

Células-tronco mesenquimais da medula óssea de coelhos: isolamento, cultivo *in vitro* e perspectivas de utilização em lesões tendíneas

Luiz Augusto de SOUZA¹; Luiz Antônio Franco da SILVA²; Benito Juarez Nunes Alves de OLIVEIRA¹; Aliny Pereira de LIMA³; Taís Andrade DIAS⁴; Flávia Duarte de JESUS⁵

¹ Doutorando. Escola de Veterinária e Zootecnia - UFG. souza_vet@yahoo.com.br

² Professor Adjunto. Escola de Veterinária e Zootecnia - UFG.

³ Doutoranda. Instituto de Ciências Biológicas - ICB/UFG.

⁴ Mestranda. Escola de Veterinária e Zootecnia - UFG.

⁵ Graduanda. Escola de Veterinária e Zootecnia - UFG.

Palavras-chave: Colágeno, MesenCult® humano, Tenectomia

INTRODUÇÃO

A inovação científica e o potencial terapêutico das células-tronco (CT) derivadas de tecidos adultos às áreas médica e científica têm sido reportados há anos. Tais células estão envolvidas na renovação natural de tecidos e o seu potencial terapêutico baseia-se na capacidade de se transformar em várias outras linhagens celulares (NARDI & MEIRELLES, 2006).

Métodos convencionais de tratamento para traumas ocorridos no aparelho locomotor promovem resultados frustrantes quando considerados o tempo de cicatrização e a qualidade do tecido formado (HADDAD et al., 1997). Pesquisas recentes relacionadas ao traumatismo de tendão oferecem técnicas corretivas com associação da terapia celular com os biomateriais permitindo a obtenção de bons resultados em situações de alta complexidade (HUANG et al., 2006).

Sabe-se que as células-tronco revelam terapias potenciais para a medicina regenerativa que propõe que a utilização das células mesenquimais adultas resultam em regeneração de qualidade sem a formação de cicatrizes ou fibrose. Desse modo, a experimentação laboratorial envolvendo esses tipos de células está evoluindo, porém, são necessários estudos fundamentados e controlados sobre as diferentes fontes de CT e métodos de purificação para expansão em cultura que confirmem a contribuição desta terapia na qualidade da cicatrização (ZAGO & COVAS, 2004).

Portanto, tendo em vista a importância do aparelho locomotor e suas limitações relacionadas ao tratamento, optou-se pela realização deste estudo na expectativa de descrever os procedimentos para obtenção, isolamento e cultivo das células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea (MO) de coelhos e sua aplicação em lesões tendíneas iatrogênicas.

MATERIAL E MÉTODOS

Após aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFG, sob o protocolo nº 134/11, foram selecionadas aleatoriamente 10 unidades experimentais para padronização da metodologia de isolamento e cultivo dentre 48 coelhos da raça Nova Zelândia. Estes fazem parte de um projeto de doutorado do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal de Goiás.

Os animais foram submetidos ao protocolo anestésico para realização da tricotomia e antisepsia da região escápulo-umeral. Com uma agulha metálica de Rosenthal 16 gauge, heparinizada e inserida na região do tubérculo umeral, foram aspirados 8,0ml de MO utilizando seringa de 10ml com 0,2ml de solução estéril heparinizada (5000U/ml).

Em capela de fluxo laminar, o aspirado foi dividido em quatro tubos Falcon estéreis de 15ml e diluídos em 2,0ml de solução salina tamponada (DPBS, Gibco® Invitrogen, São Paulo, SP, Brasil) acrescida de soro fetal bovino (SFB) a 10% e 10Mm EDTA (RoboSep, Stem Cell®, Vancouver, Canadá). Cada amostra foi adicionada sobre 2,0ml de solução Ficoll-paque® Plus (Amersham Biosciences, São Paulo, SP, Brasil). Em seguida, foram centrifugadas a 495 x g durante 30 minutos a 15°C e separadas em plasma, nuvem celular, Ficoll-paque® e células vermelhas.

As nuvens celulares foram transferidas para um único tubo Falcon que foi centrifugado a 385 x g durante 10 minutos a 4°C por duas vezes com 10,0ml de DPBS seguida de uma terceira centrifugação com MesenCult® suplementado com SFB a 10%. O meio foi desprezado e o sedimento celular resuspenso em 2,0ml do mesmo meio para determinação do rendimento e viabilidade celular em câmara hemocitométrica pela técnica de exclusão vital por azul de Tripán 4%.

A partir da fração mononuclear as células-tronco mesenquimais (CTMs) foram obtidas pela depleção negativa das células hematopoiéticas, utilizando o anticorpo monoclonal CD45 de camundongo anti-coelho, complexo tetramérico e nanopartículas magnéticas (EasySep, StemCell®, Vancouver, Canadá). Inicialmente, foi adicionado as células IgG1 de camundongo a 5%, permanecendo por cinco minutos. Em seguida, 20µL do anticorpo CD45 com repouso de 15 minutos e 20µL das nanopartículas magnéticas. A amostra foi acondicionada em tubo de poliestireno e acrescida de PBS suplementado com SFB e EDTA até o volume final de 2,5ml. Inserido na base magnética o tubo permaneceu por 10 minutos e em seguida foi vertido em um tubo Falcon onde foram depositadas as CTMs para nova contagem.

