

Área:

CV (X)

CHSA ()

ECET ()

ESTUDO MORFOLÓGICO DOS PROGENITORES CELULARES DA MEDULA ÓSSEA DE CATETOS (*TAYASSU TAJACU*, LINNAEUS, 1758) E ISOLAMENTO DA FRAÇÃO CELULAR ESTROMAL ADERENTE.

Simony Silva Sousa (Bolsista PIBIC/CNPq), Napoleão Martins Argôlo Neto (Colaborador, Professor Campus Professora Cinobelina Elvas) Maria Acelina Martins de Carvalho (Orientadora, Departamento de Morfofisiologia Veterinária – UFPI)

Introdução

Dentre os diversos nichos anatômicos descritos com potencial para obtenção de células-tronco (CT) em animais, a medula óssea destaca-se pela facilidade de acesso e a presença de duas populações de CT distintas, as CT hematopoiéticas (CTH) e mesenquimais (CTM). As CTM são células somáticas multipotentes, de elevada plasticidade e grande potencial terapêutico por originar tecidos mesodermiais e não mesodermiais. Contudo, os estudos estas células em espécies silvestres são escassos e persistem grandes incertezas sobre a morfologia das CTM em espécies silvestres com potencial zootécnico.

Metodologia

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (nº. 041/11) e objetiva caracterizar morfologicamente as células progenitoras da medula óssea e isolamento da fração celular estromal aderente (*Tayassu tajacu*, *Linnaeus*, 1758).

Foram utilizados quatro catetos (*Tayassu tajacu*) machos, adultos, saudáveis, como doadores de medula óssea. Os animais foram anestesiados (quetamina/midazolam 5mg/0,5mg/Kg, propofol 5mg/Kg, Isoflurano) e submetidos à coleta de medula óssea. As amostras de aspirado medular foram submetidas à separação por gradiente de densidade em solução com ficoll para obtenção do componente celular mononuclear, seguido do isolamento das CTM em meio DMEM Low Glucose suplementado. As células foram incubadas à 37°C em 5% de CO₂ e umidade de 95. As CTM foram isoladas, expandidas, fotografadas em microscópio invertido de contraste de fase (COLEMAN NIB-100®) e analisadas por meio do software Leica Qwin® para análise morfométrica. Outras amostras obtidas do aspirado medular foram utilizadas para confecção de lâminas com esfregaços do tipo squash, corados com May-Grunwald-Giemsa para análise morfológica dos constituintes celulares da medula óssea. As lâminas foram fixadas com paraformaldeído por 10 minutos e corados com Giemsa por 20 minutos. Posteriormente, foram fotografadas (Formato VGA, 1200 pixels) em microscópio óptico de luz (Nikon Eclipse E 200, Japan), com auxílio de uma câmera digital (Sony DSC-W200, China). Selecionaram-se 20 campos aleatoriamente em objetiva de imersão e os constituintes celulares da medula óssea foram analisados quanto à morfologia celular, estado de maturação e diferenciação de células sanguíneas.

Resultados e Discussão

Os resultados 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%. Rocha *et al.* (2012) descreveu achado semelhante na concentração de células mononucleares, em amostras de medula óssea de cutias (*Dasyprocta prymnolopha*). Contudo, foi superior ao descrito em estudos recentes em camundongos (*Mus musculus*) e gatos (*Felis silvestris catus*) (MEIRELLES, 2003; MACIEL, 2010). O tamanho destas espécies, camundongos e gatos, quando comparado a uma espécie de maior porte, como o Cateto, poderia induzir menor concentração celular, pelo menor volume de sangue coletado.

Nos primeiros dias, foi observada a formação de *clusters* celulares. Após o isolamento da fração celular aderente, estas coalesceram e formaram uma monocamada celular com 80% de confluência após 25 dias de cultivo. Apresentando morfologia tipicamente fusiforme e fibroblastóide durante a expansão, dispuseram-se lateralmente umas às outras, com limites celulares bem definidos, emitindo prolongamentos citoplasmáticos com células circunvizinhas, características morfológicas já descritas por outros autores (COMITE *et al.*, 2010; MEIRELLES, 2003). No entanto, estas células apresentaram morfologia típica em cultivo de CTM. (figura 1)

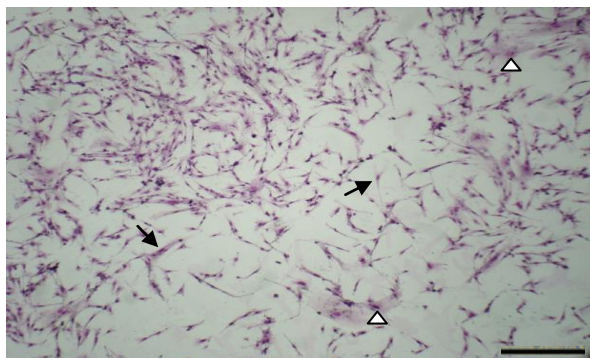


Figura 1. Células-tronco mesenquimais medulares de cateto. Predominância da morfologia fusiforme (setas) frente à morfologia fibroblastóide (cabeças de seta). Aumento de 10x.

