

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIAS PROVENIENTES DO TECIDO CÓRION-CORONÁRIO DE EQUINOS

Luiza Lopes da Silva¹; Fernanda Aquino Franco²; Maiele Dorneles Silveira²;
Nance Beyer Nardi²; Carla Augusta Sassi da Costa Garcia²; Charles Ferreira
Martins³

¹*Universidade Federal de Pelotas – lulopes @hotmail.com*

²*Universidade Federal de Pelotas – ffernandafranco@gmail.com*

²*Universidade Luterana do Brasil – maiele@cellvet.com.br*

²*Universidade Luterana do Brasil – nance@cellvet.com.br*

²*Universidade Federal de Pelotas – gutascgarcia@gmail.com*

³*Universidade Federal de Pelotas – martinscf68@yahoo.com.br*

1. INTRODUÇÃO

Na última década, os estudos no campo da medicina alternativa apresentaram grande evolução à medida que a pesquisa científica passou a explorar o potencial das células-tronco mesenquimais (CTMs) (FORTIER & TRAVIS, 2011). Desde 1976, estas células vêm sendo isoladas a partir da medula óssea e utilizadas, terapeuticamente, em inúmeras enfermidades visando melhorar a qualidade de vida dos pacientes (ESTRELA et al., 2011).

As CTMs são células progenitoras consideradas multipotentes, as quais possuem capacidade de serem manipuladas *in vitro* e, por cultura, liberarem produtos com potencial de aumentar a resposta terapêutica e favorecer a reestruturação e recuperação de tecidos lesionados (HARVANOVÁ et al., 2011).

De acordo com DOMINICI et al. (2006), para definir uma célula como CTM, está deve corresponder a três critérios mínimos fundamentais, os quais constituem na capacidade de crescer como célula aderente quando submetida a condições de cultura, possuir capacidade de diferenciar-se em células de linhagens mesenquimais, como osteoblastos, adipócitos e condroblastos quando cultivada *in vitro* e expressar抗ígenos específicos de superfície CD105, CD73 e CD90 e ausência de CD14 ou CD11b, CD19, CD34, CD45, CD79 e HLA-DR em 95% das células em cultura.

Sendo assim, as células por possuírem alta capacidade de proliferação, diferenciação e autorrenovação, constituem uma ferramenta promissora na reparação tecidual (FORTIER & TRAVIS, 2011) à medida que, ao autorreplicar-se, irá constituir-se de uma nova célula-tronco ou poderá produzir ao menos um tipo de célula diferenciada com funções especializadas (ALISON et al., 2002; SANDHAANAM, et al., 2013). Em virtude dessa capacidade de diferenciação em células de função específica, as CTMs vêm sendo utilizadas em medicina regenerativa equina para o tratamento de inúmeras condições clínicas ortopédicas, as quais refletem em claudicação e diminuição do desempenho atlético desses animais (GUERCIO et al., 2015). Dentre as enfermidades mais comuns, em que a terapia regenerativa vem sendo aplicada, estão tendinites, desmite do ligamento suspensório, doenças articulares, laminites (SCHNABEL et al., 2015; CARRED et al., 2011).

Apesar do grande avanço na utilização das células na terapia celular reparadora em medicina ortopédica, pouco se comprehende sobre a biologia celular do epitélio epidérmico do casco de equinos (ESTRELA et al., 2011; CARTER et. al., 2011). Segundo CARTER et al., (2011) as células-tronco presentes no epitélio epidérmico do casco que expressam a proteína p63, além

de atuarem regenerando estruturas e promovendo o crescimento lamelar, ainda exercem atividade no controle homeostático do tecido, atuando portanto, como reguladoras no que tange o potencial proliferativo dessas células.

Assim como a homeostase, a manutenção do crescimento do casco também está relacionada à proliferação de células epidérmicas, principalmente oriundas da região coronariana (CARTER et al., 2011). Portanto, a perda epidérmica de células-tronco dessa região bem como a desregulação da expressão da proteína p63 pode contribuir com inúmeras patologias relacionadas à estrutura do casco podendo conduzir à displasia epidérmica (CARTER et al., 2011).

Em vista disso, acredita-se que o tecido córion coronariano possua alta capacidade condrogênica e, dessa forma, o cultivo e consequente aplicação dessas células no tratamento de patologias do casco poderá melhorar a qualidade do tecido.

Portanto, em caráter inovador, o presente estudo teve por objetivo determinar o isolamento e caracterização de células-tronco mesenquimais derivadas do tecido córion-coronário, avaliando seu potencial de proliferação e diferenciação.