As CTMs isoladas foram inicialmente cultivadas em garrafas de cultura de 25cm³ imersas em meio MesenCult[®] humano suplementado com SFB a 10%, gentamicina (25µg/ml) e anfotericina B (1µg/ml) mantidas em estufa a 37°C com 5% de CO₂. Após 72 horas o meio foi removido e as células não aderentes descartadas, a cada três dias o meio era novamente removido. O crescimento foi avaliado em microscópio invertido até que atingissem 80 a 90% de confluência período em que foram subcultivadas em garrafas de 75 cm³ após tratamento com tripsina/EDTA (0,25%) (Gibco-BRL). A concentração celular foi ajustada para 1,0x10⁵ células em 200µl de meio Mesencult[®] para serem inoculadas nos defeitos tendíneos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em relação ao local da aspiração da MO foi citado por GRINDEM et al. (2002) a crista ilíaca e o trocanter maior do fêmur. Optou-se pela colheita no tubérculo umeral devido à facilidade na obtenção do aspirado. Embora alguns estudos como o de MUSCHLER et al. (1997) não determinaram a necessidade e o volume adequado do anticoagulante, o volume utilizado neste estudo impediu a coagulação das amostras e não interferiu na viabilidade celular.

Com metodologia semelhante à de SOUZA (2009) foi possível isolar e quantificar as células da MO pelo gradiente de densidade Ficoll-paque[®]. No entanto, acredita-se que o rendimento e a viabilidade celular entre os animais variaram devido aos fatores intrínsecos e a técnica de manipulação (Tabela 1).

Tabela 1 – Rendimento e viabilidade da fração de células mononucleares e células-tronco mesenquimais isoladas da medula óssea de coelhos.

Amostras	Células mononucleares (CMNs)		Células-tronco mesenquimais (CTMs)	
	Rendimento (cél./mL) x 10 ⁶	Viabilidade (%)	Rendimento (cél./mL x 10 ⁶)	Viabilidade (%)
1	7,04	98,05	5,00	97,20
2	13,00	96,74	3,77	96,15
3	13,70	95,32	1,50	96,77
4	3,72	99,46	2,22	99,10
5	9,22	98,71	3,45	98,57
6	3,20	94,67	0,22	100
7	1,06	96,36	1,16	98,30
8	6,88	98,00	1,32	100
9	8,16	96,91	1,42	95,94
10	7,12	97,26	2,70	95,74
Média	7,31	97,15	2,28	97,77

Foi observado um rendimento médio de $7,31$ e $2,28 \times 10^6$ células/ml de CMNs e CTMs respectivamente, sendo que 30% do total das CMNs eram compostas por CTMs da MO, o que justifica o processo de isolamento por meio das nanopartículas magnéticas. Logo, a depleção negativa com o anticorpo monoclonal CD45 permitiu a separação das células-tronco hematopoiéticas das mesenquimais, sendo estas últimas adicionadas em meio MesenCult[®] para expansão celular.

Durante os primeiros ensaios para expansão das células observou-se contaminação do cultivo entre 24 e 72 horas após a semeadura. Depois de seguidas tentativas foi possível iniciar a expansão das CTMs. Com três dias de cultivo observaram-se células com características fibroblastóides e epitelióides aderidas no fundo da garrafa, bem como a formação de unidades formadoras de colônias fibroblásticas (Figura 1). Após as subdivisões houve predominância de células fibroblastóides e em alguns casos, presença de grandes células arredondadas e multinucleadas. ROMANOV et al. (2003) obtiveram as primeiras colônias aderentes somente após o quinto dia. Os resultados demonstraram que é possível obter as CTMs em um curto espaço de tempo usando o meio de cultura MesenCult[®].

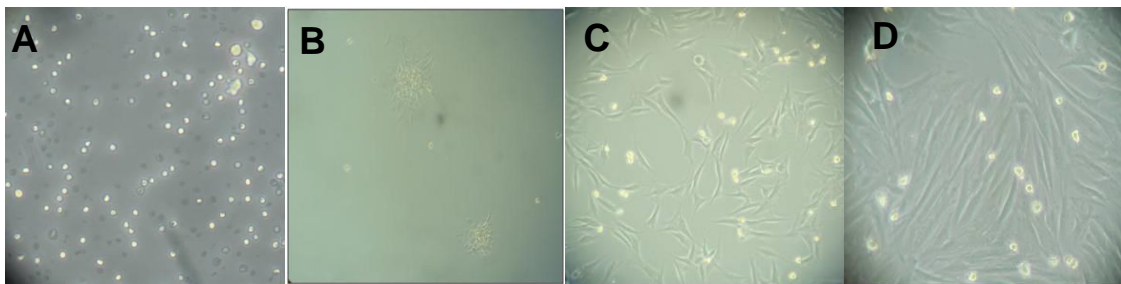


Figura 1. Fotomicrografia. Células-tronco mesenquimais aderentes provenientes da medula óssea de coelhos. Em (A) células-tronco mesenquimais no dia 0, (B) unidades formadoras de colônias fibroblásticas, (C) início de confluência das células fibroblastóides no 3^o dia, (D) células fibroblastóides confluentes 10^o dia. Aumento 200x