O estudo morfométrico com CTM revelou tamanho/área celular médio de $43,37 \pm 17,30 \mu\text{m}$ em tamanho do núcleo de $12,21 \pm 2,85 \mu\text{m}$ 300 células analisadas. Observou-se que as células mantiveram a morfologia fibroblastóide típica, com núcleo anfófilico, citoplasma basofílico e condensação de cromatina evidente. Maciel (2010) em culturas de CTM da medula óssea e tecido adiposo de gatos (*Felis domesticus*) descreveu que as CTM estromais e adiposas apresentavam, em média, $27,12 \mu\text{m}$ e $34,86 \mu\text{m}$ de área, respectivamente. É possível que haja diferenças morfométricas entre as CTM nas espécies diferentes e até mesmo entre nichos anatômicos na mesma espécie.

A análise microscópica dos esfregaços de sangue medular de catetos demonstrou uma população celular bem definida. Observou-se células hematopoiéticas em diferentes estágios de maturação e plaquetas. Não foram identificados todos os estágios, dentre as diferentes linhagens observadas, sobretudo tipos celulares de menor grau de diferenciação. Estes achados apresentaram grande similaridade morfológica com estas linhagens correspondentes em humanos e animais (OLSSON *et al.*, 2009; ROCHA *et al.*, 2012). Possivelmente, esta similaridade morfológica, corresponda à similaridade fisiológica dentre as espécies.

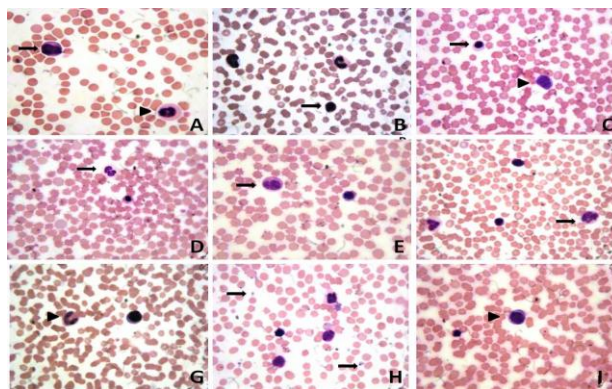


Figura 2. Fotomicrografias de esfregaços do sangue medular de catetos. A: Precursor das linhagens linfoides ou mioeloides (seta), eosinófilo em bastão (cabeça de seta) B: Linfócito (setas). C: Prorrubricito (cabeça de seta), metarrubricito (seta) D: Neutrófilo segmentado (seta) E: Metamielócito eosinófilo (seta). F: Promielócito (seta) G: Eosinófilo em bastão (cabeça de seta). H: Plaquetas (setas). I: Rubricito (cabeça de seta). Coloração Giemsa. Objetiva 100x.

Conclusão

As células mantiveram-se com morfologia típica em cultivo, apresentando características predominantemente fusiformes, demonstrando homogeneidade celular. Análise dos constituintes celulares estromais demonstrou que as células sanguíneas da medula óssea de catetos assemelham-se às células correspondentes em humanos e outros animais, indicando que esta espécie possui potencial para ser utilizada como modelo para estudos com medula óssea.

Referências Bibliográficas

- COMITE, P. et al. Isolation and ex vivo expansion of bone marrow-derived porcine mesenchymal stromal cells: potential for application in an experimental model of solid organ transplantation in large animals. **Transplant. Proc.** 42 (4):1341-3, 2010.
- MACIEL B. B. **Isolamento, cultivo e caracterização de células-tronco mesenquimais da medula óssea e do tecido adiposo de gato.** 2010.108f. Tese (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, PR.
- MONTEIRO, BS. *et al.* Células tronco mesenquimais. **Ciência rural.** 08p. 2009
- NARDI, N.B & MEIRELLES, L.S. Mesenchymal stem cells: isolation, *in vitro* expansion and characterization. **Handbook of Experimental Pharmacology**, vol 174, pag. 249-282, 2006.
- ROCHA, A. R *et al.* Hematopoietic Progenitor Constituents and Adherent Cell Progenitor Morphology Isolated From Black-Rumped Agouti (*Dasyprocta rymnolopha*, Wagler 1831) Bone Marrow. **Microscopy research and technique.** 00:000–000, 2012.
- OLSSON, D.C. *et al.* Colheita de medula óssea em cães: modelo para obtenção da fração total de células mononucleares. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.39, n.1, p.141-147, jan - fev, 2009.
- MEIRELLES L. S. & NARDI, N.B. Murine marrow-derived mesenchymal stem cell: isolation, *in vitro* expansion, and characterization. **British Journal of Haematology**, vol.123, pag. 702-711, 2003.

Palavras-chave: Células-tronco, medula óssea, animais silvestres, cultivo celular