estudo do comportamento cinético das células originou uma curva de crescimento com platô de saturação de crescimento entre o 13º e 16º dia, a partir do qual se iniciou a fase de declínio da concentração e viabilidade celular.

Gráfico 1. Concentração celular obtida em 20 dias de expansão celular de amostras de células-tronco mesenquimais de *Tayassu tajacu*, *Linaeus, 1958*. Teresina-PI, 2012.



Os resultados obtidos com a curva de crescimento de células criopreservadas demonstraram viabilidade celular média de 75%, com preservação da morfologia fusiforme. A concentração celular média obtida foi de $1,57 \times 10^5$ células/mL, por 19 dias de cultivo. Contudo, as células alcançaram platô de saturação de crescimento precocemente, no 8º dia, a partir do qual a viabilidade celular decresceu lenta e progressivamente.

Gráfico 2. Concentração celular média das células-tronco mesenquimais de catetos, após o descongelamento, durante realização do ensaio de curva de crescimento. Teresina-PI, 2012.



Fonte: Laboratório de Pesquisas Morfológicas em Ciência Animal da Universidade Federal do Piauí - UFPI. Teresina-PI, 2012.

Durante o estudo de viabilidade celular sob estresse, observou-se que até o período de quatro horas, mesmo em privação de nutrientes, a viabilidade das células em suspensão em PBS se manteve acima de 80%, obtendo-se o máximo de viabilidade em até duas horas de acondicionamento e o mínimo de 68,25% após oito horas.

CONCLUSÃO

As culturas de CTM de medula óssea de catetos apresentam uma elevada taxa de replicação *in vitro*, alcançando confluência total entre 13 e 16 dias, com elevada viabilidade celular. As curvas de crescimento apresentaram as fases *lag*, *log*, platô e declínio. Após o descongelamento, o declínio precoce da viabilidade das CTM sugere aumento da apoptose celular e indica a necessidade do estabelecimento de novos protocolos de descongelamento a fim de maximizar a capacidade de expansão após criopreservação. Contudo, observou-se que até duas horas, mesmo em temperatura ambiente e privadas de nutrientes do meio de cultivo, as CTM estromais de catetos preservaram viabilidade acima de 80%, o que favorecerá o desenvolvimento de futuros estudos pré-clínicos com estas células.

REFERÊNCIAS

¹ MEIRELLES *et al.* **Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues.** Journal of Cell Science, vol. 119, p.: 2204-2213, 2006.

² ARGÔLO NETO, N. M *et al.* **Role of the autologous mesenchymal stem-cells compared to platelet rich plasma on cicatrization of cutaneous wound in diabetic mice.** Clinical and Experimental Dermatology, vol. 37, n. 5, p.: 544-553, 2012.

Palavras-chave: Cateto. Células-tronco mesenquimais.