Após utilização de garrafas de 25 e 75cm³ as amostras foram subcultivadas em garrafas de 150cm³ fase em que já se encontravam entre a 4^o e 7^o passagem. Essas culturas foram submetidas a várias etapas de tripsinização e permaneceram em cultivo por longos períodos. Tais achados corroboram com os estudos de KAWASAKI-OYAMA et al. (2008) onde CMNs adquiridas do sangue do cordão umbilical permaneceram viáveis de dois a três meses em cultura.

Embora no presente estudo não tenham sido empregados marcadores específicos de CTMs e indução de diferenciação para confirmação da presença de CT, a proliferação celular observada é um indicativo da presença de células-tronco.

Pois células diferenciadas ou senescentes possuem tempo de vida limitado, caracterizado pela perda da capacidade de proliferação e alteração da morfologia, levando à estagnação da cultura o que justifica tal afirmação (BIEBACK et al., 2004).

CONCLUSÕES

Os protocolos para isolamento de CMNs da MO por meio do gradiente de densidade Ficoll-paque® foi eficiente, assim como depleção negativa das células hematopoiéticas em base magnética para obtenção das CTMs. O cultivo dessas células em MesenCult® humano proporcionaram ambiente adequado para a expansão das CTMs da medula óssea de coelhos para posterior aplicação em lesões tendíneas. Os resultados são preliminares e a contribuição desta terapia na qualidade da cicatrização será observada futuramente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BIEBACK K, KERN S, KLÜTER H, EICHLER H. Critical parameters for the isolation of mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. **Stem Cells**, Ohio v.22, n.4, p.625-634, 2004.
2. GRIDEM, C.B.; NEEL, J.A.; JUOPPERI, T.A. Cytology of bone marrow. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, Philadelphia, n.32, p.1313-1374, 2002.
3. HADDAD, J.L.; CHAVEZ-ABRAHAM, V.; CARRERA, J.; VILCHIS, J.; SASTRE, N. Microsurgical reconstruction of the Achilles tendon with a fascia lata flap. **Journal Reconstructive Microsurgery**, Washington, v.13, n.5, p. 309-312, 1997.
4. HUANG, H.; ZHAO, X.; CHEN, L.; XU, C.; YAO, X.; LU, Y.; DAI, L.; ZHANG M. Differentiation of human embryonic stem cells into smooth muscle cells in adherent monolayer culture. **Biochemical Biophysical Research Communication**, New York, v.351, n.2, p.321-327, 2006.
5. KAWASAKI-OYAMA, R.S.; BRAILE, D.M.; CALDAS, H.C.; LEAL, J.C.F.; GOLONIBERTOLLO, E.M.; PAVARINO-BERTELLI, E.C.; FILHO, M.A.; SANTOS, I. Cultivo de células mesenquimais do sangue de cordão umbilical com e sem uso do gradiente de densidade Ficoll-Paque. **Revista Brasileira de Cirurgia Cardiovascular** [online]. v.23, n.1, p.29-34, 2008.
6. MUSCHLER, G.V.; BOEHM, C.; EASLEY, K. Aspiration to obtain osteoblast progenitor cells from human bone marrow: the influence of aspiration volume. **Journal Bone Joint Surgery**, Massachusetts, v.79a, n.11, p.1699 -1709, 1997.
7. NARDI, N.B.; ALFONSO, Z.C. Células Tronco Hematopoiéticas. In: ZAGO, M.A.; COVAS, D.T. **Células Tronco, a nova fronteira da medicina**. São Paulo: Atheneu, 2006. p.49-65.
8. COVAS, D.T. **Células Tronco, a nova fronteira da medicina**. São Paulo: Atheneu, 2006. p.49-65.
9. ROMANOV, Y.A.; SVINTSITSKAYA, V.A.; SMIRNOV, V.N. Searching for alternative sources of postnatal human mesenchymal stem cells: candidate MSC-like Cells from umbilical cord. **Stem Cells**, Ohio. v.21, n.1, p.105-110, 2003.
10. SOUZA, L.A. **Enxerto osteocondral alógeno, associado à inoculação de células mononucleares autólogas da medula óssea no reparo do sulco troclear de coelhos**. 2008. 82f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia.
11. ZAGO, M.A.; COVAS, D.T. Pesquisas com células-tronco: aspectos científicos, éticos e sociais. In: SEMINÁRIO DO INSTITUTO FERNANDO HENRIQUE CARDOSO, 2004, São Paulo. **Anais...** São Paulo: Instituto Fernando Henrique Cardoso, 2004, 23 p.