2. METODOLOGIA

No presente estudo, foram avaliadas cinco amostras ($n=5$) de tecidos digitais coronários. As coletas foram realizadas no Frigorífico Foresta, localizado no município de São Gabriel, Rio Grande do Sul. As peças destinadas ao estudo eram provenientes de equinos de casco sadio, faixa etária entre cinco e doze anos e sem diferenciação de sexo.

O isolamento das CTTCCs foi realizado conforme metodologia estabelecida no Laboratório de Células-Tronco e Engenharia de Tecidos da ULBRA (NARDI & CAMASSOLA, 2011), baseada no protocolo descrito por Zuk et al. (2001). A morfologia das culturas foi analisada por exame periódico em microscópio invertido com contraste de fase (Axiovert 25, Carl Zeiss, Alemanha) e foram realizadas fotomicrografias com câmera digital (AxioCam MRC, Carl Zeiss), usando o programa Axiovision 1.0.0.4 (Carl Zeiss).

As células foram mantidas em cultivo até atingirem 85-90% de confluência, desaderidas, e as células plaqueadas conforme a densidade necessária.

As células foram cultivadas até 80-90% de confluência e contadas em cada passagem - de 3° à 10° . A média entre crescimento de população e de tempo foi expressa em dias. A duplicação da população em tempos diferentes das culturas foi calculada pela fórmula: tempo de duplicação da população: $\log(\text{celular final número}) - \log(\text{número inicial de células}) = K T$, onde K é a constante geração (0,008963) e t é o tempo em dias (MARKARIAN et al., 2013; ROTH, 2006).

As células isoladas tiveram sua plasticidade testada, sendo induzidas a se diferenciarem com meios indutores para tipos celulares osteogênico e condrogênico. As células foram induzidas à diferenciação quando alcançaram a sexta passagem, segundo protocolos realizados por MEIRELLES et al (2006).

Para avaliação do ensaio de cicatrização promoveu-se um arranhão em linha reta representando uma ferida artificial. As células foram analisadas diariamente por exame em microscópio invertido com contraste de fase (Axiovert 25, Carl Zeiss, Alemanha). Realizou-se fotomicrografias com câmera digital (AxioCam MRC, Carl Zeiss), usando o programa Axiovision 1.0.0.4 (Carl Zeiss), assim a migração das células nesta ferida artificial pode ser avaliada (ZHU et al., 2010).

O potencial das culturas para formação de colônias foi analisado por diluição limitante e em triplicatas amostrais. Foram consideradas colônias agrupamentos com mais de 5 células e o resultado foi expresso na forma de % de células formadoras de colônias (MEIRELLES et al, 2006).

A análise estatística foi realizada com o auxílio dos programas Statistical Package for Social Sciences (SPSS), versão 19.0, e GraphPad Prism 5. As variáveis numéricas foram descritas como média e desvio padrão, ou mediana e intervalo interquartil (25-75%). As variáveis categóricas foram descritas sob a forma de proporções. Foram utilizados os testes do Qui-quadrado para variáveis categóricas e teste t de Student ou Mann Whitney para as variáveis numéricas. Para todas as comparações foi considerado um nível de significância de 5%.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Quando isoladas e cultivadas, as células apresentaram rendimento variado entre 2 e 12×10^4 células por grama de tecido.

A manutenção e expansão do cultivo de células-tronco mesenquimais foram realizadas quando as células atingiam 80% a 90% de confluência, sendo utilizadas em todos os experimentos entre as passagens P3 e P4. As células, por sua vez apresentaram morfologia fusiforme típica de células-tronco mesenquimais.

As células, à medida que tiveram sua plasticidade testada, observou-se que as mesmas apresentaram potencial adequado para diferenciação osteogênica e condrogênica, conforme demonstrado nas figuras 2 e 3.

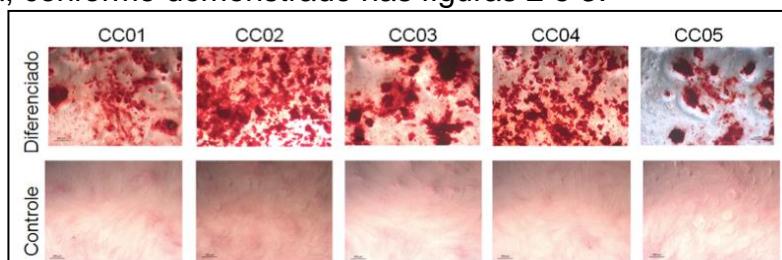


Figura 2 - Diferenciação osteogênica das culturas de CTTCCs

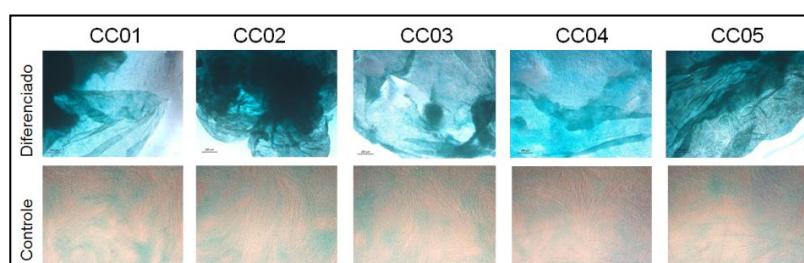


Figura 3 - Diferenciação condrogênica das culturas de CTTCCs.

O ensaio de cicatrização foi realizado em triplicata, sendo os resultados uma média destas. Nos momentos 0h, 24h e 48h analisou-se a migração das células, as quais rapidamente fecharam a lesão artificialmente criada na cultura.

Para avaliação do potencial clonogênico foram consideradas colônias com agrupamentos com mais de 50 células. Os resultados demonstraram que as CTTCCs têm potencial clonogênico adequado, com formação de 30,6 a 54,6 colônias/ amostra.

O ensaio de proliferação não apresentou diferenças significativas quando comparado os valores entre as amostras, porém quando analisados os tempos de duplicação de cada amostra em separado pode ser vista uma diferença significativa de tempo de duplicação entre as passagens.

4. CONCLUSÕES

Este projeto consistiu no primeiro estudo de isolamento e caracterização de CTMs oriundas do córion-coronário em equinos, nas quais as células apresentaram características compatíveis com células-tronco mesenquimais. Em vista disso, pretende-se, em estudos futuros a serem realizados *in vivo*, testar a promoção da regeneração de tecidos lesionados decorrentes de doenças ortopédicas no casco.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALISON et al. An introduction to stem cells. **J Pathol.** 2002; 197: 419-23.
- CARRED, D.D. et al. Clinicopathologic findings following intra articular injection of autologous and allogeneic placentally derived equine mesenchymal stem cells in horses. **Cyotherapy;** 2011.
- CARTER et al. Decreased expression of p63, a regulator of epidermal stem cells, in the chronic laminitic equine hoof. **Equine Veterinary Journal;** 2011, 43 (5) 543-551.
- DOMINICI et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cyotherapy;** 2006.
- ESTRELA, C. et al. Mesenchymal Stem Cells in the Dental Tissues: Perspectives for Tissue Regeneration. **Braz Dent Journal** 22(2); 2011.
- FORTIER, L.A., TRAVIS, A. Stem cells in veterinary medicine. **Stem Cell Research & Therapy;** 2011.
- GUERCIO, A. et al. Mesenchymal stem cells derives from subcutaneous fat and platelet-rich plasma used in athletic horses with lameness of the superficial digital flexor tendon. **Journal of Equine Veterinary Science;** 2015.
- HARVANOVÁ, D. et al. Isolation and Characterization of Synovial Mesenchymal Stem Cells. **Folia Biologica (Praha)** 57, 119-124; 2011.
- MARKARIAN et al. Isolation of adipose-derived stem cells: a comparison among different methods. **Biotechnol. Lett.** 2014; 36(4):693-702.
- MEIRELLES, L.S., CHAGASTELLES, P.C., NARDI, N.B. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. **J Cell Sci.** 2006; 119:2204-13.
- MEIRELLES, L.S. & NARDI, N.B. Murine marrow-derived mesenchymal stem cell: isolation, *in vitro* expansion, and characterization. **British Journal of Haematology.** 2003; 123:702–11.
- NARDI, N.B. & CAMASSOLA, M. Isolation and culture of rodent bone marrow-derived multipotent mesenchymal stromal cells. **Methods Mol. Biol.** 2011; 698:151-60.
- ROTH, V. Doubling Time Computing, 2006. Disponível em: <http://www.doubling-time.com/compute.php> Acessado em 25/01/2016.
- SANDHAANAM, S.D. et al. mesenchymal stem cells (MSC): Identification, proliferation and differentiation – A review article. **PeerJ PrePrints;** 2013.
- SCHNABEL, L.V. et al. Therapeutic use of stem cells in horses: Which type, how, and when? **The Veterinary Journal;** 2013.
- ZHU et al. Celastrol acts as a potent antimetastatic agent targeting beta1 integrin and inhibiting cell-extracellular matrixadhesion, in part via the p38 mitogen-activated protein kinase pathway. **J Pharmacol Exp Ther.** 2010; 334(2):489-99.
- ZUK et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. **Tissue Eng.** 2001; 7:211-28.